

Profili hlapivih spojeva eteričnih ulja i hidrolata motra (Critimum maritimum L.) dobivenih različitim postupcima destilacija

Koceić, Petra

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:156355>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-04**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PROFILI HLAPIVIH SPOJEVA ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA
MOTRA (*CRITIMUM MARITIMUM* L.) DOBIVENIH RAZLIČITIM
POSTUPCIMA DESTILACIJE**

ZAVRŠNI RAD

**PETRA KOCEIĆ
MATIČNI BROJ:151**

Split, srpanj 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

PROFILI HLAPIVIH SPOJEVA ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA
MOTRA (*CRITIMUM MARITIMUM* L.) DOBIVENIH RAZLIČITIM
POSTUPCIMA DESTILACIJE

ZAVRŠNI RAD

PETRA KOCEIĆ
MATIČNI BROJ: 151

Split, srpanj 2023.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY
FOOD TECHNOLOGY**

**PROFILES OF VOLATILE COMPOUNDS OF ESSENTIAL OILS
AND HYDROLATES OF ROCK SAMPHIRE (*CRITIMUM
MARITIMUM* L.) OBTAINED BY DIFFERENT DISTILLATION
PROCEDURES**

BACHELOR THESIS

PETRA KOCEIĆ

Parent number: 151

Split, July 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
Komentor: dr. sc. Marijana Popović

PROFILI HLAPIVIH SPOJEVA ETERIČNIH ULJA I HIDROLATA MOTRA (*CRITHMUM MARITIMUM* L.) DOBIVENIH RAZLIČITIM POSTUPCIMA DESTILACIJA Petra Koceić, 151

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je istražiti učinke različitih metoda izolacije na kemijski sastav eteričnih ulja motra (*Crithmum maritimum* L.) kao i na sastav hlapivih spojeva prisutnih u hidrolatima koji zaostaju kao nusprodukt izolacije. Korištene su konvencionalne metode destilacije, vodena destilacija (HD) i parna destilacija (SD) te moderna „zelena“ metoda destilacije potpomognuta mikrovalovima (MHD). Izolacija hlapivih spojeva hidrolata izvršena je mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (HS-SPME). Za odvajanje i identifikaciju kemijskih sastojaka eteričnih ulja i hidrolata korišten je spregnuti sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS). Eterično ulje dobiveno SD imalo je viši udio terpinena-4-ol, γ -terpinena i limonena nego li ulje izolirano HD i MHD. Sabinen je u najvišem udjelu bio prisutan u eteričnom ulju dobivenom MHD, dok je *E*-(β)-ocimen najviše zastupljen u eteričnom ulju dobivenom HD postupkom. U hidrolatu zaostalom nakon HD dominantni spojevi su 10-(acetilmetil)-3-karen i benzacetaldehid, dok je terpinen-4-ol s najvišim udjelom zastupljen u MHD hidrolatu. U hidrolatu dobivenom parnom destilacijom ističu se terpinen-4-ol, (*Z*)-sabinen hidrat i (*E*)-sabinen hidrat. Kemijski sastav hidrolata razlikuje se od sastava eteričnog ulja, kako po vrsti, tako i po broju različitih spojeva kojima eterična ulja u odnosu na hidrolate oskudijevaju. Iz ovog istraživanja može se zaključiti da je metoda izolacije imala velik utjecaj na kemijske profile eteričnog ulja motra, a posebice na profil spojeva hidrolata. Zbog svog vrijednog kemijskog sastava hidrolati kao glavni nusprodukt izolacije eteričnih ulja mogu se smatrati vrijednim izvorom bioaktivnih spojeva koji imaju veliku potencijal za daljnje korištenje u različitim industrijama.

Ključne riječi: morski komorač; destilacija; eterična ulja; hidrolati; hlapivi spojevi; GC-MS

Rad sadrži: 39 stranica, 16 slika, 2 tablice, 74 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

| | |
|-----------------------------------------------|-------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza | predsjednik |
| 2. dr. sc. Marijana Popović | komentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić | mentor |

Datum obrane: 7. srpnja 2023. g.

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 završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate studies

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Supervisor: Assoc. Prof. Ivana Generalić Mekinić, Ph. D.
Co-supervisor: Marijana Popović, Ph. D.

PROFILES OF VOLATILE COMPOUNDS OF ESSENTIAL OILS AND HYDROLATES OF ROCK SAMPHIRE (*CRITHMUM MARITIMUM* L.) OBTAINED BY DIFFERENT DISTILLATION PROCEDURES

Petra Koceić, 151

Abstract:

The aim of this work was to investigate the effects of different isolation methods on the chemical composition of the essential oils of rock samphire (*Crithmum maritimum* L.) and composition of the volatile compounds in the hydrolates, that remain as a by-products of essential oil isolation. Conventional distillation methods, water distillation (HD) and steam distillation (SD) were used, as well as a modern "green" method, microwave-assisted distillation (MHD). Isolation of volatile compounds from the hydrolates was performed by solid phase microextraction (HS-SPME). A coupled system of gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) was used to separate and identify the chemical components of the essential oils and hydrolates. The essential oils obtained by SD had higher levels of terpinene-4-ol, γ -terpinene and limonene than those obtained by HD and MHD. Sabinene was most abundant in the MHD essential oil, while *E*-(β)-ocimene was most abundant in the essential oil obtained by HD. In the HD hydrolate, 10-(acetylmethyl)-3-carene and benzacetaldehyde dominated, while terpinen-4-ol was present with the highest proportion in the MHD hydrolate. In the SD hydrolate, terpinen-4-ol, (*Z*)-sabinene hydrate and (*E*)-sabinene hydrate stand out. The chemical composition of hydrolates differs from that of essential oil, both in terms of the type and number of different compounds that are absent in essential oils. From this study, it can be concluded that the isolation method has a great influence on the profile of rock samphire essential oils, and especially on the profile of compounds from hydrolates. Due to its valuable chemical composition, these by-products are valuable source of bioactive compounds with great potential for use in various industries.

Keywords: Rock samphire; distillation; essential oils; hydrolates; volatile compounds; GC-MS

Thesis contains: 39 pages, 16 figures, 2 tables, 74 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- | | |
|-----------------------------------------------|---------------|
| 1. Danijela Skroza, PhD, Assoc. Prof. | chair person |
| 2. Marijana Popović, PhD | co-supervisor |
| 3. Ivana Generalić Mekinić, PhD, Assoc. Prof. | supervisor |

Defence date: 7th July 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.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu i Zavodu za primijenjene znanosti Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić i komentorstvom dr. sc. Marijane Popović u razdoblju od veljače do srpnja 2023. godine.

Ovaj rad je u potpunosti financiran sredstvima projekta SEAFENNEL4MED (PRIMA 2021, Section 2) (<https://seafennel4med.com/>).

Dio opreme korištene u ovom radu financiran je iz projekta EU „Funkcionalna integracija Sveučilišta u Splitu, PMF-ST, PFST te KTF-ST kroz razvoj znanstveno-istraživačke infrastrukture u Zgradi tri fakulteta“, KK. 01.1.1.02.0018

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić i komentorici dr. sc. Marijani Popović na vodstvu, iznimnoj susretljivosti, pomoći i ukazanom povjerenju.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci tijekom školovanja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Izolirati eterična ulja motra različitim postupcima destilacije,
- Izolirati hlapive spojeve hidrolata motra mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi,
- Odrediti kemijski profil eteričnih ulja dobivenih različitim postupcima destilacije,
- Odrediti kemijski profil hlapivih spojeva hidrolata dobivenih različitim postupcima destilacije.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je istražiti učinke različitih metoda izolacije na kemijski sastav eteričnih ulja motra (*Crithmum maritimum* L.) te na sastav hlapivih spojeva prisutnih u hidrolatima, a koji zaostaju kao nusprodukt izolacije eteričnog ulja. Korištene su konvencionalne metode destilacije, vodena destilacija (HD) i parna destilacija (SD) te moderna „zelená“ metoda, mikrovalovima potpomognuta destilacija (MHD). Izolacija hlapivih spojeva hidrolata izvršena je mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (HS-SPME). Za odvajanje i identifikaciju kemijskih sastojaka eteričnih ulja i hidrolata korišten je spregnuti sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS). Eterična ulja dobivena parnom destilacijom imala su veći udio terpinena-4-ol, γ -terpinena i limonena nego što je kod vodene destilacije i mikrovalovima potpomognute destilacije. Sabinen je u najvišem udjelu bio prisutan u eteričnom ulju dobivenom pomoću mikrovalovima potpomognute destilacije, dok je *E*-(β)-ocimen najviše zastupljen u eteričnom ulju dobivenom pomoću vodene destilacije. U hidrolatima dobivenim vodenom destilacijom dominantni spojevi su 10-(acetilmetil)-3-karen i benzacetaldehid, dok je terpinen-4-ol s najvišim udjelom zastupljen u hidrolatima zaostalima nakon mikrovalovima potpomognute destilacije. U hidrolatima dobivenim parnom destilacijom ističu se terpinen-4-ol, (*Z*)-sabinen hidrat i (*E*)-sabinen hidrat. Kemijski sastav hidrolata razlikuje se od sastava eteričnog ulja, kako po vrsti, tako i po broju različitih spojeva kojima eterična ulja u odnosu na hidrolate oskudijevaju. Iz ovog istraživanja može se zaključiti da je metoda izolacije imala velik utjecaj na profile eteričnog ulja motra, a posebice na profile spojeva hidrolata. Zbog svog vrijednog kemijskog sastava ovaj nusprodukt može biti isplativ izvor bioaktivnih spojeva koji imaju veliku potencijal za korištenje u raznim industrijama.

Ključne riječi: motar; destilacija; eterična ulja; hidrolati; hlapivi spojevi; HS-SPME; GC-MS

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the effects of different methods of isolation on the chemical composition of essential oils of rock samphire (*Crithmum maritimum* L.) and on the composition of volatile compounds present in hydrolates, which remain as a byproduct of essential oil isolation. Conventional distillation methods, water distillation (HD) and steam distillation (SD) and a modern "green" method, microwave assisted distillation (MHD), were used. Isolation of volatile compounds from hydrolates was performed by solid phase microextraction (HS-SPME). A coupled system of gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) was used to separate and identify the chemical components of essential oils and hydrolates. The essential oils obtained by steam distillation had a higher proportion of terpinene-4-ol, γ -terpinene and limonene than in water distillation and microwave-assisted distillation. Sabinene was present in the highest proportion in the essential oil obtained by microwave-assisted distillation, while *E*-(β)-ocimene was the most abundant in the essential oil obtained by water distillation. In the hydrolates obtained by water distillation, the dominant compounds are 10-(acetylmethyl)-3-carene and benzacetaldehyde, while terpinen-4-ol with the highest proportion is present in the hydrolates remaining after microwave-assisted distillation. In the hydrolates obtained by steam distillation, terpinen-4-ol, (*Z*)-sabinene hydrate and (*E*)-sabinene hydrate stand out. The chemical composition of hydrolates differs from the composition of essential oil, both in terms of type and number of different compounds that essential oils lack, compared to hydrolates. From this research, it can be concluded that the isolation method had a great influence on the profiles of the essential oil of rock samphire, and especially on the profiles of the compounds from hydrolates. Due to its valuable chemical composition, this by-product can be a profitable source of bioactive compounds that have great potential for use in various industries.

Keywords: Rock samphire; distillation; essential oils; hydrolates; volatile compounds; HS-SPME; GC-MS

SADRŽAJ:

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| UVOD..... | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. Eterična ulja | 2 |
| 1.1.1. Metode izolacije eteričnih ulja | 3 |
| 1.1.1.1. Vodena destilacija..... | 4 |
| 1.1.1.2. Parna destilacija | 6 |
| 1.1.1.3. Mikrovalovima potpomognuta destilacija | 7 |
| 1.1.2. Hidrolat..... | 8 |
| 1.1.3. Izolacija hlapivih spojeva iz hidrolata | 9 |
| 1.2. Analiza hlapivih spojeva eteričnog ulja | 11 |
| 1.3. Eterično ulje motra kao predmet znanstvenog istraživanja..... | 12 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 2.1. Biljni materijal | 15 |
| 2.2. Izolacija eteričnih ulja..... | 15 |
| 2.3. Kemikalije i aparature za destilaciju | 16 |
| 2.3.1. Vodena destilacija..... | 16 |
| 2.3.2. Parna destilacija..... | 18 |
| 2.3.3. Mikrovalovima potpomognuta destilacija..... | 19 |
| 2.4. Izolacija hlapivih spojeva hidrolata | 20 |
| 2.5. Određivanje profila hlapivih spojeva plinskom kromatografijom- spektrometrijom masom | 20 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 22 |
| 3.1. Profili identificiranih spojeva eteričnih ulja | 22 |
| 3.2. Profili identificiranih hlapivih spojeva hidrolata | 26 |
| 4. ZAKLJUČAK | 31 |
| 5. LITERATURA | 32 |

UVOD

Motar (*Crithmum maritimum* L.), koji se naziva još petrovac ili morski komorač, samonikla je halofitna biljka izražene arome i ugodnih senzorskih svojstava zbog čega se učestalo koristi u prehranbene svrhe u većini mediteranskih zemalja. Kao jedna od aromatičnih i ljekovitih biljaka, koja pripada obitelji Apiceae, motar i njegovi metaboliti su zbog svojih pozitivnih bioloških svojstava od velikog industrijskog značaja. Ova biljna vrsta raste na kamenitim morskim liticama izloženim utjecajem posolice na atlantskim obalama Europe, Sredozemlja i Crnog mora, na otocima Azorima, Madeiri i Kanarima te na obalama sjeverozapadne Afrike i zapadne Azije. Motar ima veliku primjenu u kulinarstvu, narodnoj medicini te kozmetici. Budući da je vrlo aromatičan, široko se konzumira u mnogima europskim zemljama kao predjelo, prilog, dodatak jelima ili začim. Također je poznato njegovo korištenje u narodnoj medicini kao tonik, karminativ, diuretik, protuupalno sredstvo te u liječenju glista. Eterična ulja su izolati hlapljivih metabolita, obično dobiveni destilacijom različitih biljnih materijala i od davnina se koriste za konzerviranje hrane, u tradicionalnoj medicini i kozmetici. Hidrolati, također poznati kao hidrosoli, cvjetne, destilirane ili aromatske vodice nastaju kao nusproizvod procesa izolacije eteričnih ulja destilacijom, te je i njihova primjena u različitim industrijama poznata dugi niz godina. Motar je biljka koja obiluje eteričnim uljem koje se koristi u različite svrhe. Posljednjih godina broj istraživanja na temu eteričnog ulja motra eksponencijalno raste, ali još uvijek postoji mali broj studija koje se bave karakterizacijom nusproizvoda njegove izolacije. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti učinak primijene različitih metoda izolacije eteričnog ulja motra, i to vodene destilacije (HD), parne destilacije (SD) i mikrovalne destilacije (MHD) na kemijski profil eteričnog ulja i pripadajućih hidrolata.

1. OPĆI DIO

1.1. Eterična ulja

Vrlo je teško definirati kada je izolirano prvo eterično ulje jer drevni spisi koji govore o ljekovitim destiliranim vodama ne opisuju točno postupak koji se koristio pri njihovoj pripravi. Levey u svom radu *Evidences of Ancient Distillation, Sublimation and Extraction in Mesopotamia* objašnjava kako postoje zapisi o loncu dvostrukog ruba s kraja IV. tisućljeća prije nove ere koji se mogao koristiti za destilaciju. U djelu *Histoire de la chimie*, Hofer navodi kako Zosim Panopolitski detaljno opisuje destilatore koje je vidio u Memfisu u Egiptu i time nam ostavio prvi jasan pisani trag o upotrebi destilatora čiji je koncept ostao živući do današnjih dana. U djelu *De distillationibus* opisuje se napredak tehnologije destilacije jer je uveden proces polagane kondenzacije, i što je najbitnije, klasičan izgled uzvojnice koja je omogućila bolju izmjenu topline i učinkovitiju kondenzaciju. Porta prvi spominje pojam frakcijske destilacije, odnosno sami izlazi cijevi su bili postavljeni na nejednakim visinama, a najviša cijev je davala najfiniju esenciju. To je kasnije otvorilo vrata saznanjima o nejednakim svojstvima destilacije pojedinih komponenata eteričnih ulja. Prvi temeljitiji zapis koji datira iz 9. stoljeća opisuje proces destilacije i seže iz razdoblja kada su Arapi donijeli eterična ulja u Europu.¹ Tek u 16. stoljeću, pojam eteričnih ulja i masnih ulja, kao i metode za odvajanje esencija od aromatičnih voda, postali su dobro poznati. U tom su vremenu eterična ulja komercijalizirana u industrijske, terapijske i kozmetičke svrhe, a do kraja 19. stoljeća kemičari su uspjeli izolirati, odvojiti i reproducirati aktivne molekule eteričnih ulja.² Današnji pojam eteričnog ulje potječe iz 16. stoljeća i proizlazi iz lijeka *Quinta Essentia*, nazvan od strane Paracelsus von Hohenheim³, koji je smatrao da cilj svake destilacije upravo treba biti ekstrakcija i izolacija *Quinta Essentia* kao najsublimiranije tvari.

Eterična ulja su tekući izolati biljnog podrijetla koji sadrže složene mješavine hlapljivih i aromatičnih spojeva. Tradicionalno se ekstrahiraju iz biljnih materijala destilacijom gdje su biljke izložene pari koja nastaje "in situ" ili „ex situ". Tijekom ovog procesa, spojevi eteričnog ulja se oslobađaju iz biljnog materijala isparavanjem te se izdvajaju u struji vodene pare. Nastala parna smjesa eteričnog ulja i vode se potom

kondenzira, a dobiveno eterično ulje se odvajava od vode na temelju njihove razlike u gustoći.⁴ Eterična ulja su stoga hlapljive tekućine karakterističnog mirisa, netopljive u polarnim otapalima kao što je voda, i topljiva u nepolarnim otapalima, poput etera i alkohola.

Sastav eteričnih ulja vrlo je složen, te se često u eteričnim uljima nalazi više od 200 spojeva. Obično sadrže derivate fenilpropana ili terpene (koji imaju minimalne strukturne i kemijske razlike)⁵ te se mogu podijeliti u dvije frakcije, hlapljivu i nehlapljivu. Hlapljiva frakcija čini 90–95% ukupne težine ulja, a od kemijskih spojeva obično sadrži monoterpene, seskviterpene i njihove oksigenirane derivate te alifatske alkohole, estere, aldehide i ketone. Nehlapljivi ostatak čini 1-10% ukupne mase eteričnog ulja i čine ga masne kiseline, ugljikovodici, steroli, voskovi, flavonoidi i karotenoidi.¹³

Spojevi eteričnih ulja u biljkama služe kao kemijski signali koji omogućuju da biljka kontrolira i regulira svoj okoliš (ekološka uloga) na način da odbija predatore, privlači kukce za oprašivanje, spriječava klijanje sjemena i sudjeluje u komuniciranju između različitih biljnih jedinki. Eterična ulja posjeduju stoga insekticidna i antifungalna svojstva te su prisutna u različitim dijelovima biljke kao što su cvijeće, lišće, rizomi, korijenje, sjemenke, plod, te u drvu i kori.⁶

1.1.1. Metode izolacije eteričnih ulja

Općenito, metode izolacije eteričnih ulja mogu se podijeliti u dvije skupine. Prva skupina su konvencionalne (tradicionalne) metode u koje se ubraja HD, SD te hladno prešanje (u slučaju ulja kore citrusa). Drugu skupinu čine moderne (inovativne) tehnike u koju spadaju MHD, mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija, superkritična tekućinska ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i druge.^{7,8}

Od navedenih metoda izolacije eteričnih ulja najčešće se koriste HD, SD i MHD. MHD ima brojne prednosti poput korištenja vode kao zelenog ekstrakcijskog otapala te je ekološki prihvatljiva, jeftina, netoksična i nezapaljiva.⁹ HD i SD su vrlo jednostavni i jeftini postupci koji se koriste učestalo za industrijsku proizvodnju eteričnih ulja. Oba postupka su ekološki prihvatljiva jer ne traže upotrebu organskih otapala, a negativne značajke su im dugo trajanje procesa izolacije i velika potrošnja energije. Osim toga, visoke temperature i produljeno vrijeme ekstrakcije mogu potencijalno uzrokovati gubitke ili modifikacije komponenata eteričnih ulja. MHD je pak skuplja tehnika zbog

troškova same opreme, ali su trajanje ekstrakcije i potrošnja energije znatno niži, dok je konačni prinos izoliranog ulja obično viši. MHD ima smanjen utjecaj na okoliš budući da ne koristi otapala i karakterizira ju niža emisija CO₂, stoga se smatra prikladnijom za laboratorijska istraživanja.^{8,10-12}

Tijekom izolacije eteričnih ulja nastaju četiri glavna proizvoda: eterično ulje kao glavni proizvod i nusproizvodi u koji se ubrajaju hidrolat, destilacijske rezidualne otpadne vode i rezidualni biljni materijal (komina).¹³⁻¹⁶ Otpadna voda koja zaostaje nakon HD i MHD biljnog materijala rezultat je izravnog kontakta (uranjanja) biljke s vodom, dok je kod SD ista rezultat kondenzacije vruće pare koja prolazi kroz nju. U svim slučajevima, zbog karakterističnog načina ekstrakcije, hidrolat sadrži i različite hlapljive komponente topljive u vodi, među kojima su najvažniji fenoli.^{13,17}

U posljednjih nekoliko desetljeća razvijene su nove tehnike ekstrakcije eteričnih ulja koje rezultiraju njegovom većom kvalitetom te optimiziraju vrijeme, prinos i troškove proizvodnje. Slijedeći principe zelene tehnologije obrade biljnog materijala, MHD privukla je posebnu pozornost zbog svog jedinstvenog mehanizma zagrijavanja. Dok se prijenos topline kod HD unutar uzoraka odvija konvekcijom i kondukcijom, kod MHD osim kondukcijom i konvekcijom prijenos topline odvija se i zračenjem, što značajno ubrzava sam proces.¹²

1.1.1.1. Vodena destilacija

HD zahtijeva duže trajanje ekstrakcije, no ipak se najučestalije koristi u industrijskoj proizvodnji eteričnih ulja zbog jednostavnosti izvedbe uređaja. HD spada u tradicionalne metode izolacije eteričnog ulja te je jedna od najstarijih metoda izolacije.¹⁸ Kod HD ulja isparavaju uz zagrijavanje vode ili nekog drugog otapala i biljnog materijala koje je praćeno ukapljivanjem pare u kondezatoru.

Postrojenje za destilaciju sastoji se od kondenzatora i dekantera za skupljanje kondezata i za odvajanje eteričnih ulja iz vode. Princip destilacije temelji se na izotropnoj destilaciji, a voda i ulje se nakon kondenzacije odvajaju temeljem njihovih različitih gustoća.

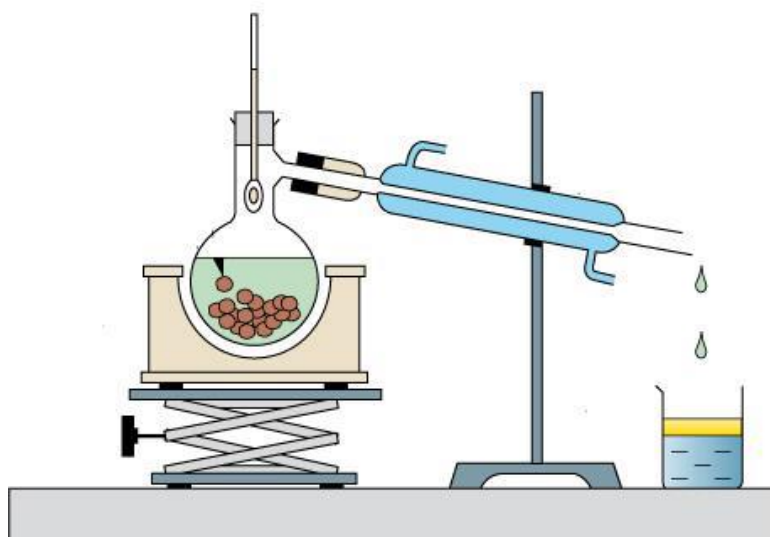
Postoje tri izvedbe HD:

- uranjanjem biljnog materijala u vodu,
- izravnim ubrizgavanjem pare,

- kombinacijom navedenih postupaka.

Destilacijsko vrijeme ovisi o korištenom biljnom materijalu. Produljena destilacija vrlo često rezultira neznatno višom količinom izoliranog eteričnog ulja, ali često i neželjenim spojevima s visokim vrelištem i oksidiranim spojevima.⁷

HD se danas rijetko koristi za ekstrakciju eteričnog ulja, a njena upotreba u razvijenim zemljama je često i ograničena. Kod ovog procesa može doći do pregrijavanja materijala što rezultira proizvodnjom eteričnih ulja s mirisom „spaljenog“.² Također, kao posljedica razgradnje spojeva reakcijom hidrolize, uzrokovane kombiniranim djelovanjem vode i visoke temperature često nastaju i novi, nepoželjni hlapljivi spojevi.¹⁹

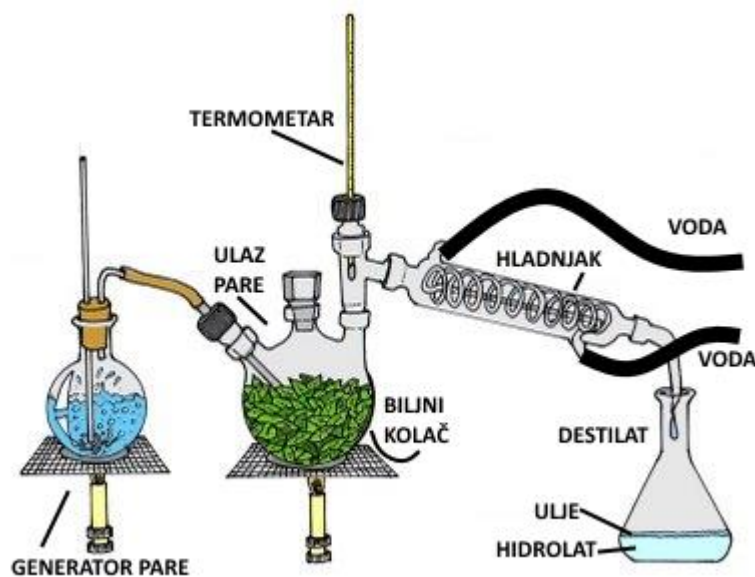


Slika 1. Shematski prikaz vodene destilacije²⁰

1.1.1.2. Parna destilacija

Kod SD voda se zagrijava u zasebnom odjeljku, a nastala para prolazi kroz biljni materijal koji se nalazi u drugom odjeljku aparature. Para djeluje kao sredstvo koje razbija pore sirovine i oslobađa eterično ulje, a navedena smjesa ulja i pare se potom kondenzira.²¹ SD obično rezultira većim prinosom eteričnih ulja nego li je to slučaj kod HD.

SD je tip destilacije koji se koristi za biljke osjetljive na temperaturu. Nekada je bila popularna laboratorijska metoda za pročišćavanje organskih spojeva, a danas je još uvijek značajna u određenim granama industrije.²² SD jedna je od starih i službeno odobrenih metoda za izolaciju eteričnih ulja iz različitih biljnih materijala. Načelo ove tehnike je da se kombinirani tlak pare izjednači s tlakom okoline pri oko 100 °C tako da hlapljive komponente s vrelištem u rasponu od 150 do 300 °C mogu ispariti. Ova tehnika također se može provoditi i pod pritiskom, ovisno o težini ekstrakcije eteričnih ulja.⁷



Slika 2. Shematski prikaz parne destilacije²³

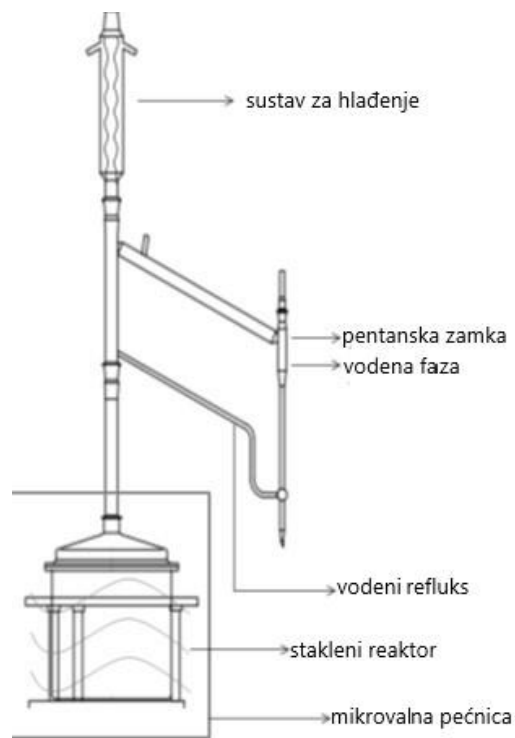
1.1.1.3. Mikrovalovima potpomognuta destilacija

MHD kao metoda izolacije eteričnih ulja temelji se na fizikalnim mehanizmima dielektričnog zagrijavanja i rotacije dipola. Provodi se unutar mikrovalnih pećnica u kojima djeluju elektromagnetski valovi frekvencija između 0,3 i 300 GHz, dok se u komercijalnim sustavima obično koristi frekvencija od 2,45 GHz.^{24,25} U prisutnosti električnog polja generiranog mikrovalnim zračenjem, polarne molekule počinju vibrirati tako da su dipoli molekula usklađeni s električnim poljem.¹⁹ Opisana vibracija molekula uzrokuje ravnomjerno zagrijavanje materijala.²⁶ Zbog zagrijavanja, unutar stijenke biljnih stanica pojavljuje se veliki pritisak koji uzrokuje njihovo pucanje. Kao rezultat toga, oslobađaju se sastojci unutar stanica u medij za ekstrakciju, te se olakšava prodor otapala u biljnu matricu što dovodi do brže ekstrakcije.¹⁹ Otapala s niskom viskoznošću pospješuju ekstrakciju, jer niža viskoznost medija olakšava molekularnu rotaciju koja pogoduje mikrovalnom mehanizmu grijanja.²⁴ Primjena MHD u postupcima separacije i ekstrakcije rezultira skraćivanjem vremena ekstrakcije i smanjenjem volumena korištenog otapala, što ima i iznimno pozitivan utjecaj na okoliš jer se smanjuje emisija CO₂ u atmosferu^{27,28} i troši znatno manje energije.²⁹

Prema Ferhartu i sur.¹⁰ postoje dva glavna mikrovalna mehanizma uključena u izolaciju eteričnog ulja. Prvi mehanizam temelji se na selektivnom zagrijavanju vode unutar matrice uzorka gdje mikrovalovi stupaju u interakciju sa slobodnim molekulama vode raspoređenim u vaskularnim sustavima i biljnim žlijezdama koje se uslijed toga šire. To dovodi do pucanja tkiva i ekstrakcije uljnih komponenti u vodenu fazu. Drugi mehanizam povezan je s dipolnim momentima organskih spojeva eteričnog ulja koji mogu apsorbirati mikrovalnu energiju. Spojevi s visokim dipolnim momentom bit će lakše ekstrahirani jer su u snažnijoj interakciji s mikrovalovima u usporedbi s onima s niskim dipolnim momentom.

Općenito, MHD se može izvoditi na dva načina. Kod prvog načina koristi se zatvoreni spremnik u kojem se ekstrakcija vrši pri kontroliranom tlaku i temperaturi, dok se u drugom slučaju izvodi u otvorenoj posudi pri atmosferskom tlaku. Zatvoreni sustav MHD obično se koristi za ekstrakciju u intenzivnim uvjetima, kao što je visoka temperatura ekstrakcije i pod pritiskom. Kod ovog sustava tlak u posudi ovisi o volumenu i točki vrenja otapala. S druge strane, sustav otvorenih posuda ima maksimalnu temperaturnu točku vrenja otapala pri atmosferskom tlaku.²⁶

Prinos MHD ovisi o nekoliko čimbenika, kao što su dielektrična osjetljivost otapala i matrice, koncentracija otapala, veličina čestica, temperatura, vrijeme ekstrakcije i primjenjena snaga mikrovalova. Upotreba mikrovalnih pećnica skraćuje vrijeme ekstrakcije, povećava prinos, smanjuje količinu korištenih otapala i štiti termolabilne sastojke.²⁵



Slika 3. Shematski prikaz mikrovalovno potpomognute destilacije³⁰

1.1.2. Hidrolat

Obzirom da izolirano eterično ulje ostaje u kontaktu s vodom neko vrijeme, tijekom svih navedenih metoda izolacije, različiti hidrofilni hlapljivi spojevi koji imaju sposobnost stvaranja vodikovih veza s vodom, dijelom prelaze u vodenu fazu koja se naziva hidrolat. Sadržaj hlapivih aromatskih spojeva eteričnih ulja u hidrolatima obično je ispod 1 g/L i oni uglavnom sadrže oksigenirane spojeve zbog njihove topljivosti u vodi. Hidrolate stoga također odlikuju specifičan okus, miris i organoleptička svojstva.^{6,14,31}

U posljednje vrijeme hidrolati su stekli veliku popularnost u kozmetici, prehrambenoj industriji, tradicionalnoj medicini, farmaciji i aromaterapiji.^{14,31-33} Zbog

toga je i patvorenje hidrolata vrlo često, pa je i njihova kontrola kvalitete postala od velike važnosti.^{34,35}

Hidrolati se također tradicionalno koriste u razrijeđenom obliku u proizvodnji različitih osvježavajućih pića.³⁶ Njihova se popularnost može pripisati njihovom bogatom kemijskom sastavu, kao i sigurnosti uporabe. Obično nemaju jak miris koji može uzrokovati nuspojave poput glavobolje ili kontaktnog dermatitisa, pa se smiju nanositi izravno na kožu ili konzumirati.³⁶ Unatoč njihovoj širokoj uporabi u mnogim gospodarskim granama, njihov sastav i svojstva još uvijek nisu dovoljno istraženi.

Snažna antioksidativna svojstva hidrolata razlog su njihove učestale primjene u kozmetologiji, u borbi protiv starenja kože ili prirodne prevencije i liječenja kožnih bolesti, kao i u prehrambenoj industriji. Prepoznati su i kao učinkoviti inhibitori tirozinaze, glavnog enzima odgovornog za tamnjenje voća i povrća.³⁷ Zbog velikog antioksidativnog potencijala, hidrolati imaju sposobnost inhibirati procese oksidacije, čime se potencijalno produljuje rok trajanja hrane ili kozmetičkih proizvoda.³⁶ Također su se pokazali prikladnima za dezinfekciju alata, strojeva i radnih površina koji se koriste u procesu pripreme hrane.^{6,36}

1.1.3. Izolacija hlapivih spojeva iz hidrolata

Za izolaciju hlapivih spojeva iz nekog uzorka potrebno je poznavati metode koje se mogu koristiti kako bi se odabrala najoptimalnija. Općenito, iste dijelimo u nekoliko skupina, pa razlikujemo:

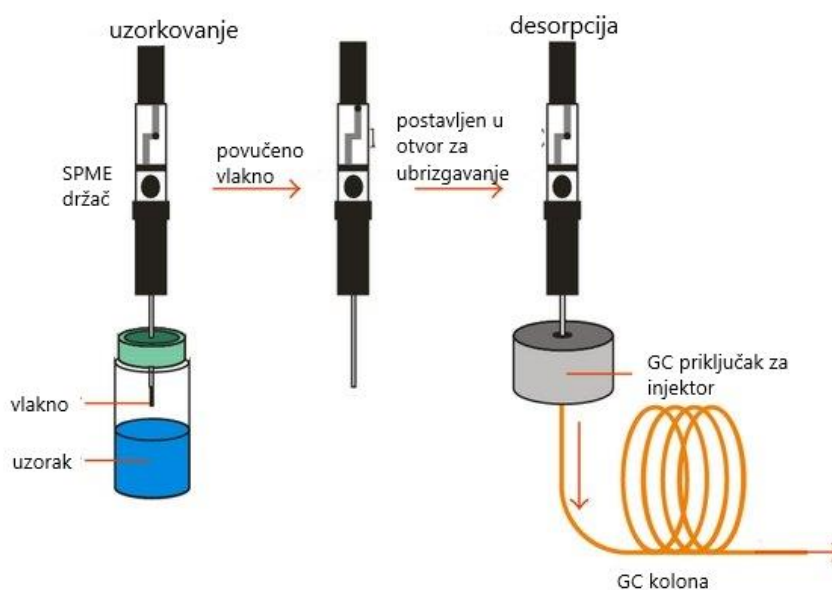
- ekstrakcije otapalima,
- tehnike “vršnih” para,
- sorpcijske tehnike.³⁸

Ekstrakcija predstavlja metodu pročišćavanja i izolaciju neke tvari iz suspenzije, otopine, emulzije ili krute smjese pomoću otapala, te je kod ovog postupka najvažniji čimbenik izbor samog otapala. Neka od najkorištenijih otapala su etanol, aceton, heksan i dietil-eter.³⁹

Vršne pare predstavljaju skupni naziv za najhlapljivije spojeve koji se nalaze u ravnoteži s uzorkom. Tehnike izolacije (uzorkovanja) i analize vršnih para su separacijske tehnike kojima se lakohlapljivi sastojci odvajaju iz složenog matriksa te se potom analiziraju plinskom kromatografijom.⁴⁰

Dvije su vrste sorpcijskih tehnika: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi te sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću. Obje se temelje na raspodijeli spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma na koji se hlapljivi spojevi skupljaju.⁴¹

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) je brza, ekonomična i svestrana metoda pripreme uzorka bez korištenja otapala. Vlakna na kojima su adsorbirani analiti od interesa obložena su polimernim materijalom, u nekim slučajevima pomiješana s čvrstim adsorbentom. SPME ne zahtjeva uporabu otapala, a hvata hlapljive i nehlapljive spojeve iz uzoraka. Metodu odlikuju smanjeno vrijeme pripreme uzorka, minimalna uporaba otapala, vlakna su ekonomična, višekratna (prosječno 100 ekstrakcija po vlaknu) i univerzalna za bilo koju vrstu plinskog ili tekućeg kromatografa.



Slika 4. Princip djelovanja mikroekstrakcije na čvrstoj fazi ⁴²

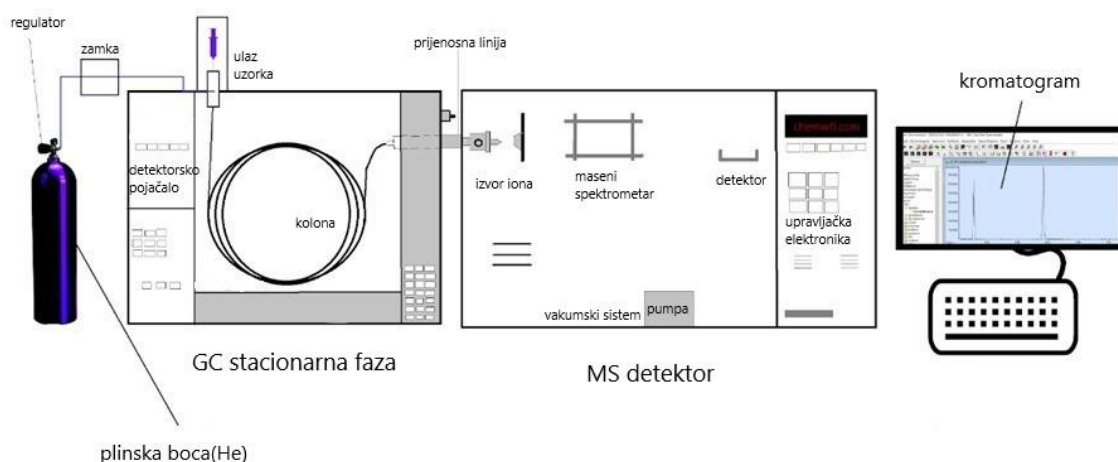
1.2. Analiza hlapivih spojeva eteričnog ulja

U hlapljive spojeve eteričnog ulja spadaju spojevi različitih polarnosti od kojih dominiraju terpeni (monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni i triterpeni) i terpenoidi, fenilpropanoidi te razni drugi spojevi. Sastojke eteričnog ulja razlikujemo prema molekulskoj masi pa ih prema tome dijelimo na poluhlapive spojeve, hlapive spojeve i plinove. Oni koji se prvi izoliraju iz biljnog materijala su lako hlapivi spojevi jer imaju nisku molekulsku masu. Međutim, moguća je degradacija tih spojeva kod dugotrajnih izolacija ili uslijed primjene visokih temperatura.⁴³ Kako bi se povećao prinos i sama kvaliteta eteričnog ulja ključan dio provedbe samog procesa predstavlja optimiziranje uvjeta izolacije.⁴⁴

Instrumentna metoda koja se pokazala najboljom za analizu hlapivih spojeva je plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). GC-MS je analitička metoda koja objedinjuje plinsku kromatografiju (odjeljuje pojedine komponente uzorka i kvantificira ih) i spektrometriju masa (identificira svaku od komponenata pojedinačno). Povezivanje tih dviju tehnika povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost čime se omogućuje učinkovita kvalitativna i kvantitativna analiza složenih smjesa spojeva. Ovu tehniku karakterizira visoka osjetljivost, pouzdanost, preciznost, selektivnost i male količine uzoraka potrebne za analizu, što ju čini jednom od najkorištenijih instrumentalnih tehnika u analitičkim laboratorijima.

Konfiguracija GC-MS sustava sastavljena je od tri glavne komponente: jedinice za ubrizgavanje uzorka koja zagrijava tekući uzorak i isparava ga, kolone koja se koristi za odvajanje spojeva te detektora koji otkriva spojeve i prikazuje njihove koncentracije u vidu električnih signala.⁴⁵ Analiza započinje u plinskom kromatografu, pri čemu se uzorak unosi pomoću injektora (ručnoga ili automatskoga) u kojemu se prvo prevodi u plinovito stanje zagrijavanjem, a potom nošen strujom mobilne faze (plin-nosač) odlazi do stacionarne faze u koloni gdje dolazi do međusobne interakcije uzorka i stacionarne faze. Plin nosač je inertan i koristi se za prijenos uzoraka, a u većini slučajeva je to helij. Osnovni mehanizam masenog spektrometra ,pri analizi nekog uzorka, je stvaranje plinovitih iona tog uzorka(električnom ionizacijom) te tako nastaju pozitivni ioni u ionizacijskoj koloni. Bombardiranje snopom elektrona visoke energije dolazi do izbacivanja elektrona iz molekule, a potom nastajanja molekuskog iona.. Nastali pozitivni ioni se ubrzavaju te ulaze u magnetno polje koje se nalazi u polukružnoj cijevi.

Podaci odlaze u računalo, a rezultati se bilježe kao funkcija omjera mase i naboja iona te nastaje zapis koji se naziva spektrogramom masa.⁴⁶



Slika 5. Sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa ⁴⁷

1.3. Eterično ulje motra kao predmet znanstvenog istraživanja

Provedena su mnoga istraživanja eteričnog ulja motra prikupljenog na različitim lokacijama u svrhu analize njegovog kemijskog sastava.

Pateira i sur.⁴⁸ analizirali su eterična ulja portugalskog motra izolirana iz različitih dijelova biljke tijekom tri faze životnog ciklus (vegetativni, cvjetanje i plodonošenje) u istoj populaciji. Eterična ulja izolirana su iz divljih jedinki koje spontano rastu na pet lokacija diljem zapadne obale Portugala. Glavne komponente analiziranih eteričnih ulja bile su dilapiol (15-47%), sabinen(7-22%), γ -terpinen (17-35%) i timol metil eter (10-18%), a najviši prinosi eteričnog ulja zabilježeni su u razdoblju cvatnje i plodonošenja.

Baser i sur.⁴⁹ analizirali su eterično ulje motra iz Turske dobiveno HD. Dobiveni rezultati pokazali su da su sabinen (26,9%), limonen (24,2%) i γ -terpinen (19,3%) prisutni kao najzastupljeniji spojevi. U usporedbi s prethodno objavljenim rezultatima drugih autora, metil timol je bio prisutan samo u tragovima, a metil izotimol je prvi put detektiran u eteričnom ulju motra.

Ruberto i sur.⁵⁰ proučavali su eterično ulja motra sa Sicilije. Kemijski sastav ulja pokazuje da su monoterpenski ugljikovodici zastupljeni s udjelom od 56,73%, a

oksigenirani monoterpeni sa 26,11%. Dominantni spojevi bili su timol metil eter (25,5%), γ -terpinen (22,9%) i limonen (22,3%).

Senatore i sur.⁵¹ istraživali su kemijski sastav eteričnog ulja motra prikupljenog na dvije lokacije u Turskoj. Ulje je izolirano HD i dobiven je prinos bio između 0,17 i 0,19%. Kao i u prethodnim studijama, monoterpeni su bili glavne komponente. Ulje dobiveno iz biljaka sakupljenih u Antaliji pokazalo je da su β -felandren (30%), (Z)- β -ocimen (14%) i *p*-cimen (13%) najzastupljeniji monoterpeni ugljikovodici, dok je ulje dobiveno iz biljaka koje rastu u Mersinu imalo značajne količine β -felandrena (14%), γ -terpinena (24%) i sabinena (12%). Glavna fenolna komponenta kod biljke ubrane u Antaliji bila je timol metil eter (25%), dok se kod motra ubranog u Mersinu isticao dilapiol (21%).

Ozcan i sur.⁵² proučavali su sastav i sadržaj eteričnog ulja motra iz Turske. Uzorci su klasificirani u skupine prema glavnim komponentama u kojima prevladavaju sabinen (0,1-20,5%), γ -terpinen (8,2-35,2%), metil timol (7,7-29,8%) i terpinen-4-ol (0,4-21,2%), (Z)- β -ocimen (12,2%) i spatulenol (8,4%). Rano sakupljene biljke s obzirom na vegetaciju dale su ulje bogato *p*-cimenom, a smrzavanje biljke nije imalo značajan učinak na sastav ulja.

U svojoj drugoj studiji Ozcan i sur.⁵³ proučavali su sastojke eteričnog ulja prikupljenog u Turskoj na dvije lokacije te su ulja izolirana HD iz svježih nadzemnih dijelova motra. Ulja su sadržavala uglavnom monoterpena sa udjelom od 89,0% do 99,6%, te su γ -terpinen (32-36%), β -felandren (21-22%) i sabinen (9-13%) bili glavne komponente.

Kulišić-Bilušić i sur.⁵⁴ su ispitivali eterično ulje hrvatskog motra. Eterična ulja su izolirana HD, a rezultati su pokazali dominaciju limonena sa udjelom većim od 50%, iza kojeg slijedi sabinen sa 26,46%, terpinen-4-ol sa 5,59% i γ -terpinen sa 2,81%.

Jallali i sur.⁵⁵ ispitivali su varijabilnost eteričnih ulja motra iz dvije različite regije Tunisa te dokazali dominaciju monoterpenih ugljikovodika te oksigeneranih monoterpena. Timol metil eter na jednoj je lokaciji bio zastupljen sa udjelom od 20,62%, dok se u motru s druge lokacije nalazio u znatno većem udjelu (40,4%). Sadržaj γ -terpinena se kretao od 19,34 do 30,62%. Od ostalih spojeva još se istakao dilapiol koji je na jednom lokalitetu bio prisutan sa 40,25%, a na drugom lokalitetu, u kojem su u većoj mjeri bili prisutni timol metil eter i γ -terpinen, dilapiol je bio zastupljen sa samo 14,27%.

Nabet i sur.⁵⁶ određivali su kemijski sastav eteričnog ulja motra prikupljenog u Alžiru. Eterična ulja sadržavala su oko dvije trećine monoterpenkih ugljikovodika (65,3%) i jednu trećinu oksigeniranih monoterpena (33,7%). Glavni spojevi ulja bili su γ -terpinen (50,5%), timol metil eter (33,6%) i *p*-cimen (12,6%). Eterična ulja ovog istraživanja karakterizirala je odsutnost dilapiola. Uočene varijacije u sadržaju eteričnog ulja objašnjene su kao posljedica razlike u okolišnim čimbenicima i razdoblju berbe biljnog materijala.

Ozcan i sur.⁵⁷ uspoređivali su promjene kemijskog sastava eteričnog ulja motra tijekom procesa fermentacije tijekom kojeg se smanjio sadržaj sabinena (s 22,30% na 1,32%), limonena (s 12,08% na 7,45%) i α -pinena (s 7,08% na 3,51%), dok se razina β -felandrena (s 10,39% na 11,61%), (*Z*)- β -ocimena (s 8,59% na 9,17%), γ -terpinena (s 28,36% na 42,05%), karvakrol metil etera (s 2,56% na 8,64%) i terpinena-4-ola (s 1,22% na 2,81%) povećala.

Alves-Silva i sur.⁵⁸ analizirali su eterično ulje motra iz Portugala i njegovu rezidualnu vodu. Rezultati kemijske analize su pokazali su da su γ -terpinen (33,6%), sabinen (32,0%) i timol metil eter (15,7%) glavni spojevi eteričnog ulja.

D'Agostino i sur.⁵⁹ bazirali su svoje istraživanje na kemijski sastav i prinos eteričnog ulja motra prikupljenog u Italiji. U uzorcima od monoterpenkih ugljikovodika dominirao je β -mircen (13,66%), zatim je slijedio *p*-cimen (11,67%) te β -felandren (6,57%). Od prisutnih oksigeniranih monoterpena najzastupljeniji je bio timol acetat (14,38%), dok su ugljikovodici i oksigenirani seskviterpeni bili zastupljeni u jako malom udjelu.

Zafeirpoulou i sur.⁶⁰ proučavali su kemijski sastav motra prikupljenog u središnjoj Grčkoj. Glavni spojevi uzoraka s prve lokacije bili su sabinen (17,6%), γ -terpinen (17,5%), *p*-cimen (16,7%), β -felandren (15,5%), timol metil eter (9,3%), terpinen-4-ol (4,8%) i dilapiol (2,0%). Kod drugog uzorka isticao se β -felandren (30,9%), γ -terpinen (19,6%), sabinen (15,8%), timol metil eter (7,6%), terpinen-4-ol (4,8%) i dilapiol (0,1%).

Informacije o hlapivim spojevima hidrolata motra nisu pronađene u znanstvenoj literaturi.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovoga rada korišteni su nadzemni dijelovi listova motra (*Crithmum maritimum* L.) u fazi pune cvatnje, a sakupljeni su na obali otoka Čiova (43.493389 °N, 16.272505 °E, Srednja Dalmacija, Hrvatska) krajem kolovoza 2022. Uzorci biljnog materijala pohranjeni su u herbariju Zavoda za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Za izolaciju eteričnih ulja korišten je biljni materijal osušen na zraku (dva tjedna na sobnoj temperaturi, u zasjenjenom i prozračnom prostoru).



Slika 6. Uzorci, a), uzorak motra tijekom procesa sušenja b) osušeni uzorak motra

2.2. Izolacija eteričnih ulja

Eterična ulja motra izolirana su iz biljnog materijala korištenjem triju različitih metoda, uključujući HD, SD i MHD.

Ostaci vode iz izoliranih eteričnih ulja izdvojeni su dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata. Uzorci su pohranjeni pri -20°C do analize.

2.3. Kemikalije i aparature za destilaciju

Kemikalije:

- dietil-eter, Baker Analyzed, J.T. Baker, Fisher Scientific
- pentan, VWR chemicals, Pennsylvania, U.S.A.
- bezvodni natrijev sulfat, Kemika, Hrvatska
- destilirana voda

Aparature, uređaji, posude:

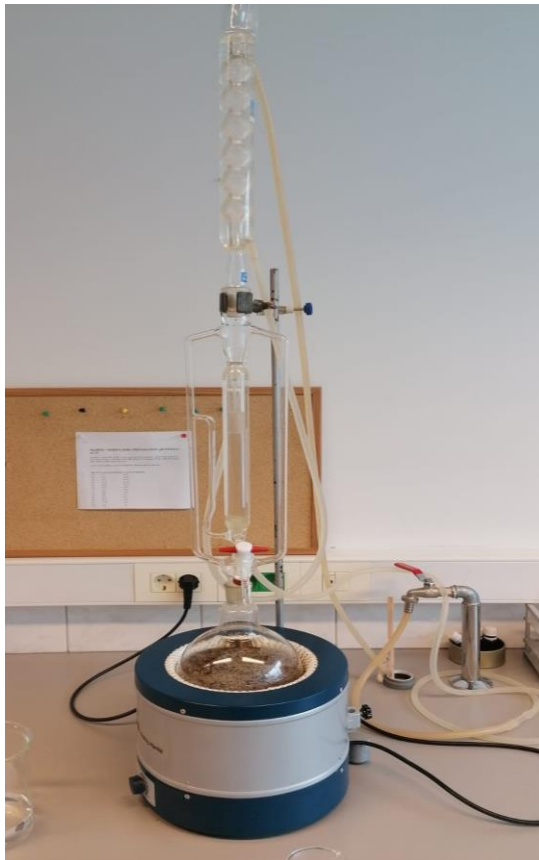
- modificirana aparatura po Clevengeru
- staklena aparatura za parnu destilaciju
- aparatura za mikrovalnu destilaciju, ETHOS X, Milestone, Sorisole, Italija
- kalote za zagrijavanje, LabHeat, Ru-Ve, Hrvatska
- plinski kromatograf, model 8890 GC (Agilent Inc., Santa Clara, Kalifornija, SAD) sa tandemskim spektrometrom masa (MS/MS) model 7000D GC/TQ (Agilent Inc.)
- tehnička vaga, Kern ALS 120-4, Inscale, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo
- tikvice s okruglim dnom
- kuglasta hladila

2.3.1. Vodena destilacija

HD princip je destilacije kod koje je biljni materijal uronjen u vodu. Postupak traje 3 h, što je najdulje od tri vrste destilacije korištene u ovom radu. Nakon što se biljni materijal odvaže (100 g), stavi su u tikvicu s okruglim dnom u koju se doda destilirana voda te se spoji aparatura po Clevengeru i hladilo (Slika 7). Kada voda dosegne temperaturu 100 °C započinje proces destilacije. Pare koje izlaze kondenziraju se u hladilu i sakupljaju u središnjem dijelu aparature. Središnja cijev je u donjem dijelu ispunjena destiliranom vodom, a u gornjem sloju su organska otapala (tzv. „trap“), odnosno smjesa otapala pentan:dietil-eter (1:3, v/v).

Kada kondenzirana smjesa vode i komponente eteričnog ulja prolazi kroz organsko otapalo, komponente eteričnog ulja se zadržavaju u njemu, a voda prolazi natrag u tikvicu. Vrijeme destilacije mjeri se od trenutka kada se prva kap destilata

kondenzira na vodenom hladilu. Nakon što je destilacija gotova, pomoću pipca se ispusti hidrolat, te eterično ulje izdvojeno u trap-u.



Slika 7. Vodena destilacija po Clevengeru

2.3.2. Parna destilacija

I za potrebe provedbe SD odvađan biljni materijal(100 g) se stavi u tikvicu s okruglim dnom pazeći da se prethodno stavi zaštitna mrežica kako isti ne bih dospio u kontakt s vodom. Na dno aparature postavi se podizač, zatim kalota tzv. grijača posuda u koju se postavi tikvica napunjena destiliranom vodom. Na aparaturu se postavi prenosni most te hladilo. Doda se ponovno mala količina smjese pentan i dietil-eter u omjeru 1:3 (trap) kako bi ulje lakše izdvojilo po završetku destilacije. Proces destilacije traje pola sata.



Slika 8. Parna destilacija

2.3.3. Mikrovalovima potpomognuta destilacija

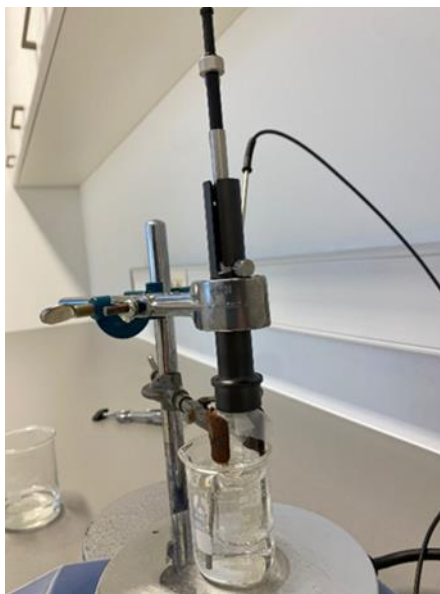
Kod ove destilacije izvagani biljni materijal(100 g) stavio se u tikvicu s okruglim dnom i dodala mu se mala količina vode. Zatim se na tikvicu povezao sustav za refluks i hladilo. U desnu se vertikalnu cijev napunila voda sve dok se ne počne prelijevati te se doda trap u kojem će se prikupiti eterično ulje. Proces destilacije započeo je nakon 10 min. Kod ove izolacije korištena je laboratorijska mikrovalna pećnica Milestone 'ETHOS X', opremljena višestranim mikrovalnim reaktorom od 2,45 GHz. Temperatura unutar pećnice pratila se vanjskim infracrvenim senzorom, destilacija se provodila pri atmosferskom tlaku tijekom 35 min pri 500 W (98 °C). Destilat je sakupljen u bočnu cijev, a po završetku destilacije su odvojeni eterično ulje i hidrolat.



Slika 9. Mikrovalovima potpomognuta destilacija

2.4. Izolacija hlapivih spojeva hidrolata

U staklene vialne od 20 mL doda se 10 mL hidrolata i 0,5 g NaCl te se iste zapečate magnetskim poklopcem sa silikonskim septumom. Korišteno je SPME vlakno DVB/Carbon WR/PDMS/10, 50/30 μ m (Agilent Technologies, Palo Alto, Santa Clara, SAD) koje je umetnuto tijekom 30 min u prazni prostor vialne nad hidrolatom prethodno zagrijanim na 40 °C u vodenoj kupelji.



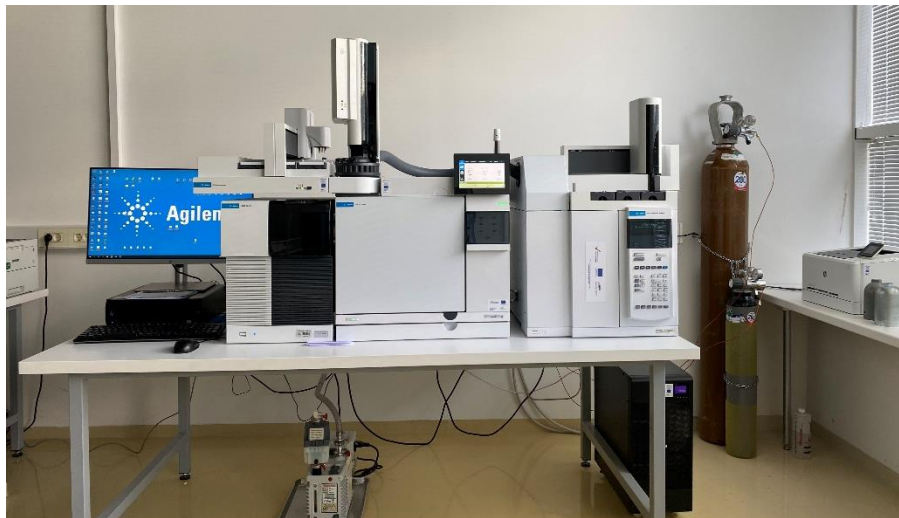
Slika 10. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

2.5. Određivanje profila hlapivih spojeva plinskom kromatografijom- spektrometrijom masom

Hlapivi spojevi u uzorcima određeni su pomoću plinskog kromatografa. Za odvajanje uzoraka korištena je nepolarna kolona HP-5MS UI, dimenzija 30 m dužine, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine stacionarne faze 0,25 μ m (Agilent Inc.). Početna temperatura analize hlapljivih spojeva iz eteričnih ulja bila je 60 °C tijekom tri minute, nakon čega se povisila na 246 °C brzinom 3 °C min⁻¹ te je ostala izotermalna tijekom 25 minuta. Ukupno trajanje analize iznosilo je 90 minuta.

Analiza hlapljivih spojeva u hidrolatu je provedena pomoću vlakna koje je umetnuto u GC injekcijski otvor za toplinsku desorpciju 3 minute. Početna temperatura pećnice započela je 3-minutnom izotermom na 40 °C nakon čega je uslijedilo povećanje temperature do 80 °C brzinom od 3 °C min⁻¹, te je nakon toga uslijedilo daljnje povećanje temperature brzinom od 10 °C min⁻¹ sve do 220 °C, gdje je držano 5 min. Ukupno trajanje ove analize iznosilo je 60 minuta. Svaki uzorak je analiziran tri puta.

Helij se koristio kao plin nosioc u obje analize, s brzinom protoka od 1 mL min⁻¹. Ionizacijski potencijal na ionizacijskom izvoru spektrometra masa bio je 70 eV. Spojevi su identificirani usporedbom vremena zadržavanja pikova (u odnosu na standardnu seriju *n*-alkana C9-C30 za VF-5MS kolonu) s podacima iz literature.⁶¹



Slika 11. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa (GC-MS)

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu korištene su tri vrste destilacije (HD, SD i MHD) za izolaciju eteričnog ulja i hidrolata motra te su identificirani najzastupljeniji spojevi u uzorcima korištenjem GC-MS tehnike.

3.1. Profili identificiranih spojeva eteričnih ulja

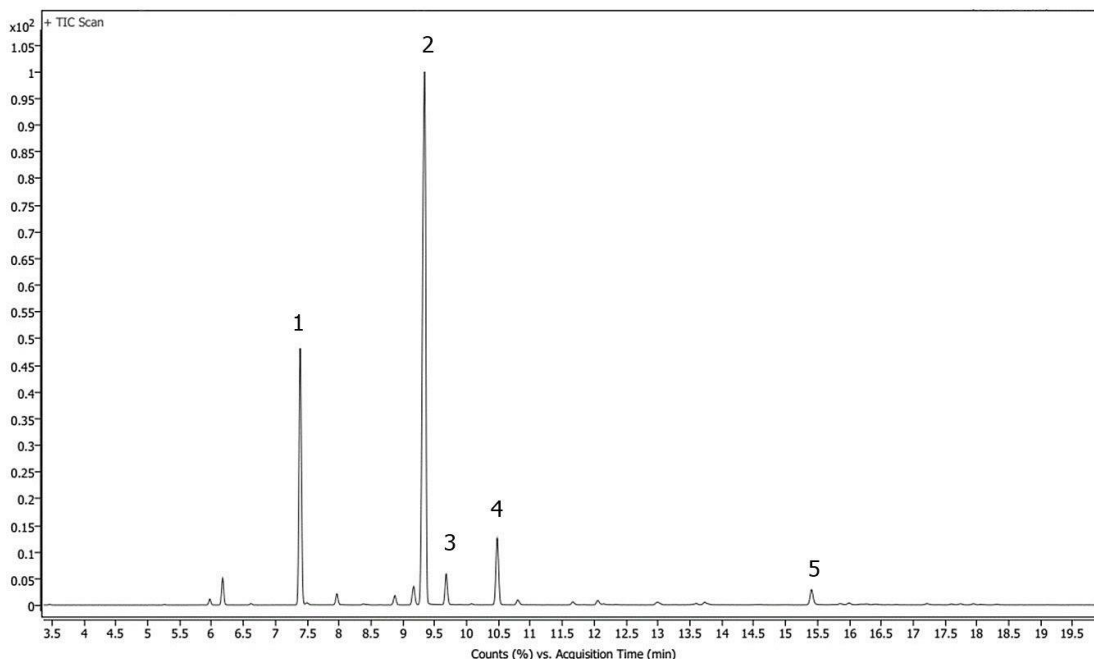
U tablici 1. prikazani su rezultati GC-MS analize eteričnog ulja listova motra poredani po vremenu zadržavanja određenog spoja koji su dobiveni procesima HD,SD i MHD. Vidljivo je da su kao dominantni spojevi identificirani sabinen, limonen, (*E*)- β -ocimen, γ -terpinen te terpinen-4-ol. Limonen je prisutan u najvišem udjelu, kod ulja iz svih triju vrsta destilacija s više od 50%. Najkraće vrijeme zadržavanja na koloni imao je sabinen, dok se terpinen-4-ol zadržavao najduže. Vrijeme zadržavanja odnosi se na vrijeme koje pojedini spoj provede na koloni plinskog kromatografa nakon što je ubrizgan u injekcijski otvor. Svaki spoj nekog uzorka provodi različitu količinu vremena unutar stupca u skladu sa svojim kemijskim sastavom to jest svaki spoj ima različito vrijeme zadržavanja. Kao i u drugim izvješćima o hrvatskom motru⁶¹ dominantne komponente bili su nepolarni monoterpenski spojevi, od kojih se limonen (51,4-54,85%) i sabinen (12,6-27,8%) nalaze u najvišem udjelu, a od oksigeniranih monoterpena ističe se terpinen-4-ol (1,3–14,14%). Obzirom da u hrvatskom motru dominiraju neoksigenerani spojevi, koji čine oko 91% ukupnih spojeva eteričnog ulja ne uočavaju se značajne razlike u profilima dobivenih ulja. Viši sadržaj oksigeniranih spojeva i manji broj ugljikovodika nalazi se u eteričnom ulju izoliranom MHD, naspram eteričnog ulja dobivenog HD, što se može objasniti većim dipolnim momentom oksigeniranih spojeva i jačim djelovanjem mikrovalova na njih te posljedično lakšom ekstrakcijom u odnosu na monoterpenske ugljikovodike sa slabim dipolnim momentom.⁵⁴ Politeo i sur.⁶² ispitivali su eterično ulje hrvatskog motra i potvrdili prisutnost 14 spojeva od kojih dominiraju sabinen (42,55-51,47%) i limonen (36,28-43,58%). Ispitivanjem hrvatskog motra Generalić-Mekinić i sur.⁶³ dokazali su prisutnost monoterpenskih ugljikovodika od kojih su najvećim dijelom zastupljeni limonen (57,5-74,2%), γ -terpinen (4,6-13,8%) i sabinen

(8,1-13,4%). Od oksigeniranih monoterpena najvećim je djelom bio prisutan terpinen-4-ol (2,0-6,9%).

Tablica 1. GC-MS analiza eteričnog ulja listova motra dobivenih hidrodestilacijom (HD), mikrovalnom destilacijom (MHD) i parnom destilacijom (SD)

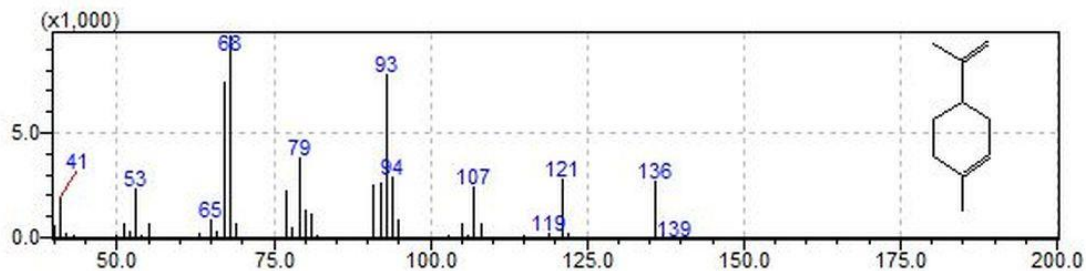
| Redni broj | Spojevi | Vrijeme zadržavanja (min) | HD (%) | SD (%) | MHD (%) |
|------------|-------------------------------|---------------------------|--------|--------|---------|
| 1 | Sabinen | 7,4 | 25,24 | 12,6 | 27,81 |
| 2 | Limonen | 9,3 | 51,38 | 54,85 | 53,05 |
| 3 | (<i>E</i>)- β -Ocimen | 9,7 | 4,04 | 0,78 | 2,96 |
| 4 | γ -Terpinen | 10,4 | 7,12 | 10,53 | 6,54 |
| 5 | Terpinen-4-ol | 15,5 | 1,76 | 14,14 | 1,30 |

Na Slici 12. prikazan je ogledni kromatogram eteričnog ulja motra. Različiti spojevi prisutni u eteričnom ulju hlape na različitim temperaturama te se u jedinici vremena razdvajaju na koloni plinskog kromatografa, što možemo vidjeti u vidu razdvojenih spojeva tj. pikova na kromatogramu. O kojem se spoju radi možemo znati tek identifikacijom korištenjem spektra masa.



Slika 12. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja motra

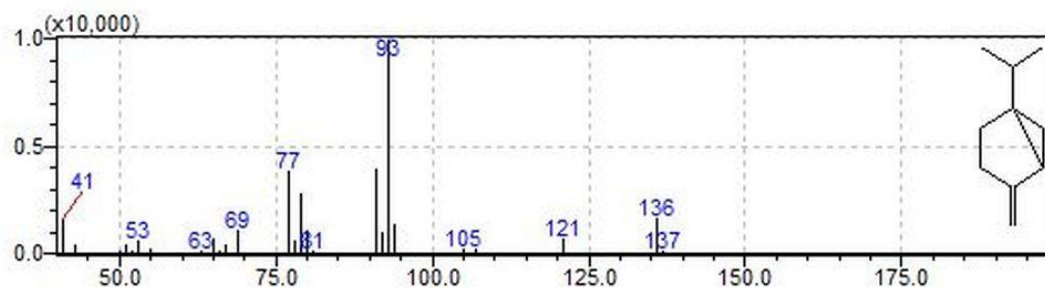
Na Slici 13. prikazan je maseni spektar limonena koji je ciklički monoterpen te ga pronalazimo u dva oblika enantiomera, a oba imaju specifičnu i lako prepoznatljivu aromu. Spektrometar masa sastoji se od ionskog izvora u kojim se bombardira svaki pojedinačni spoj snopom elektrona, kako bi se spojevi mogli detektirati u ioniziranom obliku. Iz masenog spektra limonena uočavamo da osnovni pik iznosi 68 m/z, a molekulski pik iznosi 136 m/z. Pik s najvećim intezitetom u spektru masa naziva se osnovni pik i njemu se pripisuje intezitet od 100%. Molekulski pik je onaj koji zaostane nakon ionizacije snopom elektrona te ima pozitivan naboj zbog jednog nesparenog elektrona. Limonen se upotrebljava prilikom proizvodnje mnogih proizvoda poput sapuna, deterdženata, parfema te prehrambenih napitaka. Nastaje biosintezom iz geranil pirofosfata, jedan je od zastupljenijih terpena u citrusima i drugi je najčešći terpen u biljci kanabis.⁶⁴ U eteričnom ulju motra limonen je bio najviše zastupljen kod uzorka ulja dobivenog SD s udjelom od 54,85%, zatim u MHD sa udjelom 53,05%, a sa najnižim udjelom, ali i dalje jakim visokim bio je prisutan u HD uzorku (51,38%).



Slika 13. Maseni spektar limonena

Na Slici 14. prikazan je maseni spektar sabinena, koji se osim u motru još nalazi i u mažuranu, stolisniku, crnom kardamomu i smreci. On je biciklički monoterpen koji je izoliran iz eteričnih ulja raznih biljnih vrsta te ima ulogu biljnog metabolita.⁶⁵

Iz masenog spektra sabinena uočavamo da osnovni pik iznosi 93 m/z, zbog toga što ima najveći intezitet na masenom spektru, a molekulski pik mu je 136 m/z. U eteričnim uljima naših uzoraka sabinen je najviše bio zastupljen u MHD uzorku sa 27,81%, zatim HD sa udjelom od 25,24%, dok je s sa najnižim udjelom bio zastupljen u eteričnom ulju motra dobivenom primjenom SD (12,6%).



Slika 14. Maseni spektar sabinena

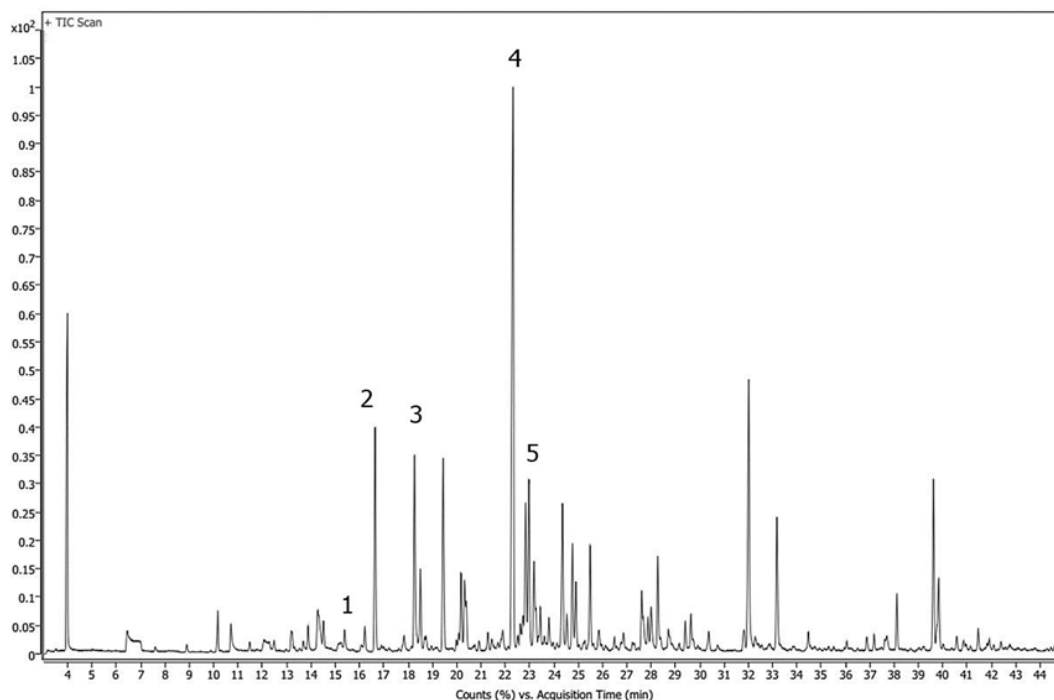
3.2. Profili identificiranih hlapivih spojeva hidrolata

U Tablici 2. prikazani su rezultati analize hidrolata koji su nusprodukt izolacije eteričnog ulja postupcima HD, SD i MHD. Prikazano je pet najdominantnijih spojeva hidrolata poredanih po vremenu zadržavanja. Uočljivo je da postoje velika odstupanja u udjelu spojeva ovisno o korištenoj metodi ekstrakcije. Najhlapljiviji identificirani spoj, koji ima najkraće vrijeme zadržavanja na koloni, bio je benzacetaldehid. Najdulje vrijeme zadržavanja, odnosno najmanju hlapljivost, imao je spoj 10-(Acetilmetil)-3-karen. Spoj koji se ističe svojim udjelom u sva tri uzorka je terpinen-4-ol (13,86-17,45%). Kemijski sastav hidrolata motra značajno se razlikovao od sastava eteričnog ulja, što je bilo i očekivano. Od većine identificiranih spojeva hidrolata samo ih nekoliko nije bilo oksigenirano i bili su prisutni u relativno malim količinama.

Tablica 2. HS-SPME/GC-MS analiza hidrolata listova dobivenih hidrodestilacijom (HD), parnom destilacijom(SD) i mikrovalnom destilacijom (MHD)

| Redni broj | Spojevi | Vrijeme zadržavanja (min) | HD (%) | SD (%) | MHD (%) |
|------------|--------------------------|---------------------------|--------|--------|---------|
| 1 | Benzacetaldehid | 15,3 | 5,34 | 0,37 | 1,15 |
| 2 | (Z)-Sabinen hidrat | 16,5 | 1,54 | 4,02 | 3,95 |
| 3 | (E)-Sabinen hidrat | 18,2 | 2,37 | 5,39 | 4,72 |
| 4 | Terpinen-4-ol | 22,2 | 13,86 | 15,77 | 17,45 |
| 5 | 10-(Acetilmetil)-3-karen | 22,9 | 13,45 | 5,64 | 0,00 |

Na Slici 15. prikazan je ogledni kromatogram hidrolata motra na kojem je označeno pet značajnih spojeva.



Slika 15. Kromatogram ukupne ionske struje hidrolata motra

Benzacetaldehid je spoj molekulske formule $C_{10}H_{10}O$, i molekulske mase 146,19. On je prirodni, organski spoj koji se nalazi u različitim organizmima poput gljive smrdljivi stršak (*Phallus impudicus*), zimzelenom stablu kakaovac (*Theobroma cacao*), virginijskom duhanu (*Nicotiana tabacum*), itd. Ovaj spoj u tekućem obliku bojom varira od bezbojne do blago žute te sadržava cvjetne i drvenaste mirisne note. Benzacetaldehid nije topljiv u vodi dok mu je topljivost jako dobra u uljima. Što se okusnog profila spoja tiče, podsjeća na rum, kakao i pečenje. Upravo iz toga razloga u prehrambenoj industriji ga koriste kao pojačivač okusa. Isto tako možemo ga često pronaći u sastavu različitih parfema, osvježivača zraka, itd. Benzacetaldehid prisutan je i u duhanskoj industriji kao jedan od sastojaka koji se koristi u pripremi cigareta. U velikim koncentracijama može uzrokovati iritaciju kože, očiju te dišnog sustava.⁶⁶

(*Z*)-Sabinen i (*E*)-sabinen hidrati su strukturni izomeri s molekulsom formulom $C_{10}H_{18}O$. *E* i *Z* izomeri opisuju stereo aspekte atoma ugljika vezanih dvostrukim vezama. *E* izomer se sastoji od supstituiranih skupina na suprotnim stranama dvostruke veze, dok su u *Z* izomeru supstituirane skupine na istoj strani. *Z* izomer još bilježimo sa *cis* dok *E* izomer obilježavamo kraticom *trans*. Molekulske mase navedenih izomera su iste te iznose 154,25. Oba izomera se koriste u prehrambenoj industriji kao sredstva za poboljša-

nje okusa obzirom da ovaj spoj ima postojan, osvježavajuć okus koji podsjeća na pepermint. Sabinen hidrat je zapaljiva tekućina koja može otpuštati lako zapaljive pare te stoga s ovom supstancom treba oprezno rukovati; držati ju podalje od izvora topline, vrućih površina i iskri. Sabinen hidrat je prirodni, organski spoj koji se nalazi u različitim biljkama poput timijana (*Thymus vulgaris*) i srebrnastog pelina (*Artemisia argyi*), a učestalo se koristi u industriji mirisa te proizvodnji parfema.⁶⁷

Terpinen-4-ol je spoj molekulske formule $C_{10}H_{18}O$, a njegova molekularna težina iznosi 154,25. Terpinen-4-ol je molekula u kojoj 1-menten ($C_{10}H_{18}$) nosi hidroksi supstituent na poziciji broj 4. Ima ulogu biljnog metabolita, antibakterijskog agensa, antioksidansa, protuupalnog agensa, antiparazitskog agensa, antineoplastičnog agensa i induktora apoptoze. Riječ je o terciarnom alkoholu. Koristi se u biljnoj industriji proizvodnje eteričnih ulja, a najpoznatije je ulje čajevca u kojem je terpinen-4-ol glavni sastojak. Ova molekula ima vrlo širok antimikroban spektar djelovanja i s time je neizostavni sastojak u aromaterapiji. Djeluje protiv raznih bakterija, virusa i gljivica te se koristi kao preparat za jačanje imuniteta.⁶⁸

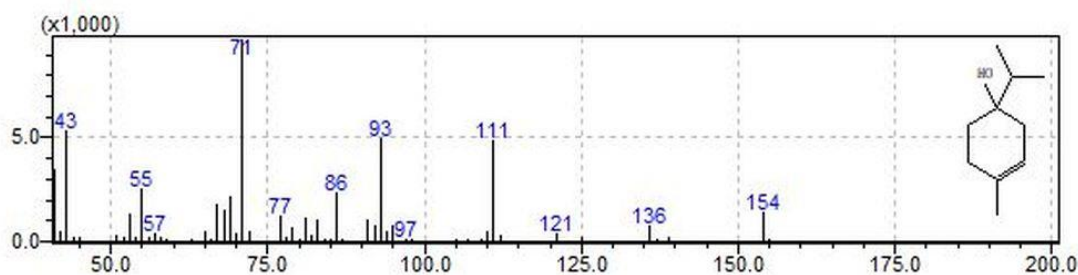
Terpinen-4-ol je uljasta tekućina kojoj bojom varira od bezbojne do blijedo žute. Što se spektra mirisa tiče, opisan je kao toplo papreni, blago zemljani, pljesnivo drveni, a okusom podsjeća na biljnu aromu papra. Terpinen-4-ol je slabo topljiv u vodi, ali dobro topljiv u uljima i etanolu. Koristi se kao pojačivač okusa, dodatak u proizvodnji različitih namirnica (pekarski proizvodi, žvakaće gume, smrznuti mliječni proizvodi, umaci itd.), u parfemskoj industriji, industriji mirisa, te proizvodnji sredstava za čišćenje i njegu kućanstva. Terpinen-4-ol možemo pronaći u grčkom origanu (*Origanum onites*), majčinoj dušici (*Thymus capitatus*), gorkoj naranči (*Citrus aurantium*) itd.⁶⁸

10-(Acetilmetil)-3-karen je terpenski organski spoj molekulske formule $C_{13}H_{20}O$, a njegova molekularna težina iznosi 192,30. Terpeni su spojevi iz klase ugljikovodika koji se široko pojavljuju u biljkama i životinjama izgrađeni od izoprena, ugljikovodika koji se sastoje od pet atoma ugljika povezanih sa osam atoma vodika C_5H_8 . Bezbojna je tekućina slatkastog mirisa koji podsjeća na terpentini. Gustoća mu je manja od vode, te stoga pluta na površini vode. Okusom podsjeća na citrusnu, voćnu aromu limuna. Netopljiv je u vodi, ali mu je topljivost jako dobra u benzenu, dok je slabo topljiv u etanolu. Koristi se kao sredstvo za poboljšanje okusa te pojačivač okusa u prehrambenoj industriji, u sredstvima za čišćenje, njegu kućanstva te u proizvodnji dezinfekcijskih sredstava. 10-(Acetilmetil)-3-karen možemo pronaći kao sastojak u osvježivačima zraka te mirisnim svijećama. Može se pronaći i u sastavu raznih pesticida (agrokemikalije).

Udisanje para ovog spoja uzrokuje glavobolju, zbunjenost i respiratorni stres, dok gutanje iritira čitav probavni sustav i može dovesti do oštećenja bubrega. Dodir s kožom i očima izaziva iritaciju. Jako je zapaljiv, a njegove pare mogu stvoriti eksplozivne smjese sa zrakom. 10-(Acetilmetil)-3-karen možemo pronaći u jabuci (*Malus domestica*), limunskoj travi (*Cymbopogon citratus*) te kadulji (*Salvia brandegeei*).⁶⁹

Na Slici 16. prikazan je maseni spektar monoterpena terpinena-4-ola koji je jedan od primarnih aktivnih sastojaka i eteričnog ulja čajevca. Nalazi se u raznim aromatičnim biljkama poput naranče, mandarine, origana, novozelandskog drva limuna, crnog papra i dr.⁷⁰

Terpinen-4-ol moćno je baktericidno⁷¹ i antifungalno sredstvo.⁷² Posebno je zanimljiva *in vitro* aktivnost protiv *S. aureus* i *C. albicans*^{73,74}, a pokazalo se da kombiniranje ove prirodne tvari i konvencionalnih lijekova može pomoći u liječenju rezistentnih kvasnica i bakterijskih infekcija. Iz ovog masenog spektra vidljivo je da osnovni pik iznosi 71 m/z, a molekulski pik koji odgovara relativnoj molekularnoj masi terpinena-4-ola, koja iznosi 154 m/z. U našem uzorku hidrolata motra, terpinen-4-ol je bio najzastupljeniji kod MHD hidrolata sa 17,45%, zatim u SD uzorku sa udjelom od 15,77% te sa najnižim udjelom kod hidrolata dobivenog HD postupkom sa 13,86%.



Slika 16. Maseni spektar terpinena-4-ola

Kemijski sastav hidrolata razlikuje se od sastava eteričnog ulja. U eteričnom ulju identificirano je ukupno 15 spojeva, od čega oko 98% pripada neoksiseniranim spojevima, a oko 2% pripada oksisendiranim spojevima. U hidrolatima je identificirano 50 spojeva, od čega oksisendiranim spojevima pripada nešto više od 90% spojeva, dok su ostatak neoksisenirani. U hidrolatu se često nalaze spojevi koji se nalaze u ulju, ali u oksisendiranom obliku. U eteričnom ulju motra nalazi se sabinen, dok se u hidrolatu nalazi

njegov hidrat. Sabinen se nalazi u većem udjelu kao nepolarni spoj eteričnog ulja, za razliku od polarnog sabinena hidrata čiji je udio u hidrolatu mnogo niži. Udio limonena u eteričnom ulju je veći (4,42-53,05%), dok se u hidrolatima nalazi u znatno manjem udjelu (0,02-1,61%). Također, sabinen i limonen imaju jednak molekularni pik, ali ono po čemu se razlikuju jest osnovni pik te vrijeme zadržavanja na koloni. Molekularni pik i sabinena i limonena iznosi 136, a osnovni pik sabinena iznosi 93, dok je kod limonena 68. Sabinen ima kraće vrijeme zadržavanja na koloni od limonena. Za razliku od limonena i sabinena, terpinen-4-ol više je zastupljen u hidrolatima nego li u eteričnom ulju.

4. ZAKLJUČAK

Broj istraživanja aromatičnog i ljekovitog bilja u svakodnevnom je porastu zbog rastuće popularnosti korištenja prirodnih proizvoda u različitim industrijama. Dok su sastav, svojstva i primjena eteričnog ulja motra opsežno proučeni, ovo istraživanje potvrđuje veliki kemijski potencijal tekućeg nusproizvoda izolacije eteričnog ulja (hidrolata), koji se obično tretira kao otpad. Proces izolacije bitan je element za poboljšanje prinosa i ukupne kvalitete eteričnog ulja. Analiza eteričnog ulja motra, dobivenog trima različitim vrstama destilacije, pokazala je dominaciju dva spoja, limonena (51,38-54,85%) i sabinena (12,6-27,81%). Analiza hidrolata listova motra pokazala je najveći udio terpinen-4-ola (13,86-17,45%). Kod eteričnog ulja sabinen se pokazao kao najhlapljiviji spoj, a kod hidrolata benzacetaldehid je bio spoj sa najkraćim vremenom zadržavanja. Spoj koji najteže hlapi kod eteričnog ulja motra bio je terpinen-4-ol, dok je kod hidrolata motra to bio 10-(acetilmetil)-3-karen. Generalno gledajući, zbog znatno kraćeg vremena trajanja destilacije i niže potrošnje energije, MHD je dobra alternativa za HD, dok korištenje SD rezultira većim prinosom ulja te manjom hidrolizom pojedinih spojeva nego li je slučaj kod HD. Utjecaj različitih postupaka destilacija manje je izražen kod profila hlapivih spojeva eteričnog ulja motra, dok je iznimno velik kod profila hlapivih spojeva hidrolata.

5. LITERATURA

1. *R. J. Forbes*, A short history of the art of distillation from the beginnings up to the death of Cellier Blumenthal. Reprinted. Holland, 1970, str. 1-13, 29-55
2. *M. A. Hanif, S. Nisar, G. S. Khan, Z. Mushtaq, M. Zubair*, Essential Oils, Essential Oils Research, Springer, Cham. ,2019, str. 3-17.
3. *D. M. Brenner*, Perilla: botany, uses and genetic resources. In: Janick J, Simon JE (eds) New crops. Wiley, New York, 1993, pp. 322–328.
4. *F. R. Jurado, A. Franco, N. Ramirez-Corona, E. Palou, A. López-Malo*, Essential oils: Antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling, Food. Eng. Rev. **7** (2015) 275–297, doi: <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>.
5. *V. P. S. Rao, D. Pandey*, A project report on Extraction of essential oil and its applications for Bachelor of Technology (Chemical Engineering) at Department of Chemical Engineering National Institute of Technology Rourkela. Vol. 769008, Orissa, India, 2007, str. 1-35.
6. *M. Acimovic, V. Tešević, K. Smiljanic, M. Cvetkovic, J. Stankovic, B. Kiproviski, V. Sikora*, Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses, Adv. Technol. **9** (2020) 54–70, doi: <https://doi.org/10.5937/savteh2002054A>.
7. *H. H. A. Rassem, A. H. Nour, R. M. Yunus*, Techniques for extraction of essential oils from plants: A review, Aust. J. Basic Appl. Sci. **10** (2016) 117–127, doi: <http://www.ajbasweb.com/old/ajbas/2016/November/11>.
8. *T. Bui-Phuc, T. T. Nhu-Trang, N. Cong-Hau*, Comparison of chemical composition of essential oils obtained by hydro-distillation and microwave-assisted extraction of Japanese mint (*Mentha arvensis L.*) grown in Vietnam, IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. **991** (2020) 012039, doi: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/991/1/012039>.
9. *A. Filly, A. S. Fabiano-Tixier, C. Louis, X. Fernandez, F. Chemat*, Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers, C. R. Chim. **19** (2016) 707–717, doi: <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.01.018>.
10. *M. A. Ferhat, B. Y. Meklati, F. Chemat*, Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: Cold pressing, hydrodistillation and microwave

- ‘dry’ distillation, *Flavour and Fragr. J.* **22** (2007) 494–504, doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.1829>.
11. A. Filly, X. Fernandez, M. Minuti, F. Visinoni, G. Cravotto, F. Chemat, Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale, *Food Chem.* **150** (2014) 193–198, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.139>.
 12. M. Elyemni, B. Louaste, I. Nechad, T. Elkamli, A. Bouia, M. Taleb, M. Chaouch, N. Eloutassi, Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: Hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation, *Sci. World J.* **2019** (2019) 1-6 , doi: <https://doi.org/10.1155/2019/3659432>.
 13. V. D. Zheljzkov, T. Astatkie, Effect of residual distillation water of 15 plants and three plant hormones on Scotch spearmint (*Mentha× gracilis* Sole), *Ind. Crops Prod.* **33** (2011) 704–709, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.011>.
 14. B. R. Rajeshwara Rao, Hydrosols and water-soluble essential oils: Medicinal and biological properties, In *Recent Progress in Med. Plants: Essential Oils I*, 1st ed.; Vol. 36, Studium Press LLC: Houston, TX, USA, 2013, str.119-140
 15. F. Ieri, L. Cecchi, E. Giannini, C. Clemente, A. Romani, GC-MS and HS-SPME-GC×GC-TOFMS Determination of the volatile composition of essential oils and hydrosols (by-products) from four *Eucalyptus* species cultivated in Tuscany, *Molecules*, PMC. **24** (2019) 226, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24020226>.
 16. C. Jensch, J. Strube, Proposal of a New Green Process for Waste Valorization and Cascade Utilization of Essential Oil Plants, *Sustainability*, MDPI. **14** (2022) 3227, doi: <https://doi.org/10.3390/su14063227>.
 17. O. Politeo, M. Popović, M. Veršič Bratinčević, K. Kovačević, B. Urlić, I. Generalić Mekinić, Chemical profiling of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils and their isolation residual waste-waters, *Plants*. **12** (2023) 214, doi: <https://doi.org/10.3390/plants12010214>.
 18. B. Meyer-Warnod, Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfume. Flavorist.* **9** (1984) 93104, ISSN: 0272-2666.
 19. Ali, A., Chua, B.L., Chow, Y.H. (2019). An insight into the extraction and fractionation technologies of the essential oils and bioactive compounds in *Rosmarinus officinalis* L: Past, present and future, *TrAC Trends in Analyt. Chem.* **118** (2019) 338-351, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.040>
 20. URL: <https://bit.ly/40zyr33> (18.4.2023)

21. *R. Rai, B. Suresh*, In vitro antioxidant properties of Indian additional paan and its ingredients, *Indian J. Tradit. Knowl.* **3** (2004) 187-191 .
22. *K. G. Fahlbusch, F. J. Hammerschmidt, J. Panten, W. Pickenhagen, D. Schatkowski, K. Bauer, D. Garbe, H. Surburg*, "Flavors and Fragrances". *Ullmann's Encyclopedia of Industr. Chem.* (2003) 74-192 doi: https://doi.org/10.1002/14356007.a11_141.
23. URL: <https://bit.ly/42Sxghh> (18.4.2023)
24. *M. Selvamuthukumar, J. Shi*, Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries, *Food Qual. Saf.* **1** (2017) 61–81, doi: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx004>.
25. *M. Zwingelstein, M. Draye, J. L. Besombes, C. Piot, G. Chatel*, Viticultural wood waste as a source of polyphenols of interest: Opportunities and perspectives through conventional and emerging extraction methods, *Waste management. N.Y.* **102** (2019) 782-794, doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.11.034>.
26. *L. Wang, C. L. Weller*, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.* **17** (2006) 300-312, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>.
27. *M. E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja*, Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *J. Chromatogr. A.* **1043** (2004) 323–327, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.083>.
28. *M. A. Ferhat, B. Y. Meklati, J. Smadja, F. Chemat*, An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel, *J. Chromatogr. A.* **1112** (2006) 121-126, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.030>.
29. *A. Farhat, C. Ginies, M. Romdhane, F. Chemat*, Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy: Experimental and theoretical study, *J. Chromatogr. A.* **1216** (2009) 5077-5085, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.084>.
30. *I. Blažević, A. Đulović, V. Čikeš Čulić, M. Popović, X. Giljota, F. Burčul, P. Rollin*, Microwave-Assisted versus Conventional Isolation of Glucosinolate Degradation Products from *Lunaria annua* L. and Their Cytotoxic Activity, *Biomolecules* **10** (2020) 215, doi: <https://doi.org/10.3390/biom10020215>

31. K. Jakubczyk, A. Tuchowska, K. Janda-Milczarek, Plant hydrolates-Antioxidant properties, chemical composition and potential applications, *Biomed Pharmacother.* **142** (2021) 112033, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112033>.
32. V. D. Zheljazkov, T. Astatkie, Effect of residual distillation water of 15 plants and three plant hormones on Scotch spearmint (*Mentha × gracilis* Sole), *Industrial Crops and Products.* **33** (2011) 704-709, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.011>.
33. M. H. Shafie, M. L. Kamal, N. A. Abdul Razak, S. Hasan, N. H. Uyup, A. F. A. Rashid, Z. Zafarina, Antioxidant and antimicrobial activity of plant hydrosol and its potential application in cosmeceutical products, *Jundishapur J. Nat. Pharm.* **17** (2022) e124018, doi: <https://doi.org/10.5812/jjnpp-124018>.
34. A. Fatemi, M. H. Raoufat, S. Kamgar, A. Karami, Design, development and evaluation of a single-task electronic nose rig for assessing adulterated hydrosols. *J. Food Meas. Charact.* **13** (2019) 1–14, doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9924-z>.
35. Z. N. Arsanjani, H. Etemadfar, M. Moein, Comparative chemical evaluation of commercially available mint hydrosols produced in Fars Province, Iran, *J. Rep. Pharm. Sci.* **9** (2020) 52 , doi: https://doi.org/10.4103/jrptps.JRPTPS_17_19.
36. S. D'Amato, A. Serio, C. C. López, Paparella, Biological activity and potential as antimicrobials for food applications, *Food Control* **86** (2018) 126–137, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>.
37. L. Kokalj Ladan, N. Kočevar Glavač, GC–MS Analysis of A *Helichrysum italicum* Hydrosol: Sensitivity, Repeatability and Reliability of Solvent Extraction versus Direct Hydrosol Analysis, *Appl. Sci.* **12** (2022) 10040, doi: <https://doi.org/10.3390/app12190040>.
38. I. Jerković, *Kemija aroma, recenzirana skripta, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011*
39. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije, Sveučilište u Splitu, Kemijsko- tehnološki fakultet, 2009*
40. D. Kuštrak, *Farmakognozija fitofarmacija, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2005, str. 58.*

41. N. C. Da Costa, S. Eri, Identification of Aroma Chemicals, in: D. J. Rowe (Ed.), Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, pp.. 20-25.
42. URL: <https://t.ly/O-H6>. (20. 04 .2023)
43. P. J. Marriot, R. Shellie, C. Cornwell, Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, J. Chromatogr. A. **936** (2001) 1-22 , doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01314-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01314-0).
44. G. R. Jones, N. J. Oldham, Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques, J. Chromatogr. A. **843** (1999) 199-236, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00446-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00446-X).
45. Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina, Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999, str. 23-51.
46. E. De Hoffman, V. Stroombant, Mass spectrometry- principles and applications, 3rd edition, 2007, 217-232.str.
47. URL: <https://t.ly/UGzv>. (18.4.2023)
48. L. Pateira, T. Nogueira, A. Antunes, F. Venancio, R. Tavares, J. Capelo, Two Chemotypes of *Crithmum maritimum* L. from Portugal, Flavour Fragr. J. **14** (1999) 333-343, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199909/10\)14:5<333::AID-FFJ839>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<333::AID-FFJ839>3.0.CO;2-V).
49. K. H. Can Baser, T. Ozek, B. Demirci, Y. Saritas, Essential Oil of *Crithmum maritimum* L. from Turkey, J. Essent. Oil Res. **12** (2000) 424-426, doi: <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699555>.
50. G. Ruberto, M. Tiziana Baratta, S.G. Deans, H.J. Damien Dorman , Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* Essential Oils, Planta Med. **66** (2000) 687-93, doi: <https://doi.org/10.1055/s-2000-9773>
51. F. Senatore, F. Napolitano, M. Ozcan, Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey, Flavour Fragr. J. **15** (2000) 186-189, doi: [https://doi.org/10.1002/1099-1026\(200005/06\)15:3<186::AID-FFJ889>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1099-1026(200005/06)15:3<186::AID-FFJ889>3.0.CO;2-I).
52. M. Ozcan, A. Akgul, K. H. Baser, T. Ozck, N. Tabanca, Essential oil composition of sea fennel (*Crithmum maritimum*) form Turkey, Die nahrung. **45** (2001) 353-6,

doi: [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20011001\)45:5<353::AID-FOOD353>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20011001)45:5<353::AID-FOOD353>3.0.CO;2-4).

53. M. M. Ozcan, L. G. Pedro, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, Constituents of the Essential Oil of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) Growing Wild in Turkey, J. Med. Food. **9** (2006) 128–130, doi: <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.128>.
54. T. Kulišić-Bilušić, 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: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00330.x>.
55. I. Jallali, Y. Zaoiali, I. Missaoui, A. Smeoui, C. Abdelly, R. Ksouri, Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L., Food Chem. **145** (2014) 1031–1038, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.034>.
56. N. Nabet, H. Boudries, N. Chougui, S. Loupassaki, S. Souagui, F. Burlo, F. Hernandez, A. A. Carbonell.Barrachina, K. Madani, R. Larbat, Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts, Int. J. Food Prop. **20** (2016) 1843–1855, doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1222541>.
57. M. M. Ozcan, N. Uslu, G. Figueredo, F. A. Juhaimi, K. Ghafoor, E. E. Babiker, O. N. Alsawmahi, M. M. Ozcan, A. Isam, M. Ahmed, The effect of fermentation process on bioactive properties, essential oil composition and phenolic constituents of raw fresh and fermented sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) leaves, Indian J. Tradit. **18** (2019) 800–804, corpus ID: 209175865.
58. J. M. Alves-Silva, I. Guerra, M. J. Goncalves, C. Cavaleiro, M. T. Cruz, A. Figueirinha, L. Salgueiro, Chemical composition of *Crithmum maritimum* L. essential oil and hydrodistillation residual water by GC-MS and HPLC-DAD-MS/MS, and their biological activities, Ind. Crops Prod. **149** (2020) 112329, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112329>.
59. G. D'Agostino, B. Giambra, F. Palla, M. Bruno, N. Badalamenti, The Application of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L. and *Crithmum maritimum* L. as

- Biocidal on Two Tholu *Bommalu* Indian Leather Puppets, Plants. **10** (2021) 1508, doi: <https://doi.org/10.3390/plants10081508>.
60. 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. Pl. **24** (2021) 1-11, doi: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1875054>
61. R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, **16** (2007) 65-120
62. O. Politeo, M. Popović, M. Versic 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:<https://doi.org/10.3390/plants12010214>
63. I. Generalić Mekinić, I. Blažević, I. Mudnic, F. Burčul, M. Grga, D. Skroza, I. Jerčić, I. Ljubenkov, M. Boban, M. Milos, V. Katalinić, Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity, J. Food Sci. Technol. **53** (2016) 3104–3112, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2283>.
64. P. E. Kazyoba, A. Viljoen, Limonene – a Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance, Nat. Prod. Commun. **3** (2008) 1193-1202, doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300728>.
65. URL: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sabinene\(09.06.2023.\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sabinene(09.06.2023.))
66. URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzeneacetaldehyde_-alpha-ethylidene#section=Information-Sources (09. 06. 2023.)
67. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sabinene-hydrate#section=Information-Sources> (09. 06. 2023.)
68. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terpinen-4-ol#section=Other-Environmental-Concentrations> (09. 06. 2023.)
69. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/561019>. (09. 06. 2023)

70. J.A. Pino, R. Marbot, V. Fuentes, Characterization of volatile substances in bullock's heart (*Annona reticulata* L.), a fruit variety from Cuba, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 3836–3839, doi: <https://doi.org/10.1021/jf020733y>
71. R. Loughlin, B. F. Gilmore, P. A. McCarron, M. M. Tunney, Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells, *Lett. Appl. Microbiol.* **46** (2008) 428–433. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02334.x>.
72. F. Mondello, F. De Bernardis, A. Girolamo, A. Cassone, G. Salvatore, In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic *Candida* species, *BMC Infect Dis.* **6** (2006) 158, doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-158>.
73. M. Dryden, S. Dailly, M. Crouch, A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for clearance MRSA colonization, *J. Hosp. Infect.* **56** (2004) 283–286, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.01.008>
74. A. Mertas, A. Garbusinska, E. Szliszka, A. Jureczko, M. Kowalska, W. Krol, The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains, *Biomed. Res. Int.* **2015** (2015) 590470, doi: <https://doi.org/10.1155/2015/590470>