

# ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA HIDROLATA LAVANDE, SMILJA I GERANIJA

---

**Mažibrada, Nina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:807837>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA HIDROLATA LAVANDE, SMILJA I  
GERANIJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**NINA MAŽIBRADA**

**Matični broj: 493**

**Split, rujan 2024.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA HIDROLATA LAVANDE, SMILJA I  
GERANIJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**NINA MAŽIBRADA**

**Matični broj: 493**

**Split, rujan 2024.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IN HYDROLATES OF  
LAVENDER, IMMORTELLE AND GERANIUM**

**BACHELOR THESIS**

**NINA MAŽIBRADA**

**Parent number: 493**

**Split, September 2024.**

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Prijediplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** kemija

**Mentor:** prof. dr. sc. Ani Radonić

## ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA HIDROLATA LAVANDE, SMILJA I GERANIJA

Nina Mažibrada, 493

### Sažetak:

Tijekom destilacije eteričnog ulja kao nusprodukt stvara se hidrolat ili mirisna vodica koja sadrži hlapljive spojeve koji doprinose njenim aromatičnim i terapijskim svojstvima. Cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve iz hidrolata lavande (*Lavandula angustifolia*), smilja (*Helichrysum italicum*) i geranija (*Pelargonium graveolens*). Za ovu svrhu korištene su dvije tehnike ekstrakcije: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici. Analiza vršnih para i ekstrakata provedena je korištenjem spregnutog sustava plinska kromatografija-spektrometrije masa (GC-MS).

Analiza rezultata pokazala je da su različite tehnike ekstrakcije rezultirale različitim profilima hlapljivih spojeva. Mikroekstrakcija vršnih para omogućila je izolaciju ključnih spojeva poput linalola i citronelola, dok je ekstrakcijom miješanjem na magnetskoj miješalici identificiran širi spektar spojeva, uključujući teže hlapljive spojeve. Udio ukupno identificiranih spojeva dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi u svim analiziranim hidrolatima je veći. Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju da su najzastupljeniji spojevi u hidrolatima terpeni, koji su odgovorni za karakteristične mirise i često imaju antimikrobna i protuupalna svojstva, te fenoli, koji doprinose aromatičnom profilu i mogu imati snažna antioksidativna svojstva.

Rezultati ukazuju na to da odabir tehnike ekstrakcije hlapljivih spojeva znatno utječe na kvalitetu i kvantitetu istih, što je od velike važnosti za primjenu u aromaterapiji i industriji mirisa. Kvaliteta hlapljivih spojeva može pridonijeti specifičnim mirisnim profilima i terapijskim svojstvima, dok veći kvantitet izoliranih spojeva može povećati učinkovitost proizvoda.

**Ključne riječi:** hidrolati, lavanda, smilje, geranij, hlapljivi spojevi

**Rad sadrži:** 40 stranica, 18 slika, 4 tablice, 43 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović	predsjednik
2. Tijana Stanić, mag. chem., predavač	član
3. prof. dr. sc. Ani Radonić	mentor

**Datum obrane:** 27.9.2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) 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 završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

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

**Scientific area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Supervisor:** Ani Radonić, PhD, Full prof.

### ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IN HYDROLATES OF LAVENDER, IMMORTELLE AND GERANIUM

Nina Mažibrada, 493

#### Abstract:

The distillation of essential oil produces hydrolate or aromatic water as a by-product, which contains volatile compounds that contribute to its aromatic and therapeutic properties. The aim of this study was to isolate and identify the volatile compounds from the hydrolates of lavender (*Lavandula angustifolia*), immortelle (*Helichrysum italicum*) and geranium (*Pelargonium graveolens*). Two extraction techniques were used for this purpose: Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and extraction by mixing with a magnetic stirrer. The headspaces and extracts were analysed using a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system.

The results showed that the different extraction techniques led to different profiles of the volatile compounds. Headspace extraction enabled the isolation of key compounds such as linalool and citronellol, while extraction by mixing yielded a wider range of compounds, including heavier and less volatile ones. The proportion of total identified compounds obtained by headspace solid-phase extraction was higher in all hydrolates.

The results of this study confirm that the most abundant compounds include terpenes, which are responsible for characteristic odours and often have antimicrobial and anti-inflammatory properties, and phenols, which contribute to the aromatic profile and may have strong antioxidant properties.

The results show that the choice of extraction techniques to isolate volatile compounds significantly influences their quality and quantity, which is crucial for applications in aromatherapy and the fragrance industry. The quality of volatile compounds can contribute to specific fragrance profiles and therapeutic properties, while a greater quantity of isolated compounds can increase product efficacy.

**Keywords:** hydrolates, lavender, immortelle, geranium, volatile compounds

**Thesis contains:** 40 pages, 18 pictures, 4 tables, 43 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović, PhD, Assoc. Prof. | chair person |
| 2. Tijana Stanić, mag. chem., Lecturer     | member       |
| 3. Ani Radonić, PhD, Full Prof.            | supervisor   |

**Defence date:** 27.9.2024.

**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 organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ani Radonić, u razdoblju od lipnja 2024. do rujna 2024. godine.*

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Radonić na stručnom savjetovanju, susretljivosti, razumijevanju i potpori koja mi je pružena prilikom izrade ovog završnog rada.*

*Također se zahvaljujem članovima povjerenstva, mag.chem. Tijani Stanić na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog rada i izv.prof.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću, koji su omogućili i pripomogli realizaciji ovog završnog rada.*

*Hvala svim mojim prijateljima i kolegama, posebno kolegici Lei, što se studij uz vas uvijek činio manje teškim. Hvala na svojoj potpori i podršci koju ste mi pružali tijekom školovanja.*

*Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima i obitelji! Najveću zahvalnost dugujem njima, koji su uvijek davali bezuvjetnu podršku i ljubav. Moj uspjeh je ujedno i vaš uspjeh!*



## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Analizirati hlapljive spojeve u hidrolatima lavande, smilja i geranija dobivenim od proizvođača Svijet biljaka d.o.o., Vodnjan, Hrvatska
- Hlapljive spojeve izolirati dvjema tehnikama ekstrakcije, ekstrakcijom miješanjem koristeći smjesu organskih otapala pentan:diethyl-eter, 1:2 (v/v) i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi
- Analizu ekstrahiranih spojeva, odnosno identifikaciju i određivanje udjela pojedinih spojeva, provesti plinskom kromatografijom-spetrometrijom masa.

## SAŽETAK

Tijekom destilacije eteričnog ulja kao nusproizvod stvara se hidrolat ili mirisna vodica koja sadrži hlapljive spojeve koji doprinose njenim aromatičnim i terapijskim svojstvima. Cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve iz hidrolata lavande (*Lavandula angustifolia*), smilja (*Helichrysum italicum*) i geranija (*Pelargonium graveolens*). Za ovu svrhu korištene su dvije tehnike ekstrakcije: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) i ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici. Analiza vršnih para i ekstrakata provedena je korištenjem spregnutog sustava plinska kromatografija-spektrometrije masa (GC-MS).

Analiza rezultata pokazala je da su različite tehnike ekstrakcije rezultirale različitim profilima hlapljivih spojeva. Mikroekstrakcija vršnih para omogućila je izolaciju ključnih spojeva poput linalola i citronelola, dok je ekstrakcijom miješanjem na magnetskoj miješalici identificiran širi spektar spojeva, uključujući teže hlapljive spojeve. Udio ukupno identificiranih spojeva dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi u svim analiziranim hidrolatima je veći.

Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju da su najzastupljeniji spojevi u hidrolatima terpeni, koji su odgovorni za karakteristične mirise i često imaju antimikrobna i protuupalna svojstva, te fenoli, koji doprinose aromatičnom profilu i mogu imati snažna antioksidativna svojstva.

Rezultati ukazuju na to da odabir tehnike ekstrakcije hlapljivih spojeva znatno utječe na kvalitetu i kvantitetu istih, što je od velike važnosti za primjene u aromaterapiji i industriji mirisa. Kvaliteta hlapljivih spojeva može pridonijeti specifičnim mirisnim profilima i terapijskim svojstvima, dok veći kvantitet izoliranih spojeva može povećati učinkovitost proizvoda.

**Ključne riječi:** hidrolati, lavanda, smilje, geranij, hlapljivi spojevi

## ABSTRACT

The distillation of essential oil produces hydrolate or aromatic water as a by-product, which contains volatile compounds that contribute to its aromatic and therapeutic properties. The aim of this study was to isolate and identify the volatile compounds from the hydrolates of lavender (*Lavandula angustifolia*), immortelle (*Helichrysum italicum*) and geranium (*Pelargonium graveolens*). Two extraction techniques were used for this purpose: Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and extraction by mixing with a magnetic stirrer. The headspaces and extracts were analysed using a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system.

The results showed that the different extraction techniques led to different profiles of the volatile compounds. Headspace extraction enabled the isolation of key compounds such as linalool and citronellol, while extraction by mixing yielded a wider range of compounds, including heavier and less volatile ones. The proportion of total identified compounds obtained by headspace solid-phase extraction was higher in all hydrolates.

The results of this study confirm that the most abundant compounds include terpenes, which are responsible for characteristic odours and often have antimicrobial and anti-inflammatory properties, and phenols, which contribute to the aromatic profile and may have strong antioxidant properties.

The results show that the choice of extraction techniques to isolate volatile compounds significantly influences their quality and quantity, which is crucial for applications in aromatherapy and the fragrance industry. The quality of volatile compounds can contribute to specific fragrance profiles and therapeutic properties, while a greater quantity of isolated compounds can increase product efficacy.

**Keywords:** hydrolates, lavender, immortelle, geranium, volatile compounds

# Sadržaj

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Eterična ulja.....	2
1.2. Izolacija eteričnih ulja .....	3
1.2.1. Destilacija .....	4
1.2.2. Tiještenje .....	6
1.2.3. Ekstrakcija .....	6
1.3. Kemijski sastav eteričnih ulja i hidrolata .....	8
1.3.1. Terpeni.....	8
1.3.2. Fenilpropanski spojevi.....	10
1.4. Djelovanje i upotreba hidrolata.....	11
1.4.1. Hidrolat lavande .....	12
1.4.2. Hidrolat smilja .....	12
1.4.3. Hidrolat geranija.....	13
1.5. Obrada hidrolata - izolacija i analiza hlapljivih spojeva .....	14
1.5.1. Ekstrakcija .....	15
1.5.2. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi .....	15
1.5.3. Plinska kromatografija.....	16
1.5.3.1. Plinska kromatografija – spektrometrija masa.....	18
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
2.1. Materijal .....	20
2.2. Kemikalije i aparature.....	21
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva hidrolata .....	21
2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi .....	22
2.3.2. Ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici .....	23
2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva .....	25
3. REZULTATI.....	27
4. RASPRAVA .....	32
5. ZAKLJUČCI.....	35
6. KRATICE I SIMBOLI .....	36
7. LITERATURA.....	37

## UVOD

Hlapljivi spojevi, uključujući terpene i fenolne spojeve, od ključne su važnosti za mnoge biljne vrste, a odlikuju se brojnim svojstvima koja ih čine značajnima u raznim industrijama. Ovi spojevi često doprinose karakterističnim aromama biljaka i posjeduju razne terapijske učinke.

Hlapljivi spojevi u hidrolatima mogu se izolirati različitim metodama, a najčešće su destilacija i ekstrakcija. Destilacija je klasična metoda koja omogućava razdvajanje hlapljivih komponenti prolaskom vodene pare kroz biljni materijal, čime se dobivaju aromatični i ljekoviti ekstrakti.

Nusproizvodi dobiveni tijekom destilacije eteričnih ulja nazivaju se hidrolati ili mirisne vodice, zadržavaju blagotvorne komponente biljaka, ali u nižim koncentracijama. Eterična ulja, s druge strane, predstavljaju visoko koncentrirane hlapljive spojeve koji se koriste zbog svojih aromatičnih i terapijskih svojstava. Dok su eterična ulja snažnija i često iritantnija, hidrolati su nježniji i pogodniji za osjetljivu kožu.

Osim destilacije, ekstrakcija s otapalima također se koristi za izolaciju hlapljivih spojeva. Ova metoda uključuje korištenje različitih organskih otapala koja pomažu u razdvajanju i koncentriranju željenih sastojaka. Nadalje, superkritična ekstrakcija je moderna metoda koja koristi, najčešće, superkritični ugljikov(IV) oksid kao otapalo, pružajući visoku selektivnost i očuvanje kvalitete spojeva. Svaka od ovih metoda omogućava dobivanje vrijednih hlapljivih spojeva iz hidrolata, čime se otvaraju mogućnosti za njihovu primjenu u kozmetici, aromaterapiji i medicini.

Plinska kromatografija uz masenu spektrometriju (GC-MS) smatra se najboljom tehnikom za analizu hlapljivih spojeva iz hidrolata zbog visoke osjetljivosti i točnosti u identifikaciji i kvantifikaciji sastojaka. Ova metoda omogućava precizno određivanje strukturnih karakteristika spojeva, što je ključno za analizu aromatičnih i terapijskih svojstava hidrolata. Osim toga, GC-MS može detektirati širok spektar hlapljivih spojeva, što je posebno važno u istraživanju prirodnih ekstrakata.

# 1. OPĆI DIO

Popularnost eteričnih ulja i hidrolata raste iz dana u dan zbog toga što imaju široku primjenu u različitim sferama života, od kozmetike do medicine te zbog prirodnih svojstava koji nude blagotvorne učinke na zdravlje.

Eterična ulja i hidrolati su prirodni antimikrobni lijekovi izolirani iz biljnih izvora.

Hlapljivi spojevi imaju visok tlak pare na sobnoj temperaturi i slabu topljivost u vodi. Oni su odgovorni za miris biljaka i igraju važnu ulogu u komunikaciji između biljaka i životinja. Neki od njih štite biljke od biljojeda, dok drugi privlače oprašivače.

Izoliranju smjesa hlapljivih spojeva aromatičnih biljaka pristupa se prvenstveno zbog njihove široke primjene. Osim eteričnih ulja postoje i pripravci koje se nazivaju konkretima, apsolutima i tinkturama, a predstavljaju smjese hlapljivih spojeva dobivenih iz aromatičnih biljaka. Te smjese u literaturi se nazivaju izolatima hlapljivih spojeva. U prvom redu izolati se koriste u proizvodnji lijekova, u kozmetičkoj industriji za proizvodnju preparata na prirodnoj bazi te u industriji parfema.

Najčešće korištene metode za izolaciju hlapljivih spojeva ili njihovih smjesa su metode destilacije, prešanja i ekstrakcije. Za identifikaciju izoliranih spojeva primjenjuju se razne kromatografske metode.<sup>1,2</sup>

## 1.1. Eterična ulja

**Eterična ulja** su smjesa hlapljivih organskih spojeva, često mirisnih ili aromatičnih spojeva, dobivene iz biljnog materijala različitim tehnikama destilacije.

Eterična ulja nalaze primjenu u različitim industrijama, uključujući proizvodnju mirisa, aroma te kao dodatak pićima i začinima. Osim toga, često se koristi njihovo farmakodinamičko djelovanje. Ova ulja su široko prisutna u biljnom svijetu. Iako je do sada izolirano i opisano oko 3000 različitih eteričnih ulja, u komercijalnoj upotrebi je otprilike 150 vrsta. Najzastupljenija su u biljnim porodicama Lamiaceae (usnače), Asteraceae (glavočike), Apiaceae (štitarke) i Brassicaceae (kupusnjače).<sup>1</sup>

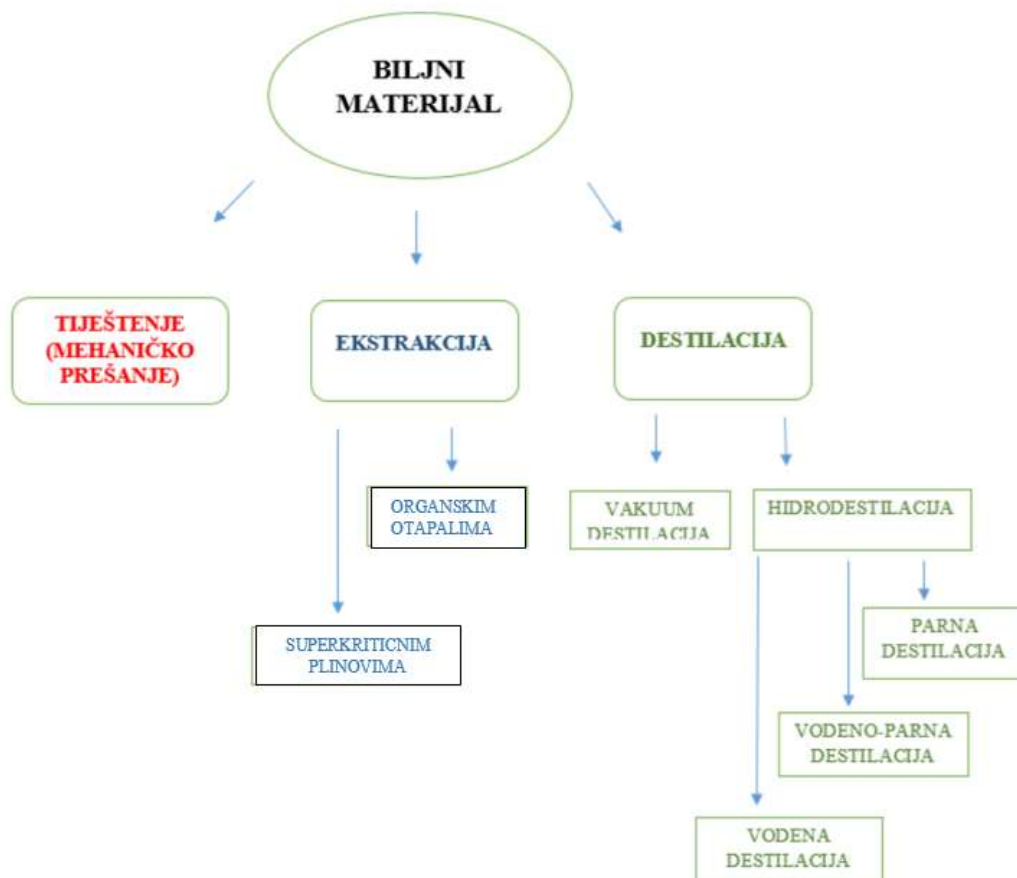
Jedna od ključnih karakteristika eteričnih ulja je njihova hlapljivost, koja omogućuje jednostavnu medicinsku primjenu putem inhalacije. Slabo se otapaju u vodi, ali se vrlo dobro otapaju u biljnim uljima, voskovima, koncentriranom etanolu i sličnim otapalima, što ih karakterizira kao lipofilne molekule. Zbog dobre topljivosti u biljnim uljima i jednostavne apsorpcije kroz kožu, eterična ulja su vrlo pogodna za uporabu u medicinskoj masaži. Većina eteričnih ulja ima vrelište iznad 150 °C.<sup>3,4</sup>

## **1.2. Izolacija eteričnih ulja**

Za odabir odgovarajuće metode izolacije, a kako bi se osigurala kvaliteta i učinkovitost eteričnih ulja, treba naglasiti ključne informacije:

- hlapljivi spojevi u biljnom materijalu obično su prisutni u malim količinama
- za dobivanje dovoljnih količina potrebnih za daljnje fizikalno-kemijske i biološke analize, neophodno je provesti preliminarnu koncentraciju isparljivih spojeva
- hlapljivi spojevi u biljkama obično čine složene smjese, koje se mogu sastojati od stotina pojedinačnih komponenti.

Najčešće metode izolacije eteričnih ulja su destilacija, ekstrakcija i tiještenje (slika 1).<sup>5</sup>



Slika 1. Shematski prikaz metoda izolacije hlapljivih spojeva

### 1.2.1. Destilacija

**Destilacija** je metoda koja se često primjenjuje u laboratoriju i industriji za razdvajanje tekućih smjesa na njihove sastavne dijelove ili za pročišćavanje tekućina. Za ovaj proces ključno je da različite tvari imaju različite temperature vrenja. U tipičnom sustavu destilacije, sirovina se zagrijava, a kako voda vrije, prelazi u paru. Komponenta koja prvo isparava jest ona sa najnižom temperaturom vrenja. Para se zatim hladi i kondenzira u tekući oblik, koji se prikuplja odvojeno. Proces se dalje nastavlja s komponentama koje imaju više temperature vrenja.

Destilacijom se mogu pročišćavati tvari poput alkohola, nafte i eteričnih ulja za različite svrhe u farmaceutskim, naftnim i parfemskim industrijama.<sup>6</sup>

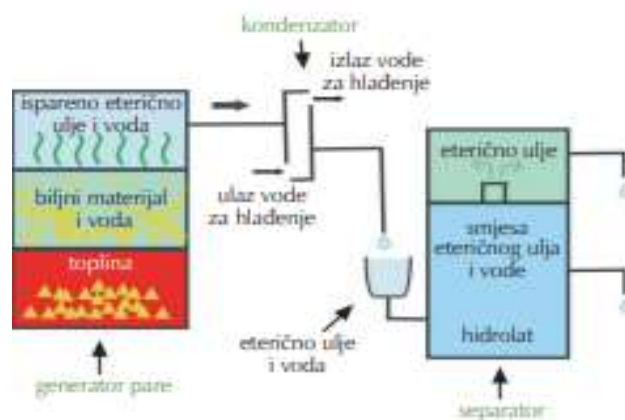


Kao nusproizvod tijekom destilacije eteričnog ulja, nastaje **hidrolat**, također poznat kao mirisna vodica. U procesu destilacije, vodena para koja se koristi za ekstrakciju eteričnih ulja hladi se (kondenzira) zajedno s uljem. Budući da se eterična ulja slabo otapaju u vodi, ona obično ostaje na površini, dok voda, zasićena spojevima iz eteričnih ulja, formira donji sloj. Ova aromatična vodica, poznata kao hidrolat ili cvjetna vodica, posjeduje ljekovita svojstva i često se koristi u kozmetici i aromaterapiji zbog svojih blagotvornih učinaka na kožu i opće zdravlje.<sup>7</sup>

Podjela destilacija obzirom na kontakt biljnog materijala i vode:

- **Vodena destilacija (hidrodestilacija)**

Vodena destilacija je najstarija korištena metoda, ali i najčešća za izolaciju eteričnih ulja u laboratoriju. Usitnjeni biljni materijal se stavlja u tikvicu s vodom (biljni materijal je u izravnom kontaktu s vodom) koja se zagrijava do temperature vrenja. Nastale pare eteričnog ulja i vode se kondenziraju u hladilu i sakupljaju u središnjem dijelu aparature (slika 2).



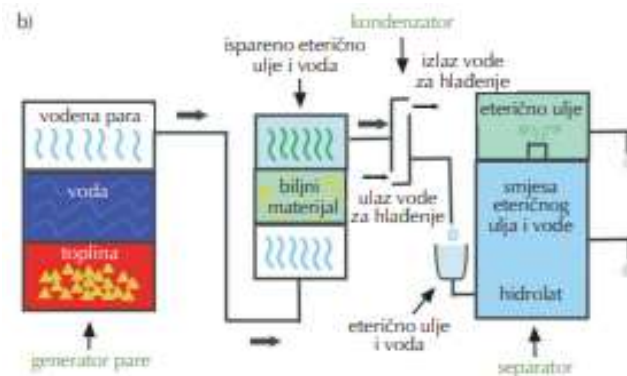
Slika 2. Shematski prikaz postupka vodene destilacije

- **Vodeno-parna destilacija**

Kod vodeno-parne destilacije biljni materijal nije u kontaktu s vodom, već samo sa parom. Voda se grije kao i kod hidrodestilacije, ali u ovom slučaju vlažna para niskog tlaka podiže se kroz biljni materijal. Postupak se češće koristi za izolaciju eteričnih ulja koja su manje osjetljiva na visoke temperature.

- **Parna destilacija**

Kod parne destilacije, vodena para iz generatora pare se uvodi sa dna, a biljni materijal postavljen je u drugu tikvicu i nije u kontaktu s vodom (slika 3). Ovaj postupak je pogodan za regeneraciju isparljivih spojeva dobivenih ekstrakcijom mastima i biljnim uljima.<sup>5,8,9</sup>



Slika 3. Shematski prikaz postupka parne destilacije

### 1.2.2. Tiještenje

**Tiještenje** eteričnog ulja ne zahtijeva toplinu, a najčešće se upotrebljava za izoliranje eteričnog ulja iz kore citrusa (Rutaceae).

Metoda hladnog tiještenja (engl. *cold expression*) je jednostavna tehnika za izdvajanje aromatičnih komponenti prisutnih u sirovom biljnom materijalu pritiskom biljke. Rezultira visokokvalitetnim proizvodima s mirisima gotovo identičnim onima izvornog ploda. Komponente dobivene ovom metodom obično se razdvajaju na vodu i eterično ulje.<sup>5,10,11</sup>

### 1.2.3. Ekstrakcija

**Ekstrakcija** je proces odjeljivanja tvari iz biljnih materijala na temelju različite topljivosti u ekstrakcijskom sredstvu.

U industriji parfema, moderna proizvodnja mirisnih spojeva najčešće se obavlja ekstrakcijom, koristeći hlapljiva otapala poput petroletera i heksana. Prednost ekstrakcije u odnosu na destilaciju je što se tijekom procesa može održavati stalna temperatura (obično 50 °C). To omogućuje da dobivene smjese hlapljivih spojeva sačuvaju prirodniji miris, koji nije promijenjen zbog utjecaja visoke temperature.

- Ekstrakcija organskim otapalima

Odabir otapala temelji se na njihovoj polarnosti i temperaturi vrenja. Najčešće se koristi dietil-eter zbog karakteristika poput visoke hlapljivosti, dobre sposobnosti otapanja te ekstrahiranja nepolarnih ili slabo polarnih spojeva iz biljnog materijala. Hlapljivi spojevi se direktno izoliraju iz biljnog materijala. Postupak uključuje potapanje biljnog materijala u organsko otapalo tijekom određenog vremenskog perioda koje iz biljnog materijala ekstrahira hlapljive spojeve. Za uklanjanje biljnog materijala, nakon ekstrakcije slijedi dekantiranje i/ili filtriranje, nakon čega se otapalo otparuje nekom od metoda destilacije. Ekstrakcijom organskim otapalima kao što je heksan i benzen dobivaju se konkretni i apsoluti. To nisu eterična ulja i ne mogu se primjenjivati u aromaterapiji.

Nedostaci ovog postupka uključuju moguće gubitke lako hlapljivih spojeva tijekom isparavanja otapala, dok neki nehlapljivi spojevi mogu zaostati u ekstraktu.<sup>5,8,12</sup>

- Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima temelji se na povećanju moći otapanja fluida iznad njihove kritične točke u faznom dijagramu. Ugljikov(IV) oksid u superkritičnom stanju ( $p = 73,8$  bar i  $T = 31,1$  °C) je najčešće korišten plin za ovu metodu, zbog niske toksičnosti i kemijske inertnosti. U CO<sub>2</sub> ekstrakciji, ugljikov(IV) oksid se izlaže specifičnim temperaturama i pritiscima kako bi se postigli željeni rezultati.

Ova metoda omogućuje:

- primjenu niže temperature – očuvanje toplinski osjetljivih komponenti eteričnih ulja
- odsustvo kisika – smanjuje se oksidacija, čime se očuvaju komponente osjetljive na oksidaciju

- veću selektivnost i učinkovitiji prijenos mase - precizno izdvajanje ciljnih komponenti, rezultira duljim rokom trajanja eteričnih ulja
- čišći proces.

Nedostatci ove metode jesu:

- veći troškovi i tehnološki zatjevi – metoda je skuplja i zahtijeva specijaliziranu opremu u usporedbi s već navedenim metodama izolacije eteričnog ulja.<sup>5,12,13</sup>

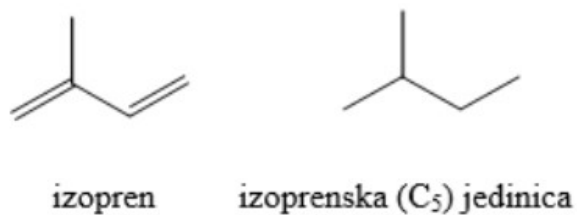
### **1.3. Kemijski sastav eteričnih ulja i hidrolata**

Eterična ulja sastoje se od brojnih kemijskih spojeva, od kojih su neki prisutni u većim količinama, dok se drugi pojavljuju u tragovima (< 1 %). **U kemijskom sastavu eteričnih ulja i hidrolata** dominiraju terpenški i fenilpropanski spojevi.

#### **1.3.1. Terpeni**

Hlapljivi spojevi koji biljkama i cvijeću daju karakterističan miris većinom spadaju u skupinu prirodnih organskih spojeva koji se nazivaju terpeni.. Mnoge biljke proizvode hlapljive terpene kako bi privukle određene insekte radi oprašivanja ili odbile određene životinje. Osim toga, terpeni imaju ključnu ulogu kao signalni spojevi i regulatori rasta (fitohormoni).

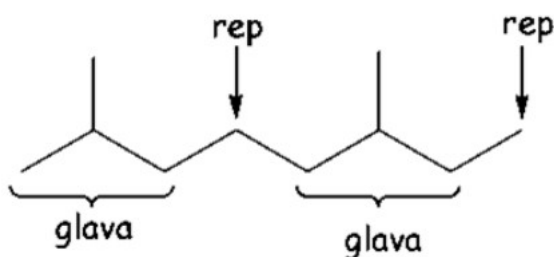
Poznato je oko 30.000 različitih terpena, a njihova je osnovna struktura spoj izgrađen od 5 ugljikovih atoma, trivijalnog imena izopren (po IUPAC-u 2-metilbuta-1,3-dien; slika 4).



Slika 4. Strukturna formula izoprena, odnosno izoprenske jedinice

Lavoslav Ružička je 1922. godine prvi postavio hipotezu o biogenezi izoprenoida te je utvrdio zajedničku strukturnu jedinicu svim terpenima. Zbog ovog važnog otkrića dobio je Nobelovu nagradu za kemiju 1939. godine.

Većina terpenoida sastoji se od izoprenskih jedinica povezanih po načelu "glava na rep", a to pravilo se naziva izoprenskim pravilom (slika 5).



Slika 5. Izoprensko pravilo

Terpeni se dijele prema broju  $n$  u općoj formuli  $(C_5H_8)_n$ , odnosno broju ugljikovih atoma (ili izoprenskih jedinica) (tablica 1).

Mnoge molekule s 10 ili 15 ugljikovih atoma posjeduju značajnu biološku aktivnost, uključujući antimikrobna, antifungalna, antioksidativna, protuupalna, insekticidna, analgetska, antikancerogena i citotoksična svojstva. Zbog potencijalne toksičnosti nekih od ovih tvari, osobito u čistom obliku, potrebno je oprezno rukovanje.

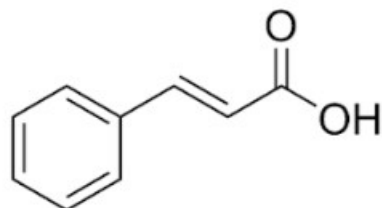
Tablica 1. Podjela terpena

NAZIV	BROJ C ATOMA	BROJ IZOPRENSKIH JEDINICA
Semiterpeni	5	1
Monoterpeni	10	2
Seskviterpeni	15	3
Diterpeni	20	4
Triterpeni	30	6
Tetraterpeni	40	8
Politerpeni	(5) <sub>n</sub>	n

Terpeni, ovisno o prisutnosti funkcijskih skupina, mogu biti ugljikovodici, alkoholi, aldehidi, esteri, ketoni i drugi spojevi. Također mogu imati različite strukturne oblike, uključujući acikličke (alifatske), cikličke (mono-, bi-, tri- itd.) i aromatske spojeve.<sup>14-17</sup>

### 1.3.2. Fenilpropanski spojevi

Fenilpropanski spojevi spadaju u veliku skupinu prirodnih organskih spojeva - fenolne spojeve ili, kraće, fenole. Osnovna značajka fenolnih spojeva je prisutnost barem jednog aromatskog prstena s barem jednom hidroksilnom skupinom vezanom za njega. **Fenilpropanski spojevi** (fenilpropanoidi) smatraju se derivatima cimetine kiseline (slika 6). Osnovu fenilpropanske građevne jedinice čine fenilni prsten za koji je vezan bočni lanac od tri ugljikova atoma. Fenilpropanski spojevi biosintetiziraju se iz aminokiselina fenilalanin i tirozin, koje su produkti šikiminskog biosintetskog puta.



Slika 6. Cimetna kiselina<sup>19</sup>

Većina enola pokazuje biološku aktivnost protiv različitih mikroorganizama, uključujući bakterije, gljivice i viruse. Eterična ulja bogata fenolima biljke koriste vjerojatno kao obranu od mikroorganizama u svom okolišu.

U eteričnim uljima eugenol je jedan od najvažnijih fenilpropenskih spojeva.<sup>16, 17</sup>

#### 1.4. Djelovanje i upotreba hidrolata

**Hidrolati** se u kozmetici koriste kao prirodni tonici ili kao vodena faza u formulacijama krema, gelova, emulzija i maski. Često su među najnježnijim i najprikladnijim tonicima za kožu koji su razvijeni kroz povijest. Stoga su hidrolati privlačni onima koji preferiraju sigurnije i manje iritirajuće preparate.

Za razliku od eteričnih ulja, koja su vrlo koncentrirana, hidrolati su blagi i neškodljivi. U kozmetici, posebno su korisni za osobe koje su vrlo osjetljive na eterična ulja te u emulzijskim sastavima pružaju ugodan miris bez potrebe za eteričnim uljima.

Većina hidrolata sklona je "kvarenju" i relativno brzo može izgubiti olfaktorne osobine.

Osim u kozmetičke svrhe, hidrolati se mogu primjenjivati i u kulinarstvu te u terapijske svrhe, kao što su kapi za nos, oči, uši te za vaginalna ispiranja. Važno je napomenuti da se za upotrebu hidrolata kao kapi za nos ili za vaginalna ispiranja moraju izotonizirati, dok je kod kapi za oči nužno prilagoditi i pH vrijednost.<sup>7,20</sup>

#### 1.4.1. Hidrolat lavande

Najstarija i najpoznatija uzgojena uskolisna vrsta **lavande** je *Lavandula angustifolia*, koja se često naziva prava lavanda. Tipična boja cvjetova je plavo-ljubičasta, karakteristična za lavandu. Ljekovita svojstva lavande uljučuje smanjenje živčane napetosti, što je korisno kod migrene i neuralgije. Također ublažava grčeve i djeluje kao karminativ, pomažući u smanjenju napuhavanja. Pored toga, lavanda pomaže i u zacjeljivanju rana.<sup>1</sup>



Slika 8. *Lavandula angustifolia*<sup>24</sup>

Hidrolat lavande jedan je od najcjenjenijih prirodnih hidrolata, poznat po svojoj učinkovitosti u njezi svih vrsta kože. Zahvaljujući svojim umirujućim svojstvima, idealan je i za najosjetljiviju kožu, a istovremeno pruža hidrataciju zreloj koži lica te je ujedno i dovoljno lagan za masan tip kože. Pomaže u liječenju akni i prištića, pa samim time smanjuje upalne procese na koži. Primjenjuje se po potrebi na ubode insekata poput komaraca, muha te pruža olakšanje smanjujući oticanje.<sup>25,26</sup>

#### 1.4.2. Hidrolat smilja

**Primorsko smilje** (*Helichrysum italicum*) je veoma posebno bilje koje je, zbog svojeg negujućeg djelovanja na kožu, pronašlo primjenu u prirodnoj kozmetici. Naziva se i još



dugovječnom biljkom. Istraživanja su pokazala da ima protuupalna, antioksidativna, antimikrobiološka, antivirusna svojstva.



Slika 7. *Helichrysum italicum*<sup>22</sup>

Hidrolat smilja posjeduje analgetska, antiinfektivna, protuupalna, antikoagulantna, ekspektorirajuća, lipolitična, mukolitična i sedativna svojstva. Također, ima regenerirajući učinak koji pomaže u smanjenju vidljivosti svježih ožiljaka, potiče brže zacjeljivanje rana, masnica i upalnih stanja kože te je učinkovit u liječenju paradontoze i gingivitisa. Može se koristiti i kao tonik za čišćenje i njegu kože lica. Zbog svojih brojnih učinaka, ugodnog mirisa i mogućnosti lokalne primjene bez potrebe za razrjeđivanjem, hidrolat smilja nalazi široku primjenu u kozmetičkoj industriji te u industriji sapuna i mirisa.<sup>9,21,23</sup>

#### 1.4.3. Hidrolat geranija

**Geranij** (*Pelargonium graveolens*) pripada porodici Geraniaceae, a vrste *Pelargonium* stoljećima su poznate u tradicijskim aromaterapijama raznih kultura. Ova biljka se tradicionalno koristi na području zapadnog Balkana kao aroma u alkoholnim i bezalkoholnim pićima, a posebno u proizvodima s ružičastom bojom. Zbog svog snažnog i intenzivnog mirisa, koji podsjeća na ružu, često se koristi u izradi parfema i kozmetičkih proizvoda. Osim toga, geranij je prepoznatljiv po svojim snažnim antimikrobnim svojstvima te protuupalnom djelovanju.<sup>28,29,30</sup>



Slika 9. *Pelargonium graveolens*<sup>27</sup>

Hidrolat geranija pogodan je za njegu gotovo svih tipova kože: masne kože sklone aknama, suhe, osjetljive i problematične kože. Također, zbog svoje sposobnosti zaustavljanja manjih krvarenja, može pomoći i kod stanja gdje je prisutno crvenilo kože, poput kuperoze i rozaceje. Ublažava iritacije kože uzrokovane ubodima insekata, te umiruje opekline nastale prilikom sunčanja. Njegov osvježavajući miris podiže raspoloženje i pruža osjećaj mira, što ga čini odličnim izborom za liječenje depresije, tjeskobe i stresa. U prehrambenoj industriji dodaje bogat okus slasticama i umacima.<sup>31,32</sup>

### **1.5. Obrada hidrolata - izolacija i analiza hlapljivih spojeva**

Za izolaciju hlapljivih spojeva hidrolata najčešće korištene metode su ekstrakcija, odnosno razne konvencionalne tehnike ekstrakcije, i tehnika mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi.

Za analizu hlapljivih spojeva hidrolata najčešće se upotrebljava plinska kromatografija, odnosno plinska kromatografija-spektrometrija masa.

### 1.5.1. Ekstrakcija

**Ekstrakcija** hlapljivih organskih spojeva još se uvijek uglavnom provodi pomoću organskih otapala, kako za tekuće (ekstrakcija tekućina-tekućina) tako i za čvrste uzorke (Soxhlet ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija). Obično se ekstrahiraju mikrosastojci, pa otapala moraju biti visoke čistoće, što rezultira visokim troškovima. Mnoga od njih su toksična, čak i kancerogena, a njihovo zbrinjavanje je problematično. Klasične tehnike ekstrakcije obično uključuju mnogo koraka, uključujući pročišćavanje ekstrakta, što dovodi do većih gubitaka analita i duljeg vremena pripreme uzorka.

Nedostaci konvencionalnih tehnika ekstrakcije, osobito upotreba velikih količina organskih otapala, doveli su do razvoja novih metoda čije su glavne prednosti brzina i manji volumen korištenih otapala.

Metode ekstrakcije s malo ili bez organskih otapala mogu se podijeliti u tri skupine prema ekstrakcijskom mediju: ekstrakcije u plinskoj fazi, membranske ekstrakcije i sorpcijske ekstrakcije. Ekstrakcije u plinskoj fazi uključuju statičke metode s *headspaceom*, koristeći ravnotežnu plinsku fazu iznad uzorka te metode "purge-and-trap" ili dinamičkog *headspacea*, gdje se plin propušta kroz uzorak kako bi istjerao hlapljive komponente koje se zatim prikupljaju. Superkritična fluidna ekstrakcija (engl. *Supercritical fluid extraction*, SFE) također spada u ovu skupinu, omogućujući separaciju čak i manje hlapljivih spojeva iz čvrstih uzoraka.<sup>35</sup>

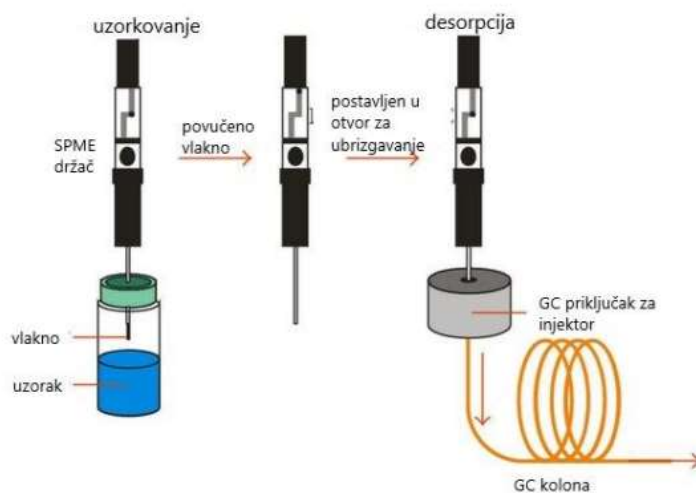
### 1.5.2. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

**Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi** (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) koristi silikonsko vlakno prekriveno polimernim filmom koje služi za adsorpciju hlapljivih spojeva, time omogućujući njihovu izolaciju iz uzoraka koji mogu biti kruti ili tekući,. Vlakno se nalazi u sastavu igle koja je postavljena na SPME držač

za uzorkovanje (adsorpciju) i desorpciju. Uzorak se stavlja u posudu koja se hermetički zatvori. Posuda s uzorkom se zagrijava, a u praznom prostoru iznad uzorka sakupljaju se hlapljivi spojevi. U posudu se uvodi vlakno na koje se adsorbiraju hlapljivi spojevi (tzv. vršne pare) koji su isparili iz uzorka tijekom zagrijavanja. Vlakno se nakon toga uvlači te se dalje nastavlja analiza umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa.

Prednosti ove metode uključuju brzinu, jednostavnost, bez potrebe za otapalom, što je čini prikladnom za brzu usporedbu uzoraka i identifikaciju nepoželjnih hlapljivih spojeva, npr. mirisa. Međutim, rezultati ovise o vrsti vlakna, temperaturi i vremenu uzorkovanja.

Općenito, headspace tehnika (HS) je separacijska metoda koja omogućuje izolaciju lakohlapljivih tvari iz složenih matriksa i njihovu automatsku injekciju u plinski kromatograf za analizu. Ova tehnika uključuje ekstrakciju plinovite faze, gdje se analiti raspodjeljuju između nehlapljive tekuće ili krute faze i plinovite faze koja se nalazi iznad uzorka tekućine ili krutine (slika 10).<sup>33,36</sup>



Slika 10. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi<sup>34</sup>

### 1.5.3. Plinska kromatografija

**Plinska kromatografija** je kromatografska tehnika koja se koristi za odjeljivanje komponenti smjesa spojeva u plinovitom stanju, često je primjenjivana u analitičkoj kemiji,

a sve više se koristi i u fiziološkim laboratorijima. Ova tehnika je svestranija, preciznija, jednostavnija za uporabu i manje ovisi o tehničkoj vještini nego mnoge tradicionalne metode za identifikaciju spojeva.

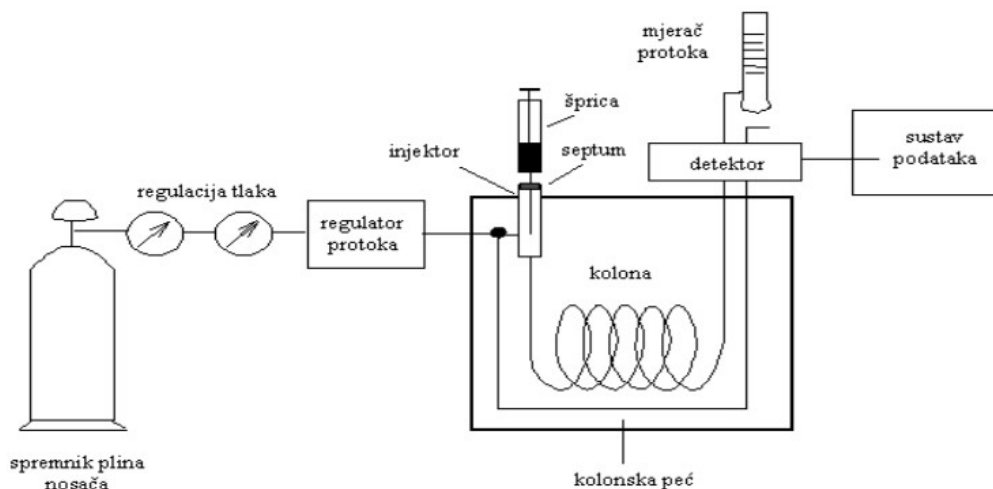
Za analizu uzorci moraju biti hlapljivi, kako bi isparili u injektoru, te stabilni na temperaturama koje se koriste unutar kromatografske kolone. Inertni plin prenosi sastojke smjese kroz kolonu, gdje se razdjeljuju između stacionarne i mobilne faze, ovisno o njihovoj topljivosti u stacionarnoj fazi. Komponenta koja je najmanje topljiva u stacionarnoj fazi prva izlazi iz kolone i dolazi do detektora. Plinska kromatografija dijeli se na apsorpcijsku, gdje je nepokretna faza čvrsta, i razdjelnu, gdje je nepokretna faza nehlapljiva tekućina.

Plinska kromatografija je najčešće upotrebljavana tehnika za identifikaciji komponenata hidrolata i eteričnih ulja zbog njezine učinkovitost u separaciji individualnih hlapljivih sastojaka.

Plinski kromatograf (slika 11) se može zamisliti kao molekularni filter koji selektivno usporava prolazak molekula na temelju njihovih fizičkih karakteristika, poput oblika, veličine, težine i vrelišta. Smjesa plinova, tijekom prolaska kroz kromatograf, razdjeljuje se na svoje sastavne dijelove, koji zatim izlaze s daljnjeg kraja kolone u određenom redosljedju.

Te komponente detektira uređaj čiji se odziv može zabilježiti grafički ili elektronički. Kako bi se uzorak proveo kroz kromatograf, potreban je plin nositelj.

Za odvajanje sastojaka koristi se postupak eluiranja, pri čemu se sastojci smjese odvajaju i izlaze iz kolone pomiješani samo s plinom nositeljem. Svakom eluiranom sastojku karakteristično je vrijeme zadržavanja, poznato kao retencijsko vrijeme ( $t_R$ ). Retencijsko vrijeme predstavlja razdoblje između injektiranja uzorka i pojave signala na detektoru. Mjeri se od trenutka kad je uzorak injektiran do trenutka kada se na detektoru pojavi maksimum pika za određeni sastojak. Ovo vrijeme ovisi ne samo o prirodi sastojka i stacionarne faze, već i o protoku i vrsti plina nositelja, temperaturi i drugim faktorima.<sup>17,37</sup>

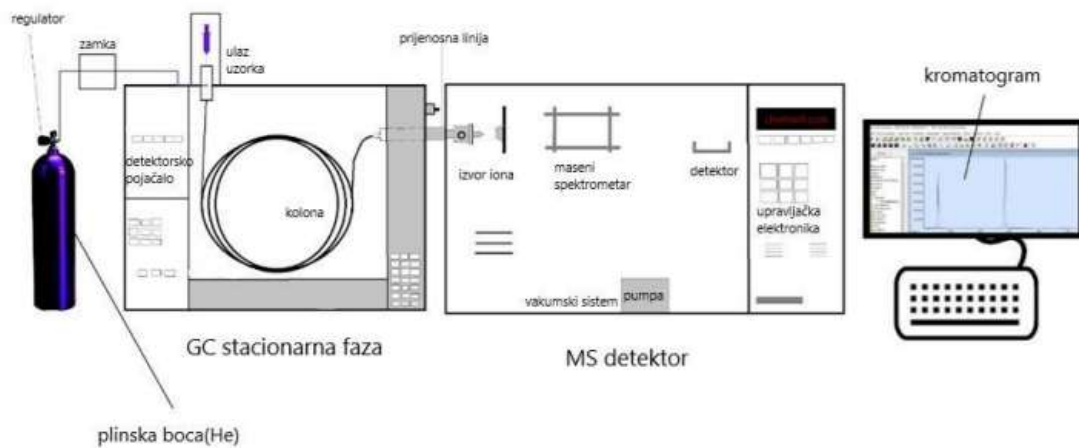


Slika 11. Shematski prikaz plinskog kromatografa<sup>38</sup>

### 1.5.3.1. Plinska kromatografija – spektrometrija masa

Instrumentna metoda koja se pokazala najučinkovitijom za analizu hlapljivih spojeva eteričnih ulja i hidrolata je plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS). Vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa povezan s računalom (slika 12) predstavlja moćnu tehniku za identifikaciju sastojaka u smjesama hlapljivih spojeva, koristeći minimalnu količinu materijala. Ove dvije tehnike se idealno nadopunjuju: plinska kromatografija odvaja komponente u plinskoj fazi, dok spektrometrija masa omogućava njihovu preciznu kvalitativnu analizu.

Ova tehnika se odlikuje visokom osjetljivošću, pouzdanošću, preciznošću, selektivnošću i potrebom za vrlo malim količinama uzorka, što je čini jednom od najpopularnijih instrumentnih metoda u analitičkim laboratorijima. GC-MS sustav sastoji se od tri glavne komponente: jedinice za ubrizgavanje uzorka koja zagrijava i isparava tekući uzorak, kolone koja odvaja spojeve te detektora koji identificira spojeve i prikazuje njihove koncentracije kao električne signale.



Slika 12. Prikaz sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa<sup>43</sup>

Dobar izvještaj o GC-MS analizi hidrolata trebao bi navesti postotak hlapljivih komponenti. Taj postotak može se pretvoriti u mjerenje u mg/L (miligrami po litru); mg/L je isto što i ppm (dijelovi na milijun).<sup>40-42</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Materijal

Za izradu ovog završnog rada, korišteni su sljedeći hidrolati (slika 13):

- Hidrolat lavande

Naziv: *Lavandula angustifolia*

Proizvođač: Fitoaroma, Svijet biljaka d.o.o., Vodnjan, Hrvatska

- Hidrolat smilja

Naziv: *Helichrysum italicum*

Proizvođač: Fitoaroma, Svijet biljaka d.o.o., Vodnjan, Hrvatska

- Hidrolat geranija

Naziv: *Pelargonium graveolens*

Proizvođač: Fitoaroma, Svijet biljaka d.o.o., Vodnjan, Hrvatska



Slika 13. Hidrolati smilja, geranija i lavande



## 2.2. Kemikalije i aparature

Potrebne kemikalije:

- pentan, p.a., BDH Prolabo, Velika Britanija
- dietil-eter, p.a, Kemika, Hrvatska
- natrijev klorid, tehn.
- natrijev sulfat, bezv., Kemika, Hrvatska.

Za izradu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće aparature:

- tehnička vaga ADAM, model PGW 1502i, ADAM®, Velika Britanija
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi sa SPME vlaknom sa polimernim slojem sastava divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS, sivo vlakno), Supelco Inc., SAD
- magnetska miješalica Heidolph, model MR Hei-End, s temperaturnim senzorom Pt 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Njemačka
- aparatura za frakcijsku destilaciju, Deotto lab d.o.o., Hrvatska
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 7890A i spektrometar masa model 5975C.

## 2.3. Izolacija hlapljivih spojeva hidrolata

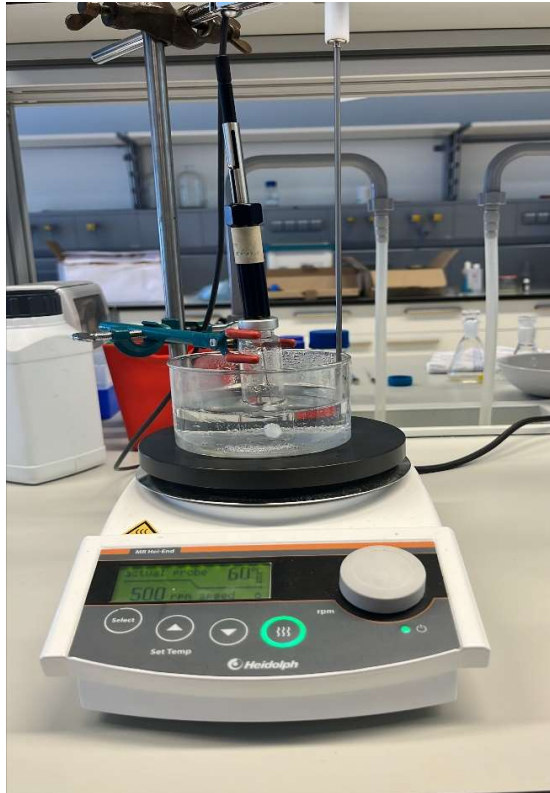
Hlapljivi spojevi hidrolata izolirani su iz hidrolata lavande, smilja i geranija tehnikom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi i konvencionalnom ekstrakcijom organskim otapalom koja se provela miješanjem na magnetnoj miješalici. Za identifikaciju hlapljivih spojeva hidrolata provedena je GC-MS analiza.

### 2.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Prije same pripreme uzorka, potrebno je zagrijati vodenu kupelj na 60 °C. U veliku je vialicu stavljeno 5 mL hidrolata te 2 žličice NaCl. Kada se sol otopila u hidrolatu, stavljen je magnetič te je vialica hermetički zatvorena s teflonskom septom. U već zagrijanu kupelj stavljen je pripremljeni uzorak koji je termostatiran uz miješanje 15 minuta brzinom od 500 rpm. U tom vremenskom periodu termostatiranja hlapljivi spojevi iz uzorka su isparili u prazni prostor iznad uzorka, tzv. *headspace*. Uobičajeni naziv, za na taj način oslobođene hlapljive spojeve, je vršne pare (engl *headspace volatiles*).

U skladu s uputama, sivo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 minuta pri 300 °C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzorka.

Nakon kondicioniranja vlakna, u prazni prostor iznad uzorka uvedena je igla s vlaknom koje je spušteno toliko da ne dotiče tekućinu. Adsorpcija hlapljivih spojeva, tj. vršnih para trajala je 40 minuta (slika 14).



Slika 14. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi

Nakon adsorpcije je vlakno vraćeno u iglu, izvučeno iz vialice te je odmah umetnutno u GC-MS injektor gdje se odvija desorpcija hlapljivih spojeva izravno u GC kolonu (10 minuta). Prije ponovnog korištenja vlakna za adsorpciju potrebno je hlađenje pri sobnoj temperaturi 10 minuta.

### 2.3.2. Ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici

U Erlenmeyerovoj tikvici od 250 mL pripremljena je smjesa 50 mL uzorka (hidrolata) i 24 mL smjese otapala pentan:dietil-eter, 1:2, v/v (8 mL i 16 ml) u koju je dodano 3 žličice NaCl i magnetič. Dietil-eter je prethodno pročišćen frakcijskom destilacijom da bi se uklonio stabilizator, butilhidroksitoluen (BHT).

Erlenmeyerova tikvica je stavljena na magnetsku mješalicu 45 minuta uz brzinu miješanja od 500 rpm. Zbog hlapljivih komponenti tikvice su dodatno osigurane crvenim klipsama na čepovima, da čepovi ne bi izletjeli tijekom miješanja (slika 15).



Slika 15. Ekstrakcija miješanjem na magnetskoj mješalici

Nakon 45 minuta otopina je filtrirana preko lijevka. Nakon filtriranja tikvica s otopinom je ostavljena da se odvoje slojevi. Gornji, organski sloj je potom osušen (uklonjen je višak vode) tako da je profiltriran kroz lijevak u koji je umetnuta pamučna vata i sloj bezvodnog natrijevog sulfata. Organski sloj je odvajan iz Erlenmeyerove tikvice u kojoj je provedena ekstrakcija kapaljkom i polako dokapavan u suhu Erlenmeyerovu tikvicu preko lijevka (slika 16).



Slika 16. Filtracija preko lijevka

Filtrirana i osušena otopina hlapljivih spojeva potom je prebačena u tikvicu s okruglim dnom koja je dio aparature za frakcijsku destilaciju (slika 17) ubačena su 2 kamenčića za vrenje te je provedena destilacija. Destilacija je trajala 10-15 minuta, sve dok otapalo, smjesa pentan-dietil-eter, nije u potpunosti otpareno. Ostatak u okrugloj tikvici je smjesa hlapljivih spojeva.



Slika 17. Frakcijska destilacija

## 2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analize uzoraka, vršnih para i pentan-dietil-eterskog ekstrakta, provedene su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) (slika 18) na HP-5MS koloni. HP-5MS kolona je kolona s nepolarnom stacionarnom fazom. Kemijski sastav stacionarne faze je 5 % difenil – 95 % dimetilpolisiloksan. Dimenzije kolone: duljina 30 m, unutarnji promjer 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ .

Plin nositelj bio je helij protoka 1 mL/min. Temperatura injektora je bila 250 °C, a omjer cijepanja 1:50. Temperaturni program pri kojem se odvijalo razdjeljivanje smjese na pojedinačne spojeve bio je: 2 min pri 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom 3 °C min<sup>-1</sup> te zadržavanje 2 min pri 200 °C. Prve tri minute analize se odvija tzv.

*solvent delay*, a to je vrijeme eliminacije spojeva sa najmanjom masom (najčešće otapala kao što su u ovom slučaju pentan i dietil-eter), koji bi mogli utjecati na kvalitetu podataka. Energija ionizacije je bila 70 eV, temperatura ionskog izvora 230 °C, a temperatura detektora 280 °C. GC-MS analize su trajale 63 minute.

- Vršne pare

Nakon što je vlakno umetnuto u injektor GC-MS uređaja, u periodu od 10 minuta je došlo do desorpcije vršnih para s vlakna.



Slika 18. Uređaj za GC-MS analizu

Pentan-dietil-eterski ekstrakt koji je dobiven frakcijskom destilacijom, ručno je injektiran pomoću igle u injektor GC-MS uređaja. Iгла za injektiranje je prethodno isprana više puta s pentanom te je za analizu uzeta (injektirano) 2  $\mu$ L.

Informacije dobivene za svaki analizirani uzorak pomoću GC-MS sustava su: kromatogram ukupne ionske struje, vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) svakog sastojka smjese, relativni udio svakog sastojka izražen u postocima te naziv spoja čiji je spektar najbliži spektru nepoznatog sastojka. Identifikacija pojedinačnih sastojaka provedena je samo usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima dostupnima u komercijalnoj bazi podataka NIST 20.

### 3. REZULTATI

Rezultati analiza hlapljivih spojeva hidrolata lavande, smilja i geranija prikazani su u tablicama 2 – 4. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je ekstrakcijom smjesom otapala pentan-dietil-eter miješanjem na magnetskoj miješalici (u tablicama ekstrakt) i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (u tablicama vršne pare). Analiza ekstrakata i vršnih para provedena je plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa. U tablicama je dan kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u pojedinim uzorcima. Udjeli identificiranih spojeva su relativni, odnosno to su udjeli površine pika identificiranog spoja u ukupnoj površini svih pikova na kromatogramu. Spojevi su poredani prema redosljedu ispiranja s nepolarne kromatografske kolone.

Značenje simbola u tablicama je:

$t_R$  - vrijeme zadržavanja

/ - spoj nije identificiran u uzorku

<sup>a</sup> - identifikacija isključivo usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i/ili NIST20 biblioteka masenih spektara.

**Tablica 2.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u hidrolatu lavande

Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%) Ekstrakt	Udio (%) Vršne pare
5,5-dimetil-2(5H)-furanon	5,210	1,68	/
okt-1-en-3-ol	5,830	/	0,63
1,4-cineol	7,426	/	1,70
benzil-alkohol	7,495	1,41	/
$\gamma$ -vinil- $\gamma$ -valerolakton	7,699	1,75	/
<i>cis</i> -linalool oksid	9,342	4,64	2,14
linalol	9,742	1,43	16,00
6-metilhepta-3,5-dien-2-on	9,944	/	0,57

2-feniletanol	10,253	0,87	/
kamfor	11,470	/	1,68
L-menton	11,833	/	0,56
4-izopropilcikloheksanon	12,005	/	1,39
borneol	12,306	1,60	8,46
<i>trans</i> -linalol oksid	12,427	2,44	/
terpinen-4-ol	12,757	5,35	26,38
<i>p</i> -cimen-8-ol	12,952	1,35	1,59
4-izopropilcikloheks-2-enon	13,104	2,21	2,84
$\alpha$ -terpineol	13,295	10,75	24,77
eukarvon	14,037	/	0,48
geranil-izobutirat	14,861	/	1,72
6,7-dihidro-7-hidroksilinalol	14,877	32,48	/
karvon	15,472	/	0,30
geraniol	15,941	/	2,33
<i>p</i> -cimen-7-ol	17,447	/	0,73
<i>p</i> -mentan-1,8-diol	17,967	10,57	/
<i>trans</i> -2,7-dimetilokta-4,6-dien-2-ol <sup>a</sup>	18,883	1,31	/
( <i>E</i> )-3,7-dimetilokta-2,6-dien-1-il <sup>a</sup>			
propil-karbonat <sup>a</sup>	21,652	2,06	/
kumarin	23,309	2,39	0,35
<b>Ukupno identificirano (%)</b>		<b>84,29</b>	<b>94,62</b>

**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u hidrolatu smilja

Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%) Ekstrakt	Udio (%) Vršne pare
4-metilheksan-3-on	3,063	/	0,65
2-metilbutanska kiselina	3,137	9,24	/
( <i>Z</i> )-2-metilbutanska kiselina	3,797	3,76	/



4-metilpentanska kiselina	4,944	1,07	/
heksanska kiselina	5,772	2,16	/
$\beta$ -mircen	6,222	/	0,59
1,8-cineol	7,398	/	1,73
benzil-alkohol	7,495	9,47	
<i>cis</i> -linalol oksid	8,785	0,62	
<i>p</i> -krezol	8,883	1,26	
2,4-dimetilheptan-3,5-dion	9,647	1,13	0,38
linalol	9,730	2,95	19,84
fenhon	10,304	/	0,89
2-feniletanol	10,257	6,79	/
<i>trans</i> -pinokarveol	11,269	/	0,39
kamfor	11,478	/	0,99
nerol oksid	11,852	/	1,02
borneol	12,301	1,58	3,81
terpinen-4-ol	12,743	2,26	9,85
oktan-3,5-dion	13,125	3,04	6,05
$\alpha$ -terpineol	13,286	15,38	22,26
nerol	14,873	/	4,59
6,7-dihidro-7-hidroksilinalol	14,874	12,51	/
<i>N</i> -acetil-4-fluoro-2-piridone <sup>a</sup>	15,005	/	1,10
geraniol	15,941	0,92	3,11
citral	16,587	/	0,37
4-metoksibenzil-alkohol	17,098	1,39	/
seudenon <sup>a</sup>	17,750	1,07	/
<i>p</i> -mentan-1,8-diol	17,968	4,42	/
4-hidroksi-2-metilacetofenon <sup>a</sup>	18,113	5,98	/
4-hidroksi-3-metilacetofenon <sup>a</sup>	18,132	/	1,49
4-metoksifenilmetilkarbinol <sup>a</sup>	18,289	0,85	/
3-alilgvajakol <sup>a</sup>	20,199	/	0,84
4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion <sup>a</sup>	23,609	2,82	11,08

$\alpha$ -kurkumen	25,274	0,56	/
2,4,6,9-tetrametildec-8-en			
-3,5-dion <sup>a</sup>	25,340	/	1,17
2-etilbut-2-enal <sup>a</sup>	36,369	1,33	/
klovanediol <sup>a</sup>	39,328	2,15	/
<b>Ukupno identificirano (%)</b>		<b>94,71</b>	<b>92,2</b>

**Tablica 4.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u hidrolatu geranija

Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%) Ekstrakt	Udio (%) Vršne pare
fenol	3,126	4,82	/
klorbenzen <sup>a</sup>	3,278	3,93	/
6-metil-3-piperidinol <sup>a</sup>	3,748	8,94	/
heptanska kiselina	5,735	2,89	/
<i>o</i> -krezol	7,483	11,14	/
linalol	9,745	6,59	11,32
6-metilhepta-3,5-dien-2-on	9,952	/	0,58
<i>trans</i> -ružin oksid	10,180	/	4,12
2-feniletanol	10,248	5,97	/
izopulegol	11,513	/	0,90
D-isomenton	11,843	/	1,80
L-menton	12,280	/	15,35
neoisomentol	13,017	/	0,45
$\alpha$ -terpineol	13,297	18,55	1,74
6,7-dihidro-7-hidroksilinalol	14,854	9,96	/
citronelol	14,991	/	43,33
neral	15,393	/	0,21

geraniol	15,941	/	14,53
<i>trans</i> -mirtanol <sup>a</sup>	16,158	/	1,15
citral	16,603	/	0,61
2-feniltiglat <sup>a</sup>	29,278	/	0,46
Ukupno identificirano (%)		<b>72,79</b>	<b>96,55</b>

## 4. RASPRAVA

Na temelju dobivenih rezultata, koji su prikazani u tablicama 2-4, analizirane su dvije korištene tehnike za izolaciju hlapljivih spojeva iz hidrolata lavande, smilja i geranija, a to su: mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici. Izolat dobiven ekstrakcijom miješanjem na magnetskoj miješalici u daljnjem tekstu se naziva ekstrakt, a izolat dobiven mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi naziva se vršne pare.

U tablici 2 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama i ekstraktu hidrolata lavande. Iz rezultata se uočava da je kod mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi ukupno identificirano 94,62 % hlapljivih spojeva, a kod ekstrakcije miješanjem na magnetskoj miješalici identificirano je nešto manje hlapljivih spojeva, ukupno 89,42 %. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi dizajnirana je da detektira isključivo hlapljive spojeve iz uzorka. Budući da se temelji na isparavanju spojeva u plinsku fazu, metoda je najučinkovitija za spojeve s visokom hlapljivošću koji se brže prenose u plinsku fazu, što rezultira većim brojem i višim udjelom identificiranih hlapljivih spojeva.

S druge strane, ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici je metoda u kojoj spojevi ostaju u tekućoj fazi. Vrlo hlapljivi spojevi djelomično isparavaju tijekom ekstrakcije što smanjuje njihov udio u konačnom ekstraktu. Osim selektivnosti prema hlapljivim spojevima, na ukupni udio hlapljivih spojeva u vršnim parama i ekstraktu hidrolata lavande utječe i osjetljivost metode.

Neki su spojevi identificirani u izolatu dobivenom samo jednom tehnikom ekstrakcije, što ukazuje na selektivnost pojedine tehnike za određene spojeve. Primjerice, 5,5-dimetil-2(5H)-furanon je prisutan samo u ekstraktu (1,68 %), kao i benzil-alkohol (1,41 %) te 6,7-dihidro-7-hidroksilinalol (32,48 %) koji je ujedno i najzastupljeniji hlapljivi spoj u ekstraktu hidrolata lavande.

Nasuprot tome, hlapljivi spojevi poput okt-1-en-3-ola (0,63 %), 1,4-cineola (1,70 %) i kamfora (1,68 %) detektirani su isključivo u vršnim parama hidrolata lavande. Terpinen-4-ol je spoj koji je prisutan u najvećem udjelu u vršnim parama (26,38 %), ali je identificiran i

u ekstraktu u manjem udjelu (5,35 %). Navedeni terpinen-4-ol, kao i  $\alpha$ -terpineol, su spojevi koji se pojavljuju u oba izolata, ekstraktu i vršnim parama, ali u vrlo različitim udjelima. Terpinen-4-ol je zastupljeniji u vršnim parama (26,38 %) u odnosu na ekstrakt (5,35 %). Slično tomu,  $\alpha$ -terpineol čini čak 24,77 % u vršnim parama, dok je njegov udio u ekstraktu 10,75 %.

Zanimljiv spoj za usporedbu je linalol jer čini 16 % hlapljivih spojeva u vršnim parama, dok je njegov udio u ekstraktu znatno manji, 1,43 %. Linalol, kao i terpinen-4-ol, su više hlapljivi spojevi koji brzo isparavaju, zbog čega je mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi prikladna metoda za njihovu detekciju, tj. detekciju više hlapljivih spojeva čak i ako su u uzorku prisutni u nižim koncentracijama. Ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici je selektivnija za manje hlapljive spojeve kao što je 6,7-dihidro-7-hidroksilinalol (32,48 %), a koji nije detektiran u vršnim parama. Razlog tomu može biti osjetljivost ove tehnike za spojeve s nižom isparljivošću ili većom molekulskom masom.

U tablici 3 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama i ekstraktu hidrolata smilja. Iz rezultata se uočava da je kod mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi ukupno identificirano 92,2 % hlapljivih spojeva, a kod ekstrakcije miješanjem na magnetskoj miješalici identificirano je nešto manje hlapljivih spojeva, ukupno 94,71 %.

Hlapljivi spojevi prisutni samo u ekstraktu su npr. 2-metilbutanska kiselina (9,24 %) i 4-metilheksan-3-on (1,07 %). Ova razlika u udjelima ukazuje na selektivnost ekstrakcije miješanjem na magnetskoj miješalici za manje hlapljive spojeve koji zaostaju u tekućoj fazi.

S druge strane, spojevi kao što su  $\beta$ -mircen (0,59 %), 1,8-cineol (1,73 %) i kamfor (0,99 %) prisutni su samo u vršnim parama, što je posljedica njihove veće hlapljivosti.

I kod hidrolata smilja, prisutan je linalol koji je vrlo hlapljiv spoj. Čini 19,84 % udjela hlapljivih spojeva u vršnim parama, dok je njegov udio u ekstraktu znatno manji, 2,95 %. To je očekivano jer je linalol vrlo hlapljiv i lakše isparava, što rezultira većim udjelom u vršnim parama.

$\alpha$ -Terpineol je spoj s najvećim udjelom u obje metode, 22,26 % u vršnim parama te 15,38 % u ekstraktu, što može biti posljedica njegove umjerene hlapljivosti. Visok udio terpenskih alkohola,  $\alpha$ -terpineola i terpinen-4-ola, u hidrolatu smilja kod obje tehnike objašnjava se

njihovim kemijskim svojstvima. Terpeni su spojevi koji su najzastupljeniji u eteričnim uljima, samim time i u hidrolatima, relativno su hlapljivi spojevi i imaju umjerenu topljivost u vodi i u otapalima zbog čega su prisutni u značajnim količinama u obje faze; plinskoj (vršne pare) i tekućoj (ekstrakt).

U tablici 4 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama i ekstraktu hidrolata geranija. Iz rezultata se uočava da je kod mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi ukupno identificirano 96,55 % hlapljivih spojeva, a kod ekstrakcije miješanjem na magnetskoj miješalici identificirano je znatno manje hlapljivih spojeva, ukupno 72,79 %.

Citronelol je najzastupljeniji spoj s udjelom od čak 43,33 % u vršnim parama, dok u ekstraktu nije identificiran. To je vrlo hlapljiv spoj, lako prelazi u plinsku fazu, što objašnjava njegovu prisutnost u vršnim parama u visokom udjelu. Osim citronelola, spojevi koji su prisutni samo u vršnim parama su: geraniol (14,53 %) i L-menton (15,35 %).

S druge strane, spojevi detektirani samo u ekstraktu su: fenol (4,82 %), *o*-krezol (11,14 %) i 6-metil-3-piperidinol (8,94 %). Ovi spojevi su vjerojatno manje hlapljivi i s toga ostaju u tekućoj fazi ne prelazeći u plinsku fazu tijekom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi. Najzastupljeniji spoj u ekstraktu je  $\alpha$ -terpineol s udjelom 18,55 %.

Citronelol, geraniol i L-menton su spojevi s vrlo visokim udjelom u vršnim parama. Ti su spojevi poznati po svojoj hlapljivosti i intenzivom mirisu zbog čega se lako prenose u plinsku fazu. Upravo njihov visok udio u vršnim parama može biti ključan za aromatični profil hidrolata geranija. Njihova prisutnost u hidrolatu geranija daje mu specifičan miris (osvježavajući). Osim mirisnih svojstava, posjeduju i određena biološka svojstva (antimikrobno djelovanje) što može povećati vrijednost proizvoda.

## 5. ZAKLJUČCI

- Glavni spojevi identificirani u hidrolatima lavande, smilja i geranija razlikuju se ovisno o korištenoj tehnici ekstrakcije.
- Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su se obje metode pokazale korisnima, ali mikroekstrakcija vršnih para je pogodnija za analize gdje je cilj dobiti bogatiji aromatični profil hlapljivih spojeva, odnosno izolirati spojeve ključne za miris.
- S druge strane, ako je cilj dobiti potpuniji profil hlapljivih spojeva, onda se iz rezultata uočava da je za tu svrhu prikladna i tehnika ekstrakcija miješanjem na magnetskoj miješalici.
- Terpeni i fenoli su ključne komponente u hidrolatima dobivenim iz biljaka lavande, smilja i geranija. Terpenski alkoholi, kao što su linalol, borneol i  $\alpha$ -terpineol, su hlapljivi spojevi koji su odgovorni za prepoznatljive mirise ovih biljaka. Također su poznati po svojim biološkim svojstvima, poput antimikrobnog i protuupalnog djelovanja. Fenoli, kao što su *p*-krezol i 2-feniletanol, prepoznatljivi su po svojim značajnim antioksidativnim svojstvima. Rezultati su pokazali da su obje tehnike uspješno izolirale ove spojeve, no u različitim omjerima i u različitim udjelima.
- Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi je tehnika koja je fokusirana na izolaciju hlapljivih spojeva koji su već prisutni u plinovitoj fazi iznad uzorka. Iako se identificira manji ukupni broj spojeva (osim u vršnim parama izoliranim iz hidrolata lavande), metoda je vrlo učinkovita u izolaciji spojeva koji snažno pridonose mirisu, poput linalola i citronelola koji su ključni za aromatični profil.
- Ekstrakcijom miješanjem izoliraju se manje hlapljivi, teži i polarniji spojevi. Intenzivnim miješanjem, čak i spojevi koji teže isparavaju lakše se otapaju i mogu biti izolirani i identificirani.

## 6. KRATICE I SIMBOLI

HS – vršne pare (engl. Headspace)

SPME – mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. Solid-Phase Microextraction)

HS-SPME – mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. Headspace Solid-Phase Microextraction)

GC – plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

GC-MS – plinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*)

MS – masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*)



## 7. LITERATURA

1. *S. Dudaš*, Aromatično i ljekovito bilje, interni materijali, Poljoprivredni odjel Poreč Veleučilišta u Rijeci, 2017.
2. *L. Miletić*, Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja i hidrolata izabranih vrsta biljaka, završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2020.
3. *V. Petrović*, Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda *Artemisia L.* plinskom kromatografijom, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Splitu, 2015.
4. URL: <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/> (31.7.2024.)
5. *I. Jerković*, Kemija aroma, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, 2011.
6. URL: <https://www.purodem.com/the-process-of-essential-oil-distillation/> (31.7.2024.)
7. URL: <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/hidrolati/> (31.7.2024.)
8. URL: <https://aniasdemoras.wordpress.com/2011/03/27/dobivanje-etericnih-ulja/> (1.8.2024.)
9. *B. Bilandžija, L. Bilandžija, L. Pollak, S. Inić*, Metode dobivanja i parametri procjene kakvoće eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja, pregledni rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagreb, 2022.
10. URL: [https://www.doterra.com/PH/en\\_PH/essential-oil-production-distillation-expression-cold-pressing](https://www.doterra.com/PH/en_PH/essential-oil-production-distillation-expression-cold-pressing) (3.8.2024.)
11. URL: <https://hrc.threecosmetics.com/en/essential-oil/extract/127/> (3.8.2024.)
12. URL: [https://agritech.tnau.ac.in/horticulture/extraction\\_methods\\_natural\\_essential\\_oil.pdf](https://agritech.tnau.ac.in/horticulture/extraction_methods_natural_essential_oil.pdf) (5.8.2024.)
13. URL: <https://formulabotanica.com/what-are-co2-extracts/> (5.8.2024.)
14. *M. Subotić*, Terpeni – prirodni organski spojevi, završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2016.
15. *P. Noriega*, Terpenes in Essential Oils: Bioactivity and Applications, Edited by *S. Perveen, A. M. Al-Taweel*, Terpenes and Terpenoids – *Recent Advances*, 2020.

16. A. Radonić, Predavanja iz Prirodnih organskih spojeva, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2015.
17. A. Parčina, Eterično ulje gorke naranče (*Citrus aurantium L.*): usporedba metoda izolacije, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2017.
18. H. Friedrich, Phenylpropanoid constituents of essential oils, Lloydia, 1976.
19. URL: <http://hr.bjherbest.com/analytical-standard/common-andrographis-herb/cinnamic-acid-cas-621-82-9.html> (23.8.2024.)
20. URL: <https://portal.terra-organica.hr/aromakozmetika/hidrolati-ili-cvjetne-vodice/> (23.8.2024.)
21. URL: <https://krenizdravo.dnevnik.hr/ljepota/njega-tijela/hidrolat-smilja-dobrobiti-za-njegu-koze> (23.8.2024.)
22. URL: <https://www.gardenia.net/plant/helichrysum-italicum-curry-plant> (23.8.2024.)
23. N. Kunc, A. Frlan, D. Baričević, N. Kočevar Glavač, M. Kokalj Ladan, Essential Oil and Hydrosol Composition of Immortelle (*Helichrysum italicum*), članak, doi: 10.3390/plants11192573, Sveučilište u Ljubljani, 2022.
24. URL: <https://store.underwoodgardens.com/English-Lavender-Lavandula-angustifolia/productinfo/H1027/> (29.8.2024.)
25. URL: <https://krenizdravo.dnevnik.hr/ljepota/njega-lica/hidrolat-lavande-prirodna-njega-svih-tipova-koze> (29.8.2024.)
26. URL: [https://livingsimplylavender.co.uk/products/lavender-angustifolia-therapeutic-hydrosol-99-9-natural?srsId=AfmBOoqxAl\\_kbgpy8SOfyU3ei\\_VdhL2RLkleHU8YphVpw6LB5vGFFjbV](https://livingsimplylavender.co.uk/products/lavender-angustifolia-therapeutic-hydrosol-99-9-natural?srsId=AfmBOoqxAl_kbgpy8SOfyU3ei_VdhL2RLkleHU8YphVpw6LB5vGFFjbV) (29.8.2024.)
27. URL: <https://www.frogworks.us/products/p/geranium-pelargonium-graveolens> (1.9.2024.)
28. Ennaifer, M., Bouzaiene, T., Messaoud, C., Hamdi, M., Phytochemicals, antioxidant, anti-acetyl-cholinesterase, and antimicrobial activities of decoction and infusion of *Pelargonium graveolens*, Natural Product Research, 34(18), <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1547299>, 2018., 2634–2638

29. S. Čavar, M. Maksimović, Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens*, Science Direct Research, Prirodno-matematički fakultet Sveučilišta u Sarajevu, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.031>, 2012., 263-267
30. URL: <https://svijet-biljaka.hr/geranij/> (1.9.2024.)
31. URL: <https://svijet-biljaka.hr/en/proizvod/geranium-hydrolate/> (1.9.2024.)
32. URL: <https://www.kusharomaexports.com/pure-floral-waters/geranium-hydrosol-pure-natural-floral-waters> (1.9.2024.)
33. P. Koceić, Profili hlapivih spojeva eteričnih ulja i hidrolata motra (*Critimum maritimum* L.) dobivenih različitim postupcima destilacija, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2023.
34. URL: <https://t.ly/O-H6> (7.9.2024.)
35. H. Prosen, L. Zupančić-Kralj, Solid-phase microextraction, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00109-5), 1999., 272-282
36. 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., 20-25
37. W. T. Fothergill, Gas chromatography: Technique, <https://doi.org/10.1177/003591576806100544>, 1968., 525-528
38. S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, recenzirana skripta, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2002.
39. URL: <https://circlehinstitute.com/chemistry/reading-gcms/> (7.9.2024.)
40. M. Kokalj Ladan, N. Kočevar Glavač, GC–MS Analysis of A *Helichrysum italicum* Hydrosol: Sensitivity, Repeatability and Reliability of Solvent Extraction versus Direct Hydrosol Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, <https://doi.org/10.3390/app121910040>, 2022.
41. A. Radonić, Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.), Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2000.

42. 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, 23-51.
43. URL: <https://t.ly/UGzy> (9.9.2024.)