

# Usporedba kvalitete i čistoće dalmatinskog i kontinentalnog hidrolata smilja

---

**Bilandžija, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:986689>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Lucija Bilandžija**

**Usporedba kvalitete i čistoće dalmatinskog i  
kontinentalnog hidrolata smilja**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju i u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Suzane Inić i suvoditeljstvom dr. sc. Lee Pollak.

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Suzani Inić na strpljenju i susretljivosti te pruženoj pomoći i vremenu uloženom u izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i dr. sc. Lei Pollak na savjetima i pruženoj pomoći. Također zahvaljujem i ostalim djelatnicama iz Odjela za dodatke prehrani i biološki aktivne tvari Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Ivi Ladan, mag.san.ing. i Maji Vidaković, dipl.ing., na pomoći oko eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Zahvaljujem svojoj obitelji i posebno svojoj sestri na pomoći, podršci i razumijevanju tijekom studiranja.*

# SADRŽAJ

1.UVOD .....	1
1.1. Sredozemno smilje ( <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don).....	2
1.1.1. Taksonomija, rasprostranjenost i morfološke značajke .....	2
1.1.2. Biokemijski sastav.....	3
1.1.3. Farmakološki učinci i primjena različitih ekstrakata i eteričnog ulja .....	4
1.1.3.1. Antimikrobno djelovanje.....	5
1.1.3.2. Protuupalno djelovanje.....	6
1.1.3.3. Antioksidativno djelovanje .....	8
1.1.3.4. Antispazmodično djelovanje .....	9
1.1.3.5. Ostali učinci.....	9
1.1.3.6. Primjena u kozmetičkoj industriji .....	10
1.2. Eterično ulje smilja ( <i>Helichrysum italicum</i> ) .....	12
1.2.1. Kemijski sastav .....	13
1.2.2. Čimbenici koji utječu na sastav eteričnog ulja.....	17
1.2.3. Toksičnost eteričnog ulja .....	19
1.3. Hidrolat.....	19
1.3.1. Dobivanje hidrolata .....	20
1.3.2. Primjena hidrolata .....	21
1.3.2.1. Hidrolat smilja ( <i>Helichrysum italicum</i> ).....	21
2.OBRAZLOŽENJE TEME .....	22
3.MATERIJALI I METODE .....	24
3.1. Materijali .....	25
3.1.1. Kemikalije .....	25
3.1.2. Laboratorijski pribor .....	25
3.1.3. Instrumenti .....	26
3.1.4. Uzorci .....	26
3.2. Metode.....	27
3.2.1. Relativna gustoća .....	27
3.2.1.1. Postupak mjerenja .....	27
3.2.2. Indeks refrakcije .....	28
3.2.2.1. Postupak mjerenja .....	29

3.2.3. Kiselinski broj .....	30
3.2.3.1. Postupak mjerenja .....	30
3.2.4. pH-vrijednost.....	30
3.2.4.1. Postupak mjerenja .....	31
3.2.5. Mutnoća.....	31
3.2.5.1. Postupak mjerenja .....	33
3.2.6. Sadržaj eteričnog ulja .....	33
3.2.6.1. Postupak mjerenja .....	34
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	35
4.1. Određivanje relativne gustoće .....	36
4.2. Određivanje indeksa refrakcije.....	37
4.3. Određivanje kiselinskog broja.....	38
4.4. Određivanje pH-vrijednosti.....	39
4.5. Određivanje mutnoće .....	40
4.6. Određivanje sadržaja eteričnog ulja .....	41
5. ZAKLJUČCI .....	43
6. LITERATURA.....	45
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	51
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

## **1.UVOD**

## 1.1. Sredozemno smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don mediteranska je biljka koja pripada rodu *Helichrysum* i porodici glavočika (*Asteraceae*). Sinonimi za *H. italicum* su *Gnaphalium glutinosum* Ten., *Gnaphalium italicum* Roth, *Helichrysum angustifolium* var. *numidicum* (Pomel) Maire, *Helichrysum numidicum* Pomel, *Helichrysum rupestre* subsp. *glutinosum* (Ten.) Nyman i *Helichrysum stoechas* subsp. *numidicum* (Pomel) Batt. S obzirom na to da se u biljkama otkrivaju i izoliraju nove ljekovite tvari, javlja se sve veći interes za istraživanjem ljekovitog i aromatičnog bilja poput smilja (Viegas i sur., 2014).

### 1.1.1. Taksonomija, rasprostranjenost i morfološke značajke

Rod *Helichrysum* (Miller) obuhvaća oko 600 grmovitih i polugrmovitih trajnica koje su široko rasprostranjene na području Mediterana, istočne i južne Afrike, Madagaskara, središnje Azije, jugoistočne Australije i Novog Zelanda. U flori Europe nalazi se 25 vrsta roda *Helichrysum*. U Hrvatskoj su najznačajnije vrste *Helichrysum arenarium* (L.) Moench (pješčano smilje) i *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (sredozemno smilje), ali od posebnog je značaja vrsta *Helichrysum italicum* (Rajić i sur., 2015; Rodrigues i sur., 2015).

Sredozemno smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je kserofitna biljka koja nastanjuje osunčane, suhe, pjeskovite i kamenite terene različitih nadmorskih visina (0 – 2200 m) (Gismondi i sur., 2020). Prirodno je rasprostranjeno u zemljama Sredozemlja (Španjolska, Francuska, Italija, Hrvatska, Grčka, Cipar, Alžir i Maroko), a najpoznatije nalazište je na Korzici. Smilje je polugrm visine 30 do 70 cm karakterističnog aromatičnog mirisa (slika 1).



Slika 1. Polugrm samoniklog smilja s Velog Lošinja  
(preuzeto s <https://www.veli-losinj-croatia.com>)

Listovi su veličine 2–37 x 0,4–1,8 mm, na dnu skupljeni u rozetu, a prema vrhu naizmjenično raspoređeni na stabljici. Izduženi su, na licu zelenkasti, manje dlakavi i s rijetko raspoređenim žlijezdama, a na naličju sivo-bijeli, gusto prekriveni dlačicama i žlijezdama. Na rubu su uvijeni i linearni, a debela kutikula i dlačice osiguravaju dobru prilagodbu sušnim uvjetima staništa koje nastanjuju. Stabljika je također prekrivena dlačicama i na vrhu svake se nalazi cvat (glavica). Glavicu čine zlatno-žuti cjevasti cvjetovi. Veličina glavice je 4–6,5 mm × 2–5 mm, cilindrična je do usko zvonasta oblika, heterogamna ili rijetko homogamna s cvjetićima s tučkom (1–10 cvjetića) i hermafroditnim cvjetićima (8–31 cvjetić). Plod je sitna roška (*achenium*) (Pohajda i sur., 2015; Galbany-Casals i sur., 2006).

Postoji nekoliko podvrsta *Helichrysum italicum*: *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*, *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman, *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* Franco, *Helichrysum italicum* subsp. *pseudolitoreum* (Fiori) Bacch. i sur., *Helichrysum italicum* subsp. *serotinum* (Boiss.) P.Fourn., *Helichrysum italicum* subsp. *siculum* (Jord. i Fourr.) Galbany i sur. (Viegas i sur., 2014). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* i *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman su najviše istraživane podvrste koje se međusobno razlikuju u morfološkim karakteristikama. Tako je *H. italicum* subsp. *microphyllum* niža, ima manje listove, koji su na rubu valoviti, te ima veći stupanj razgranatosti dok je *H. italicum* subsp. *italicum* viša biljka, ima veće listove, koji nisu na rubu valoviti, te ima manji stupanj razgranatosti (Galbany-Casals i sur., 2011).

Smilje pripada kategoriji zaštićenih biljaka (NN/99/09). Samonikle zaštićene biljke mogu se sakupljati uz obvezno pridržavanje sljedećih općih mjera zaštite:

- na jednom nalazištu može se sakupiti najviše dvije trećine biljnog fonda
- pri sakupljanju biljaka kod kojeg se koriste samo određeni nadzemni dijelovi može se koristiti isključivo tehnika rezanja, bez oštećivanja ostalih dijelova biljke
- prilikom sakupljanja samoniklih biljaka ne smije se oštećivati njihovo stanište
- jame nastale vađenjem podzemnih dijelova samoniklih biljaka moraju se ponovno zatrpati iskopanom zemljom (NN/154/08).

### 1.1.2. Biokemijski sastav

Velik broj kemijskih spojeva izoliran je iz različitih ekstrakata *H. italicum*, a svaki od njih pojedinačno ili u sinergiji s drugima doprinosi farmakološkoj aktivnosti smilja. Među najzastupljenijim su fenolne komponente koje uključuju flavonoide, acetofenone,



fluoroglucinole, kumarine, kumarate, fenolne kiseline i njihove estere te druge derivate. Biokemijski sastav *H. italicum* uključuje:

1. Fenolne kiseline: kavena kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulična kiselina, klorogenska kiselina
2. Flavonoide: gnafalin, apigenin, naringenin, luteolin, pinocembrin, tilirozid, halkon-2'-glukozid, naringenin-glikozid, kempferol-3-glukozid
3. Eterično ulje:
  - monoterpeni ( $\alpha$ -pinen, limonen, nerol, geraniol, neril acetat, geranil acetat)
  - seskviterpeni ( $\alpha$ -selinen,  $\beta$ -selinen,  $\beta$ -kariofilen,  $\gamma$ -kurkumen)
  - $\beta$ -diketoni ili italdioni
4. Kumarine: eskuletin, skopoletin i izoskopoletin
5. Acetofenone: 12-acetoksitremeton, (2,3-dihidro-2-(1-(hidroksimetil)etenil-5-benzofuranil)etanon
6. Pirone: arzanol, metilarzanol, helipiron, mikropiron
7. Triterpene i steroide:  $\beta$ -sitosterol, ursolična kiselina (Maksimovic i sur., 2017; Guinoiseau i sur., 2013).

### 1.1.3. Farmakološki učinci i primjena različitih ekstrakata i eteričnog ulja

S obzirom na aromatična svojstva *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don se primjenjuje u medicinske svrhe (zajedno s morskom soli za smanjenje začepjenosti dišnih putova, regeneraciju nosne sluznice i zaštitu od alergena, čaj od smilja se u obliku infuza i dekokta tradicionalno primjenjuje za liječenje crijevnih poremećaja, poremećaja jetre i žučnih putova, masti se koriste za brže zacjeljivanje rana), kozmetičkoj industriji i kulinarstvu kao začim (Pohajda i sur., 2015; Rajić i sur., 2015).

Primjena vrste *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don u medicinske svrhe poznata je još iz razdoblja starih Grka i Egipćana. Cvjetovi, stabljika i listovi su bogatiji bioaktivnim sastavnicama u odnosu na podzemne dijelove te su se stoga najčešće koristili za izradu infuza i dekokta koji su se primjenjivali kod prehlade, kašlja, nesаницe (Gismondi i sur., 2020). Biljnu drogu čine cvjetne glavice koje se sastoje od sjajnih, zlatnožutih cjevastih cvjetova. Cvjetne glavice se beru prije otvaranja cvjetova (prije cvatnje) te se suše prirodnim putem ili u sušarama. Biljna droga se tradicionalno koristi kao koleretik (potiče jetru na pojačano stvaranje žuči) i kolagog (potiče pražnjenje žuči iz žučnog mjehura u duodenum) kod kroničnog kolecistitisa i drugih oboljenja žučnih puteva te kao diuretik i ekspektorans. Osim

navedenog, cvijet smilja se često dodaje za poboljšanje izgleda različitih industrijski proizvedenih čajeva (Pohajda i sur., 2015; Bisset i Wichtl, 2001).

### 1.1.3.1. Antimikrobno djelovanje

Antimikrobno djelovanje pokazali su ekstrakti *Helichrysum italicum* u dietil-eteru i etanolu i acetonu. Ekstrakt u dietil-eteru, kao i eterično ulje, je pokazao najbolji antibakterijski učinak na *Staphylococcus aureus* pri čemu nije bilo razlike u učinku na meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA) u odnosu na meticilin osjetljivi *S. aureus* (MSSA). Antibakterijsko djelovanje uključuje redukciju rasta *S. aureus* i aktivnosti enzima koagulaze, DNAaze, termonukleaze i lipaze, a čini se da utječu i na produkciju enterotoksina B i C. Sastavnice odgovorne za antibakterijski učinak su vjerojatno flavonoidi i terpeni koji zbog određenog stupnja lipofilnosti mogu stupati u interakciju s citoplazmatskom membranom *S. aureus* i na taj način potaknuti strukturnu i funkcionalnu destabilizaciju membrane koja gubi integritet te postaje propusna. Antibakterijska aktivnost je općenito izraženija prema Gram-pozitivnim bakterijama nego prema Gram-negativnim što je izravno povezano s razlikom u građi staničnog zida. Naime, Gram-negativne bakterije osim citoplazmatske membrane i tankog sloja peptidoglikana imaju i vanjsku fosfolipidnu membranu s uklopljenim lipopolisaharidima. To sve čini stanični zid Gram-negativnih bakterija nepropusnim za lipofilne komponente dok kroz porine (transmembranski proteini prisutni u vanjskoj membrani Gram-negativnih bakterija koji djeluju kao kanali kroz koje mogu difundirati određene molekule) mogu proći samo hidrofilne tvari određene molekulske mase. Za razliku od Gram-negativnih bakterija, stanični zid Gram-pozitivnih bakterija sastoji se samo od sloja peptidoglikana i citoplazmatske membrane što ga čini puno propusnijom barijerom, a time i same Gram-pozitivne bakterije osjetljivijima (Viegas i sur., 2014; Nostro i sur., 2002; Nostro i sur., 2000). Nekoliko studija je proučavalo antivirusno djelovanje ekstrakata *H. italicum*. Ekstrakt u dietil-eteru, dobiven od cvjetova, posjeduje značajnu aktivnost protiv herpes simpleks virusa tipa 1 (HSV-1) (Viegas i sur., 2014). Za inhibiciju replikacije HIV-1 u T stanicama je odgovoran acetonski ekstrakt *H. italicum*, odnosno njegova aktivna komponenta, arzanol. Arzanol snažno inhibira nuklearni faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), ključni faktor koji regulira transkripciju citokina, kemokina i adhezijskih molekula uključenih u upalni odgovor, a time i produkciju faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (alfa) (TNF- $\alpha$ ). Time je inhibirana TNF- $\alpha$  inducirana integracija virusne DNA u genom stanice domaćina uz pomoć LTR (*long terminal repeat*), a posljedično i replikacija HIV-1 (Appendino i sur., 2007). Zahvaljujući

antimikrobnom djelovanju ekstrakti *Helichrysum italicum* mogli bi naći primjenu kao prirodni konzervansi u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji te bi određeni izolirani spojevi mogli poslužiti kao modeli za razvoj novih antimikrobnih lijekova (Nostro i sur., 2000).

Za antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja *H. italicum* vjerojatno su odgovorni spojevi koji sadrže kisik kao što su monoterpenski alkoholi geraniol i nerol te njihovi acetatni esteri. Eterično ulje *H. italicum* sadrži komponente (geraniol) koje inhibirajući efluksne pumpe (proteinski nosači koji imaju sposobnost izbacivanja antibiotika iz bakterijske stanice) višestruko rezistentnih bakterijskih sojeva pojačavaju učinkovitost antibiotika protiv tih sojeva. Tako je primjena eteričnog ulja *H. italicum* omogućila smanjenje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) kloramfenikola protiv višestruko rezistentnih sojeva *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*. Osim antibakterijskog djelovanja, eterično ulje i iz njega dobivena terpenoidna frakcija (sastavnice koje sadrže kisik) su pokazali sposobnost inhibicije rasta *Candida albicans* primjenom disk difuzijske metode i određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije. Zona inhibicije rasta za eterično ulje je iznosila 10 mm, a za terpenoidnu frakciju 9 mm dok je minimalna inhibitorna koncentracija za eterično ulje i terpenoidnu frakciju iznosila 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (Lorenzi i sur., 2009; Mastelic i sur., 2005).

### 1.1.3.2. Protuupalno djelovanje

U medicinske svrhe najviše je ispitano protuupalno djelovanje metanolnog ekstrakta *H. italicum* i 4 ekstrakta dobivenih iz njega (dobiveni su uparavanjem metanolnog ekstrakta pod sniženim tlakom, otapanjem suhog ostatka u vodi te ekstrakcijom u n-heksanu, diklormetanu, etil acetatu i n-butanolu). Protuupalno djelovanje je ispitano na mišjim modelima. Različiti ekstrakti su pokazali različitu aktivnost u različitim eksperimentalnim modelima upale (edem induciran s 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetatom (TPA); edem induciran s etil fenilpropiolatom (EPP); edem induciran s fosfolipazom A2 (PLA2) i serotoninom; kronična upala inducirana višekratnom primjenom TPA) (Sala i sur., 2002).

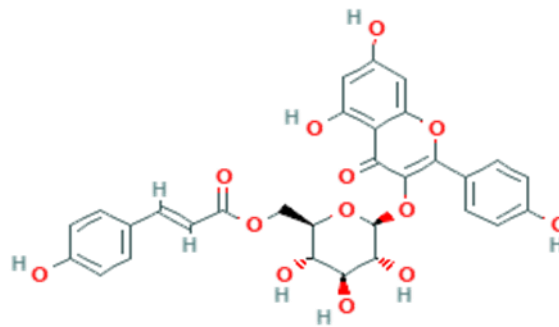
Dokazano je da je za antiinflamatorno djelovanje odgovorno više biljnih sastavnica: acetofenoni (Sala i sur., 2003b), flavonoidi (Sala i sur., 2003a) i  $\alpha$ -piron floroglucinol (Appendino i sur., 2007).

1. Acetofenoni 4-hidroksi-3-(3-metil-2-butenil)acetofenon i 4-hidroksi-3-(2-hidroksi-3-izopentenil)acetofenon su pokazali inhibitorni učinak na aktivnost ciklooksigenaze-1 (COX-

1) u ljudskim trombocitima te su inhibicijom 5-lipooksigenaze (5-LOX) smanjili produkciju leukotriena B4 u leukocitima štakora (Sala i sur., 2003b).

2. Flavonoidi gnofalin i pinocembrin inhibicijom 5-lipooksigenaze (5-LOX) snažno reduciraju proizvodnju leukotriena B4 u leukocitima štakora te inhibiraju enzimsku lipidnu peroksidaciju vjerojatno inhibirajući enzime uključene u proces inicijacije (Sala i sur., 2003a).

3. Flavonoid tilirozid (slika 2) ima inhibirajući učinak na komponente sustava komplementa. Sustav komplementa čini tridesetak proteina koji se aktiviraju u postupnoj enzimskoj reakciji tijekom imunološkog odgovora organizma. Inhibicijom komponenti sustava komplementa tilirozid suprimira otpuštanje histamina i drugih upalnih medijatora iz mastocita, a koje je potaknuto C3a i C5a komponentama komplementa. Za razliku od gnofalina i pinocembrina ima sposobnost hvatanja slobodnih radikala te osim enzimске suprimira i ne-enzimsku (inducirana s Fe<sup>2+</sup>/askorbatom) lipidnu peroksidaciju u jetrenim mikrosomima štakora (Sala i sur., 2003a).



Slika 2. Kemijska struktura tilirozida

(preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

4. Arzanol ( $\alpha$ -piron floroglucinol) je pokazao snažnu inhibitornu aktivnost prema nuklearnom faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) koji regulira transkripciju gena za proinflamatorne citokine i enzime poput ciklooksigenaze-2 (COX-2). Također, pokazao je i inhibitorski učinak na aktivnost 5-lipooksigenaze (5-LOX) i ciklooksigenaze-1 (COX-1) (Appendino i sur., 2007; Schinella i sur., 2002).

Stoga se protuupalno djelovanje ekstrakata *H. italicum* prvenstveno temelji na inhibiciji proinflamatornih enzima i uklanjanju slobodnih radikala (budući da su slobodni radikali uključeni u aktivaciju nuklearnog faktora kappa B (NF-  $\kappa$ B)) iako točni mehanizmi

djelovanja nisu identificirani. S obzirom na protuupalni učinak različiti pripravci dobiveni od vrste *Helichrysum italicum* (najčešće infuzi i dekoti) mogu se primjenjivati za ublažavanje određenih kožnih oboljenja poput psorijaze ili ekcema te kod alergija i astme budući da imaju učinak na inhibiciju proizvodnje leukotriena, važnih medijatora u patogenezi alergija i astme (Viegas i sur., 2014; Sala i sur., 2002; Schinella i sur., 2002).

### 1.1.3.3. Antioksidativno djelovanje

Antioksidativno djelovanje blisko je povezano s antiinflamatornim budući da su slobodni radikali uključeni u aktivaciju nuklearnog faktora kappa B (NF- $\kappa$ B) koji je odgovoran za regulaciju transkripcije gena za proinflamatorne citokine i enzime poput ciklooksigenaze-2 (COX-2) (Schinella i sur., 2002). Antioksidativnu aktivnost ispoljavaju određeni flavonoidi (gnafalin, pinocembrin, tilirozid) i arzanol, prisutni u *H. italicum*, a ona uključuje sposobnost hvatanja slobodnih radikala uključenih u proces lipidne peroksidacije. Naime, lipidna peroksidacija je proces odgovoran za razgradnju masnih kiselina te ima važnu ulogu u oštećenju tkiva u velikom broju patoloških procesa, a za njezinu inicijaciju su odgovorni reaktivni spojevi kisika (*reactive oxygen species, ROS*). Osim navedenih mehanizama djelovanja antioksidativna aktivnost uključuje i inhibiciju enzima uključenih u nastanak ROS (ciklooksigenaza, lipooksigenaza, NADPH oksidaza, ksantin oksidaza i protein kinaza C) te keliranje metala (željezo, bakar) koji potiču nastanak ROS (Rosa i sur., 2011; Sala i sur., 2003a).

Najveća antioksidativna aktivnost je primijećena kod tilirozida koji značajno inhibira enzimsku i ne-enzimsku lipidnu peroksidaciju. Inhibicija lipidne peroksidacije je vjerojatno povezana s inhibicijom enzima uključenih u proces inicijacije, ali i sposobnosti hvatanja slobodnih radikala (Sala i sur., 2003a). Antioksidativna aktivnost arzanola je ispitana na primjeru inhibicije bakrom inducirane oksidacije lipoproteina niske gustoće (*low-density lipoprotein, LDL*). Bakrom katalizirana oksidacija LDL-a je model koji oponaša *in vivo* proces oksidacije s obzirom da aterosklerotične arterijske stijenke sadrže tragove bakrovih iona koji doprinose oksidaciji LDL-a. Oksidacija LDL-a ima važnu ulogu u velikom broju bolesti uključujući aterosklozu, metabolički sindrom, artritis i demenciju. Ispitivanje je pokazalo da prethodni tretman s arzanolom značajno doprinosi zaštiti lipoproteina od oksidativnih oštećenja izazvanih  $\text{Cu}^{2+}$  ionima. Antioksidativna aktivnost arzanola je posljedica sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i u manjoj mjeri mogućnosti keliranja metalnih iona (Rosa i sur., 2011).

#### 1.1.3.4. Antispazmodično djelovanje

Antispazmodično djelovanje etanolnog ekstrakta *H. italicum* ispitano je na modelu izoliranog ileuma miša u kojemu su kontrakcije bile inducirane s acetilkolinom (koji izaziva kontrakcije glatkih mišića aktivacijom muskarinskih receptora) i barijevim kloridom (koji inducira kontrakcije bez da djeluje na određene receptore). Pretpostavlja se da etanolni ekstrakt ima antispazmodični učinak zbog direktnog djelovanja na glatke mišiće. Također je ispitan utjecaj na motilitet crijeva *in vivo*, na miševima, budući da su u upalnim bolestima crijeva promjene u motilitetu prepoznate kao klinički značajne. Eksperiment je proveden na zdravim miševima i miševima kod kojih je upala crijeva izazvana s krotonovim uljem. Krotonovo ulje uzrokuje poremećaj intestinalne sluznice, infiltraciju limfocita u submukozu i posljedični razvoj upale. Etanolni ekstrakt *H. italicum* je snažnije inhibirao motilitet u upaljenom crijevu dok u dozi od 3 mg/kg nije značajnije utjecao na motilitet crijeva zdravog miša. Inhibirajući učinak ekstrakta na intestinalni motilitet potvrđuje tradicionalnu upotrebu smilja za liječenje probavnih tegoba, ali predstavlja i potencijalnu medicinsku primjenu kod poremećaja motiliteta u upalnim bolestima crijeva (Rigano i sur., 2013).

#### 1.1.3.5. Ostali učinci

Antineoplastična aktivnost eteričnog ulja *H. italicum* je procijenjena na stanicama melanoma miša. Taj modelni sustav je izabran zbog izrazite metastatske sposobnosti i visokog stupnja rezistencije na lijekove. Stanice melanoma miša bile su izložene 24, 48 ili 96 h različitim razrjeđenjima eteričnog ulja (EO 1:10, EO 1:50, EO 1:100) u dimetilsulfoksidu (DMSO). Praćeno je djelovanje eteričnog ulja na redukciju stanične proliferacije (praćenjem krivulje proliferacije stanica) i citotoksičnost eteričnog ulja (brojanjem mrtvih stanica). Pokazano je da najmanje razrjeđenje eteričnog ulja (EO 1:10) kao i najdulje izlaganje stanica (96 h) ima najznačajniji učinak odnosno da eterično ulje *H. italicum* posjeduje antiproliferativna svojstva na način koji ovisi o dozi i vremenu. Antineoplastično djelovanje može biti objašnjeno i time što određene sastavnice *H. italicum* imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala poput reaktivnih spojeva kisika (ROS) koji djeluju, kako je dokazano u nekoliko studija, kao sekundarni glasnici koji signaliziraju nekontroliranu proliferaciju tumorskih stanica (Gismondi i sur., 2020).

Određena istraživanja su pokazala insekticidni i larvicidni učinak različitih eteričnih ulja, a među njima i eteričnog ulja *H. italicum*. Primijenjeno u najvišim dozama (300 ppm)

eterično ulje *H.italicum* je pokazalo visoke stope mortaliteta (od 98,3 do 100%) ličinki vrste *Aedes albopictus*. Ta činjenica bi se mogla iskoristiti za dobivanje pesticida biljnog porijekla koji, za razliku od danas uobičajeno primjenjivanih organofosfata i drugih sintetskih insekticida, neće štetno djelovati na ostale organizme, uključujući ljude, te će biti ekološki prihvatljivi i lako biorazgradivi (Conti i sur., 2010).

Za herbicidnu aktivnost eteričnog ulja su vjerojatno odgovorni seskviterpeni pri čemu eterično ulje vjerojatno utječe na proces produljenja korijena klice, ali nema utjecaja na proces klijanja (Mancini i sur., 2011).

Potrebno je napomenuti da su većina istraživanja farmakoloških učinaka *H. italicum* provedena na organskim ekstraktima. Kod tradicionalne primjene uglavnom se koriste infuzi i dekoti dobiveni od nadzemnih dijelova biljke pa je od iznimne važnosti provesti ispitivanja i na vodenim ekstraktima. Iako istraživanja *H. italicum* pokazuju veliki spektar različitih farmakoloških aktivnosti, većina tih ispitivanja provedena su na *in vitro* modelima. Stoga je važno daljnja ispitivanja farmakološke aktivnosti različitih ekstrakata i eteričnog ulja provoditi u *in vivo* uvjetima s ciljem utvrđivanja učinkovitosti i sigurnosti primjene (Viegas i sur., 2014).

#### **1.1.3.6. Primjena u kozmetičkoj industriji**

Primjena u kozmetičkoj industriji temelji se na nekoliko učinaka vrste *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don:

1. Fotoprotektivno i antieritematozno djelovanje ekstrakata *H. italicum* omogućuje njihovu primjenu u kremama za zaštitu od sunca i pripravcima za liječenje opekлина uzrokovanih sunčevim zračenjem. Provedene su studije u kojima je ispitana aktivnost topikalno primijenjenog ekstrakta *H. italicum* na zamorcima i ljudima nakon prethodnog izlaganja UVB zračenju te je utvrđeno da je za antieritematozno i fotoprotektivno djelovanje odgovorna flavonoidna frakcija. Flavonoidna frakcija se sastoji od tri monoglikozida (halkon-2'-glukozid, naringenin-glikozid, kempferol-3-glukozid) i četiri aglikona (gnafalin, apigenin, naringenin i luteolin).

Mehanizam djelovanja flavonoida uključuje inhibiciju lipidne peroksidacije i stabilizaciju membrane mastocita. Najznačajniji inicijatori lipidne peroksidacije su reaktivni spojevi kisika (*reactive oxygen species*, ROS) odnosno točnije, hidroksilni (OH·) i hidroperoksil (HOO·) radikali. Ovi radikali reagiraju s polinezasićenim masnim kiselinama

(*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) prisutnim u membranama i time iniciraju proces lipidne peroksidacije. Pri tome nastaju lipidni ( $R\bullet$ ), alkoksi ( $RO\bullet$ ) i peroksil radikali ( $ROO\bullet$ ) koji su uključeni u proces propagacije i održavanja lančane reakcije koja dovodi do oštećenja stanične membrane i stanica, a time u konačnici i do oštećenja kožne barijere. *In vitro* ispitivanja su pokazala da flavonoidi prisutni u *H.italicum* u većoj mjeri inhibiraju lipidnu peroksidaciju u jetrenim mikrosomima Sprague-Dawley štakora nego hidroksilne i hidroperoksil radikale. To upućuje na činjenicu da uklanjanje radikala odgovornih za inicijaciju (hidroksilni i hidroperoksil radikali) nije jedini način djelovanja flavonoida. Stoga je vjerojatno da flavonoidi uklanjaju i radikale uključene u proces propagacije (lipidni, alkoksi i peroksil radikale), te dodatno keliraju i metalne ione uključene u nastanak hidroksilnog radikala ( $OH\bullet$ ) u Fentonovoj i Haber-Weiss reakciji. Ovi dodatni mehanizmi doprinose značajnijoj inhibiciji lipidne peroksidacije. Mogući mehanizam kojim lipidna peroksidacija potiče upalni proces je aktivacija fosfolipaze A2 (phospholipase A2, PLA2) i fosfolipaze C (phospholipase C, PLC) nakon izlaganja UV zračenju. Povećana aktivnost PLA2 rezultira povećanim količinama slobodne arahidonske kiseline koja je supstrat za sintezu prostaglandina, uključenih u upalne procese izazvane UV zračenjem. Povećana aktivnost PLC doprinosi povećanom nastanku diacilglicerola koji je kofaktor enzima protein kinaze C, odgovornog za pojačanu staničnu proliferaciju i karcinogenezu uzrokovanu UV zračenjem. Osim inhibicije lipidne peroksidacije, flavonoidi mogu djelovati i kao stabilizatori membrane mastocita sprječavajući tako oslobađanje histamina iz mastocita, histaminom stimuliranu proizvodnju prostagladina i razvoj upale (Hruza i Pentland, 1993; Maffei Facino i sur., 1990).

2. Sprječavanje depolimerizacije hijaluronske kiseline, izazvane reaktivnim kisikovim vrstama (ROS), omogućuje primjenu flavonoida vrste *H. italicum* u kozmetici. Depolimerizacija hijaluronske kiseline je prisutna u određenim patološkim degenerativnim procesima na koži, ali i tijekom normalnog procesa starenja kože. Smanjenje razine hijaluronske kiseline, s obzirom da je odgovorna za vezanje i zadržavanje vode, dovodi do suhoće (dehidracije), atrofije i gubitka elastičnosti što i jesu karakteristike ostarjele kože. Stoga bi flavonoidni ekstrakti *H. italicum*, budući da imaju antioksidativno djelovanje, mogli naći primjenu u kozmetičkim proizvodima protiv starenja kože te za njegu suhe, zrele kože (Papakonstantinou i sur., 2012; Maffei Facino i sur., 1990).

3. Eterično ulje *H. italicum* djeluje kao cikatrizant pa se može primjenjivati u svrhu regeneracije kože te za zacjeljivanje rana. Proces zacjeljivanja rana potpomaže i antioksidativno djelovanje eteričnog ulja kojim se preveniraju oksidativna oštećenja tkiva



uzrokovana slobodnim radikalima. Terapijski učinak eteričnog ulja već nalazi primjenu u kozmetici (pripravci za tretiranje ožiljaka i drugih nepravilnosti na koži), a mogao bi se koristiti i u rekonstruktivnoj kirurgiji. Itolidioni, prisutni u eteričnom ulju, djeluju kao flebotonici. Flebotonici jačaju stijenke krvnih žila, povećavaju venski tonus i limfnu drenažu. Zbog flebotoničnog djelovanja eterično ulje se primjenjuje za ublažavanje crvenila i teleangiektazija (sitne proširene krvne žile kože i sluznica) prisutnih kod rozacee, hematoma (modrica), proširenih i upaljenih vena (Guinoiseau i sur., 2013).

Fraternale i sur. su usporedili učinak eteričnog ulja *H. italicum* i oleanolne kiseline, pentacikličkog triterpena s protektivnim učinkom na kožu, na *in vitro* inhibiciju aktivnosti kolagenaze i elastaze. Oleanolna kiselina se koristila kao standard (pozitivna kontrola). Ispitivanje je pokazalo da eterično ulje ima antikolagenaznu i antielastaznu aktivnost, a isto su pokazale i određene komponente eteričnog ulja, individualno i u smjesi. Tako je utvrđeno da  $\alpha$ -pinen i limonen zasebno, ali i u smjesi inhibiraju aktivnost kolagenaze i elastaze. Inhibicija je značajnija kada su u smjesi što upućuje na sinergistički učinak. Aktivnost eteričnog ulja je veća od aktivnosti smjese  $\alpha$ -pinena i limonena vjerojatno zbog prisutnosti drugih komponenti koje djeluju u sinergiji s  $\alpha$ -pinenom i limonenom. Kolagenaza je enzim odgovoran za razgradnju kolagena, a pripada matriksnim metaloproteinazama (matrix metalloproteinases, MMPs). Poznato je da je njezina aktivnost pojačana kod prekomjernog izlaganja UV zračenju što dovodi do povećane razgradnje kolagena i prijevremenog starenja kože. Elastaza je proteolitički enzim koji je odgovoran za razgradnju elastina, čiji gubitak dovodi do smanjenja elastičnosti kože i nastanka bora. Te spoznaje omogućuju primjenu eteričnog ulja *H. italicum* u različitim kozmetičkim preparatima protiv nastanka bora i prijevremenog starenja kože (Fraternale i sur., 2019).

## **1.2. Eterično ulje smilja (*Helichrysum italicum*)**

Eterično ulje je smjesa hlapljivih, lipofilnih sastavnica izoliranih iz biljnih dijelova. Intenzivnog je mirisa, dobro topljivo u lipofilnim otapalima, a teško topljivo u vodi. Optički je aktivno i jako lomi svjetlost (Kuštrak, 2005). Sintetizira se i odlaže u žljezdanim dlakama koje su prisutne na površini cvjetova (latice, lapovi) i listova (pricvjetni i listovi stabljike) (Rodrigues i sur., 2015). Lokalizirano je egzogeno, između vanjske stijenke žljezdane stanice i kutikule (Kuštrak, 2005). Kod *H. italicum* subsp. *italicum* gustoća žljezdanih dlaka je velika na području vjenčića, a smanjuje se na pricvjetnim listovima dok je kod *H. italicum* subsp.

*microphyllum* gustoća žljezdanih dlaka uglavnom konstantna na svim biljnim organima (Morone-Fortunato i sur., 2010).

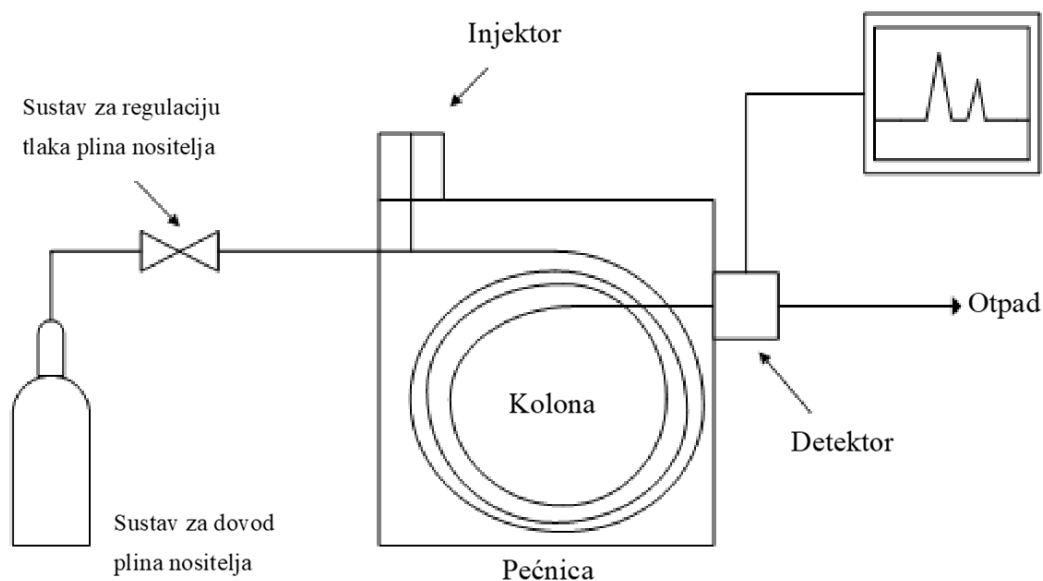
Količina eteričnog ulja u cvjetnim glavicama je vrlo mala (manje od 0,05%) (Rajić i sur., 2015), a prinos eteričnog ulja, između ostalog, ovisi o stadiju rasta biljke. Tako je prinos eteričnog ulja najveći prije cvjetanja (0,21%) i u fazi kasnih ljetnih izbojaka (0,35%) nakon velikih količina kiše, a najmanji u fazi formiranja cvata (0,06%) (Blažeković i sur., 1995). Berba smilja za proizvodnju eteričnog ulja odvija se u vrijeme cvatnje kada je otvoreno 50% cvjetova u nasadu. Smilje se bere u ranim jutarnjim satima kada je koncentracija eteričnog ulja u cvjetovima najveća, a cvjetovi se moraju destilirati unutar 24 sata jer se nakon branja koncentracija eteričnog ulja počinje smanjivati (Pohajda i sur., 2015; Rajić i sur., 2015). Biljke uzgojene u kontinentalnim područjima u fazi cvjetanja sadrže 50% vlage i 0,15% ulja, a nakon cvjetanja 30% vlage i 0,13% eteričnog ulja (Rajić i sur., 2015).

### 1.2.1. Kemijski sastav

Eterična ulja su smjese velikog broja kemijski različitih sastavnica (20 – 200). No, uvijek je samo nekoliko sastavnica prisutno u većoj količini dok su ostale prisutne u tragovima (< 1%). Od svih spojeva u eteričnom ulju je najviše terpena. Za identifikaciju sastavnica eteričnog ulja te za određivanje njihovog sadržaja posebno je prikladna plinska kromatografija (Kuštrak, 2005).

Plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*, GC) je separacijska tehnika koja omogućava razdvajanje sastavnica uzorka na temelju njihove razlike u distribuciji između dviju faza, mobilne (pokretne) i stacionarne (nepokretne) faze. Prikladna je za analizu termostabilnih i hlapljivih tvari. Mobilnu fazu čini plin nositelj, a to je određeni kemijski inertni plin (helij, argon, dušik, vodik). U plinskoj kromatografiji koriste se punjene i kapilarne kolone. Punjene kolone su izrađene od staklenih, metalnih ili teflonskih cijevi (duljine 1–3 m i unutarnjeg promjera 2–4 mm) koje sadrže punilo odnosno čvrsti nosač, velike specifične površine, na koji je nanesen tanki sloj tekuće stacionarne faze. Kapilarne kolone su izrađene od izvučenog kvarca, a unutrašnja stijenka je presvučena tankim slojem tekuće stacionarne faze. Kapilarne kolone su duljine 5–60 m, a unutarnjeg promjera 0,1–0,5 mm.

Plinski kromatograf se sastoji od sustava za dovod i regulaciju tlaka plina nositelja, injektora (sustav za uštrcavanje uzorka), pećnice, kromatografske kolone i detektora (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz plinskog kromatografa  
(preuzeto s <https://cnx.org>)

Bitni kromatografski uvjeti u GC-u su protok plina nosača, koji mora biti konstantan, i temperatura kolone, koja mora biti kontrolirana. Analiza se može provoditi uz konstantnu temperaturu (izotermalna GC) ili uz programirano povišenje temperature (temperaturno programirana GC). Izotermalna GC je prikladna za uzorke s malim rasponom komponenti vrelišta za razliku od temperaturno programirane GC koja je prikladna za uzorke šireg raspona vrelišta.

Za analizu se u injektor unosi mala količina uzorka. Uzorak trenutačno isparava jer je temperatura na ulazu u kolonu za oko 50 °C veća od vrelišta najmanje hlapljive komponente, a tijekom analize sastavnice uzorka nošene plinovitom mobilnom fazom prolaze kroz kolonu. Odjeljivanje sastavnica uzorka temelji se na:

1. razlici u isparljivosti sastavnica koje imaju različito vrelište pri čemu će sastavnica nižeg vrelišta prije eluirati od sastavnice višeg vrelišta

2. razlici u interakciji sastavnica sa stacionarnom fazom (ukoliko sastavnice imaju isto vrelište) pri čemu će sastavnica koja se duže zadržava na stacionarnoj fazi sporije eluirati u odnosu na onu sastavnicu koja se kraće zadržava na stacionarnoj fazi.

Na kraju kolone odijeljene sastavnice se detektiraju uz pomoć plamenoionizacijskog detektora (eng. *Flame Ionization Detector*, FID), detektora toplinske vodljivosti, detektora apsorpcije elektrona (eng. *Electron Capture Detector*, ECD) ili masenog detektora (Skoog i sur., 1999).

Masena spektrometrija (eng. *Mass spectrometry*, MS) je spektroskopska tehnika koja plinovite molekule analita ionizira, a potom nastale ione razdvaja prema masi u analizatoru primjenom električnog ili magnetskog polja. Dobiveni spektar masa prikazuje ovisnost relativne zastupljenosti različitih ionskih vrsta o omjeru mase i pozitivnog ili negativnog naboja iona ( $m/z$ ). Na temelju masenog spektra mogu se pouzdano identificirati sastavnice uzorka odijeljene plinskom kromatografijom pa te dvije metode zajedno čine spregnutu GC/MS tehniku (Council of Europe, 2013).

Mastelic i sur. su ispitivali kvalitativni i kvantitativni sastav eteričnog ulja hrvatskog smilja pomoću GC/MS analize. Biljni materijal je sakupljen u okolini Splita te je eterično ulje izolirano postupkom hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru. Prinos eteričnog ulja je iznosio 0,12%. Pojedine komponente eteričnog ulja identificirane su na temelju usporedbe vremena zadržavanja (retencijskog vremena) ispitivane komponente eteričnog ulja i standarda te na temelju usporedbe masenog spektra ispitivane komponente s masenim spektrom standarda dostupnim u literaturi. Sadržaj eteričnog ulja određen je iz površina pikova. GC/MS analizom su odijeljene 54 komponente pri čemu su 52 komponente identificirane. Identificirane komponente i njihov kvantitativni sastav u eteričnom ulju su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Identificirane komponente i njihov postotni sadržaj u eteričnom ulju *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

Sastavnice	Postotak (%) u eteričnom ulju
$\alpha$ -Pinen	10,2
$\beta$ -Pinen	0,6
Limonen	3,8
$\alpha$ -Terpinen	0,3
$\gamma$ -Terpinen	0,7
Terpinolen	0,3
<i>p</i> -Cimen	0,2
$\alpha$ -Kopaen	0,2
$\alpha$ -Bergamoten	0,7
$\beta$ -Kariofilen	4,2
$\alpha$ -Humulen	1,6
$\alpha$ -Selinen	0,4

$\beta$ -Selinen	1,6
<i>ar</i> -Kurkumen	2,3
$\delta$ -Kadinen	0,5
<i>allo</i> -Aromadendren	0,2
Aromadendren	4,4
$\alpha$ -Cedren	9,6
$\alpha$ -Amorfen	n.d.
$\alpha$ -Pačulen	0,5
$\gamma$ -Gurjunen	1,0
2,3,4,7,8,8a-Heksahidro-1H-3a,7- metanoazulen	3,0
Tridekan	0,4
Tetradekan	0,2
1,8-Cineol	0,3
Linalol	1,4
Nerol oksid	0,1
Nerol	0,2
Neril acetat	11,5
Geraniol	0,2
Geranil acetat	4,7
$\alpha$ -Terpineol	1,4
<i>trans</i> -Nerolidol	0,6
Guaiol	0,6
$\alpha$ -Bisabolol	0,8
$\beta$ -Eudesmol	0,5
Timol	1,1
Toreiol	1,1
<i>trans</i> -Pinokarveol	0,2
Fenkol	0,2
Feniletil tiglat	0,9
<i>trans</i> -2-Metil-2-but-3-en kiselina	0,1
<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol	n.d.
6-Metil-3-heptanon	0,2

2-Metilcikloheksilpentanoat	8,3
2-Metilcikloheksiloktanoat	4,8
Dekanska kiselina	0,6
Undekanska kiselina	n.d.
Dodekanska kiselina	0,7
$\beta$ -Kostol	n.d.
Tridekanska kiselina	0,2
Tetradekanska kiselina	0,3

n.d. – nije detektirano (postotak sastavnice nije određen jer je sastavnica prisutna u uzorku eteričnog ulja u količini manjoj od 0,1%)

Najzastupljenije komponente među monoterpenskim ugljikovodicima su  $\alpha$ -pinen (10,2%) i limonen (3,8%) dok su najzastupljeniji seskviterpenski ugljikovodici  $\alpha$ -cedren (9,6%), aromadendren (4,4%),  $\beta$ -kariofilen (4,2%), 2,3,4,7,8,8a-heksahidro-1H-3a,7-metanoazulen (3,0%) i *ar*-kurkumen (2,3%). Od oksigeniranih komponenti u najvećoj količini su prisutni neril acetat (11,5%), 2-metilcikloheksilpentanoat (8,3%), geranil acetat (4,7%) i 2-metilcikloheksiloktanoat (4,8%) (Mastelic i sur., 2005).  $\alpha$ -Pinen je bioaktivna sastavnica prisutna u brojnim eteričnim uljima, a i najzastupljenija je sastavnica eteričnog ulja hrvatskog smilja.  $\alpha$ -Pinen ima antimikrobno (modulira bakterijsku rezistenciju na antibiotike djelovanjem na efluksne pumpe), antioksidativno (smanjuje nastanak ROS uzrokovan UVA zračenjem), antitumorsko djelovanje (stimulira apoptozu tumorskih stanica) i gastroprotektivno djelovanje (smanjuje alkoholom stimulirano oštećenje sluznice želuca i nastanak peptičkog ulkusa) (Salehi i sur., 2019).

### 1.2.2. Čimbenici koji utječu na sastav eteričnog ulja

Kemijski sastav eteričnog ulja je pod utjecajem nekoliko čimbenika, a to su uvjeti okoliša koji biljka nastanjuje (tlo, osunčanost, nadmorska visina, klima), geografski položaj, genetska varijabilnost i stadij razvoja biljke (Peršić i sur., 2019).

Morone-Fortunato i sur. su analizirali dvadeset genotipova *H. italicum* ssp. *italicum* s različitih lokacija u Italiji i na Korzici. Pri tome je određeno nekoliko kemotipova eteričnog

ulja te je na taj način potvrđena varijabilnost u kemijskom sastavu eteričnih ulja ovisno o geografskom porijeklu. Potvrđena su tri glavna kemijska profila:

- 1) genotip koji sadrži velike količine nerola i njihovih estera
- 2) genotip koji sadrži velike količine  $\alpha$ -selinena i  $\beta$ -selinena
- 3) genotip koji sadrži velike količine  $\gamma$ -kurkumena (Morone-Fortunato i sur., 2010).

Sastav eteričnog ulja s devet različitih lokacija duž Jadranske obale je kvalitativno bio vrlo sličan, ali se razlikovao postotni sadržaj pojedinih komponenti. Unatoč zamjetnoj razlici u udjelu pojedinih komponenti u ispitivanim uzorcima zajedničko obilježje svih uzoraka bio je visoki udio seskviterpena (Blažeković i sur., 1995).

Sastav eteričnog ulja ovisi i o stadiju razvoja biljke. Blažeković i sur. su proveli ispitivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava eteričnog ulja *H. italicum* ubranog u Veloj Luci na Korčuli u različitim fazama razvoja biljke: rani izbojci, formiranje cvata, prije cvjetanja, za vrijeme cvjetanja, nakon cvjetanja i kasni ljetni izbojci. Kvalitativni sastav eteričnog ulja u različitim stadijima rasta biljke je bio gotovo isti, ali kvantitativni sastav se značajno razlikovao. Primijećeno je da je  $\alpha$ -pinen, kao jedan od glavnih predstavnika monoterpena, najzastupljeniji u fazama ranih izbojaka (24,58%) i prilikom formiranja cvata (28,86%) dok je u maloj količini prisutan za vrijeme cvjetanja (4,15%) i nakon cvjetanja (4,36%). S druge strane,  $\alpha$ -kurkumen, jedan od najzastupljenijih seskviterpena, prisutan je u vrlo maloj količini u fazi ranih izbojaka (0,44%) dok je u fazi cvjetanja najzastupljeniji spoj (28,06%). Zaključeno je da u ranom stadiju razvoja biljke prevladavaju monoterpeni dok su seskviterpeni dominantni u fazi cvjetanja i u fazi nakon cvjetanja biljke (Blažeković i sur., 1995).

Ćavar Zeljković i sur. su analizirali 4 uzorka eteričnog ulja, dobivena hidrodestilacijom nadzemnih dijelova *H. italicum* s različitih lokacija (Brač, Biokovo, Tijarica, okolica Makarske), i utvrdili da su razlike u količini i sastavu eteričnog ulja rezultat razlike u parametrima kojima je biljka izložena, kao što su nadmorska visina i izloženost suncu. To za posljedicu ima i razlike u biološkim svojstvima uzoraka. Sva 4 uzorka su imala sličan kemijski sastav, ali su značajne razlike u postotnom sadržaju pojedinih komponenti. Tako je postotak oksigeniranih monoterpena i seskviterpena bio veći u uzorcima s Biokova i iz okolice Makarske čime je pokazano da je razina oksigeniranih monoterpena i seskviterpena u eteričnom ulju veća na većim nadmorskim visinama (uzorak s Biokova) i pri većoj izloženosti suncu (uzorak iz okolice Makarske). Za razliku od oksigeniranih komponenti, razina monoterpenskih ugljikovodika pokazuje suprotan trend (Ćavar Zeljković i sur., 2015).

### 1.2.3. Toksičnost eteričnog ulja

Malo je provedenih studija toksičnosti eteričnog ulja *H. italicum*. Citotoksičnost eteričnog ulja *H. italicum* je proučavana na kvascu *Saccharomyces cerevisiae* te je pokazano da eterično ulje ima minimalni učinak na preživljavanje stanica kvasca. Studije genotoksičnosti su provedene na *Saccharomyces cerevisiae* i *Drosophila melanogaster*, ali u oba slučaja eterično ulje nije pokazalo niti jednu vrstu značajne genotoksičnosti već je, naprotiv, pokazalo antigenotoksično djelovanje. Naime, kada je eterično ulje pomiješano s promutagenom poliuretanom, smanjen je broj somatskih mutacija u vinskoj mušici između 54% i 57% (Viegas i sur., 2014). Topikalna primjena nerazrijeđenog eteričnog ulja se obično ne preporuča. Ono je pokazalo blago iritirajuće djelovanje na zamorcima, ali ne i na miševima i svinjama, dok ispitivanjem provedenim na dobrovoljcima nije zapaženo niti iritirajuće niti fototoksično djelovanje (Tisserand i Young, 2014). Ustanovljeni kontaktni alergeni kod ljudi, koji su ujedno prisutni u smilju, su  $\beta$ -kariofilen, geraniol, limonen, linalol,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -terpineol i terpinolen (SCCS/1459/11). Sistemske učinke nakon oralne primjene ispitani su na štakorima i zamorcima. Eterično ulje nije akutno toksično jer LD50 (doza koja uzrokuje smrt 50% ispitivanih životinja) oralno kod štakora iznosi >5 g/kg. Subakutna toksičnost je ispitana prilikom oralne primjene 2% otopine eteričnog ulja kod zamoraca u dozi od 5 mL/kg/dan tijekom 14 dana. Pri tome je došlo do povremene pojave gastričnih ulceracija (Tisserand i Young, 2014). Ukoliko se eterično ulje proguta i uđe u dišne putove može uzrokovati oštećenje pluća ([www.nhrorganicoils.com](http://www.nhrorganicoils.com)).

### 1.3. Hidrolat

Hidrolat ili cvjetna vodica je vodena otopina zasićena pojedinim sastavnicama eteričnog ulja. Kisela je tekućina (pH u rasponu od 4,5 do 5,5). Obično sadrži manje od 1 g/L (tj. 0,10%) hlapljivih organskih spojeva iz eteričnog ulja koji ostaju otopljeni u vodenoj fazi prilikom destilacije eteričnog ulja. Hidrolat sadrži pretežno hidrofilnije tvari iz eteričnog ulja pa stoga ne sadrži iste omjere sastavnica kao i eterično ulje. U hidrolatu je više oksigeniranih komponenti (kislinae, monoterpenski alkoholi, aldehidi, ketoni, seskviterpenski alkoholi i ketoni), a puno manje hidrofobnih monoterpenskih i seskviterpenskih ugljikovodika koji su slabije topivi u vodi. Stoga su eterična ulja u kojima dominiraju oksigenirani spojevi sličnijeg

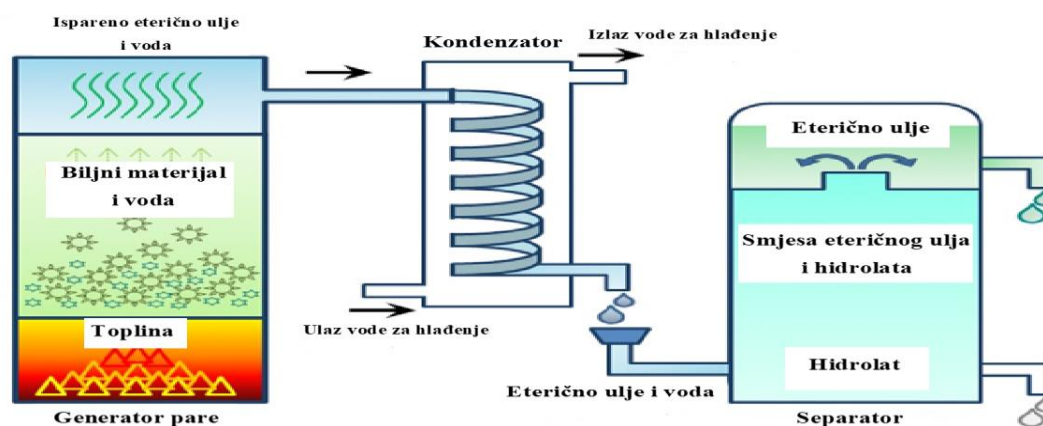


sastava hidrolatu od eteričnih ulja u kojima su glavne sastavnice monoterpenski i seskviterpenski ugljikovodici (Aćimović i sur., 2020; Marković, 2010).

Kvaliteta hidrolata se određuje na temelju količine hlapljivih organskih spojeva prisutnih u hidrolatu te se prilikom kontrole kvalitete preporučuje apsolutna kvantifikacija kako bi se otkrile eventualne patvorine nastale razrjeđivanjem hidrolata vodom. U većini farmakopeja nedostaju standardi kvalitete za hidrolate odnosno nisu definirane vrijednosti fizikalnih (relativna gustoća, indeks refrakcije, optička rotacija, krutište i topljivost) i kemijskih (kiselinski broj, peroksidni broj, saponifikacijski broj) parametara na temelju kojih bi se moglo zaključiti o kvaliteti i čistoći hidrolata kao što je to slučaj za eterična ulja (Politi i sur., 2020; Kuštrak, 2005).

### **1.3.1. Dobivanje hidrolata**

Hidrolat nastaje kao nusprodukt destilacije biljnog materijala. Razlikuju se tri destilacijska postupka: destilacija pomoću vodene pare (vodena destilacija), vodenoparna destilacija i parna destilacija. Pri vodenoj destilaciji biljni materijal je uronjen u vodu koja se zagrijava do vrenja te prilikom isparavanja vode, vodena para odnosi čestice eteričnog ulja. Pri prolasku kroz hladilo dolazi do kondenzacije vode i eteričnog ulja koji se zajedno skupljaju u posudu. Budući da se eterično ulje ne otapa u vodi i lakše je od vode ono se skuplja na površini, a voda koja se skuplja ispod ulja predstavlja hidrolat (slika 4). Kod vodenoparne destilacije biljni materijal se nalazi na perforiranoj podlozi iznad sloja vode i u izravnom je dodiru samo s vodenom parom. Kod parne destilacije je izvor topline gdje se stvara vodena para prostorno odijeljen od biljnog materijala te se vodena para uvodi u kotao s biljnim materijalom (Marković, 2010; Kuštrak, 2005).



Slika 4. Shematski prikaz postupka vodene destilacije  
(preuzeto s <https://onlinelibrary.wiley.com>)

### 1.3.2. Primjena hidrolata

Zbog svojih bioloških učinaka i organoleptičkih svojstava hidrolati se primjenjuju u kozmetičkoj industriji i industriji parfema, prehrambenoj industriji, aromaterapiji te kao repelenti protiv insekata. U kozmetičkoj industriji hidrolati sve više zamjenjuju vodu osiguravajući dodatne aktivne sastavnice. Koriste se kao vodena faza u proizvodnji krema, losiona, sapuna. U prehrambenoj industriji mogu se koristiti za aromatiziranje voćnih napitaka i bezalkoholnih pića, za čuvanje hrane te kao sredstva za dezinfekciju tijekom pranja svježeg rezanog voća i povrća, ali i za dezinfekciju ostalih prehrambenih proizvoda poput slatkovodne ribe i fermentiranih mesnih proizvoda. U aromaterapiji se primjenjuju za smanjenje stresa i anksioznosti (Aćimović i sur., 2020).

#### 1.3.2.1. Hidrolat smilja (*Helichrysum italicum*)

Kao i eterično ulje, hidrolat smilja ima izražena određena terapijska svojstva. Njegovo djelovanje uključuje analgetski, antiinfektivni, protuupalni, antikoagulantni, ekspektorirajući, lipolitični, mukolitični i sedativni učinak. Ima i regenerirajući učinak pa pomaže ublažiti vidljivost svježih ožiljaka, potiče brže zacjeljivanje rana, masnica i upalnih stanja kože. Hidrolat smilja učinkovit je u tretiranju paradontoze i gingivitisa. Može se primjenjivati kao tonik za čišćenje lica te za njegu kože lica. Zbog svojih učinaka, mirisa i mogućnosti lokalne primjene bez razrjeđivanja, hidrolat smilja nalazi primjenu u kozmetičkoj industriji te industriji sapuna i mirisa (Rajić i sur., 2015; Catty, 2001).

## **2.OBRAZLOŽENJE TEME**

Ljekovito i aromatično bilje poput smilja već se stoljećima koristi za tretiranje različitih bolesti jer sadrži komponente koje imaju odgovarajuću terapijsku vrijednost. Danas sve više raste interes farmaceutske i kozmetičke industrije za eteričnim uljem smilja zbog njegovih brojnih pozitivnih farmakoloških djelovanja (Rajić i sur., 2015). S obzirom na sve širu primjenu eteričnog ulja važno je ispitati njegovu kvalitetu. Farmakopeje za svako oficinalno eterično ulje propisuju granične vrijednosti za fizikalne (relativna gustoća, indeks refrakcije, optička rotacija, krutište, vrelište i topljivost) i kemijske konstante (kiselinski broj, peroksidni broj, saponifikacijski broj) na temelju kojih se prosuđuju njegova kakvoća i ispravnost (Kuštrak, 2005). Razlike u vrijednostima tih konstanti važne su jer ukazuju na razlike u kvaliteti pojedinog eteričnog ulja, na moguće postojanje nečistoća i na razlike u biljnom materijalu iz kojeg se ulje dobiva (Kovač-Bešović, 2001). Eterično ulje smilja nije oficinalno u Europskoj farmakopeji što otežava ispitivanje njegove kakvoće i moguću primjenu u farmaciji iako postoje brojni radovi o kvaliteti eteričnog ulja smilja, pa čak i mišljenje Europske agencije za lijekove (*European Medicines Agency*, EMA) o cvijetu pješčarskog smilja (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench).

Hidrolat, kao nusprodukt destilacije smilja, zbog svojih terapijskih učinaka i organoleptičkih svojstava, nalazi sve veću primjenu u različitim područjima, od medicine preko kozmetičke industrije i industrije mirisa sve do prehrambene industrije. Unatoč sve većoj uporabi hidrolata u različite svrhe, nisu precizno definirana ispitivanja kojima se procjenjuju kakvoća i ispravnost hidrolata odnosno standardi kvalitete hidrolata općenito, pa tako ni hidrolata smilja (Aćimović i sur., 2020; Politi i sur., 2020).

Cilj ovoga diplomskog rada je ustvrditi postoji li razlika u kvaliteti i čistoći hidrolata smilja uzgojenog u Dalmaciji (dalmatinskog hidrolata) i hidrolata smilja uzgojenog u kontinentalnoj Hrvatskoj (kontinentalnog hidrolata) s obzirom na lokaciju i uvjete u kojima biljka raste. Uzorcima dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja su izmjerene određene fizikalne (relativna gustoća, indeks refrakcije) i kemijske vrijednosti (kiselinski broj) te pH, mutnoća i sadržaj eteričnog ulja. Budući da u literaturi nema definiranih vrijednosti za procjenu kvalitete hidrolata, u ovom su radu dobivene vrijednosti uspoređene s dostupnim podacima za ispitivanje čistoće i kvalitete eteričnih ulja.

### **3.MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Standardna pufovska otopina pH 4,00 (limunska kiselina/natrijev hidroksid/klorovodična kiselina), Kemika
- Standardna pufovska otopina pH 7,00 (kalijev dihidrogenfosfat/natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat), Kemika
- Redestilirana voda
- Destilirana voda
- Etanol (96%), Kemika
- NaCl (natrijev klorid), Kemika, Mr=58,44
- Otopina KOH (kalijev hidroksid), c=0,1 M
- Fenolftalein (1% etanolna otopina), Kemika

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

#### 3.1.2. Laboratorijski pribor

- Laboratorijske čaše od 25 mL, 50 mL, 100 mL
- Okrugla tikvica s ravnim dnom od 500 mL
- Menzure od 50 mL, 100 mL
- Graduirane pipete od 10 mL
- Gumene propipete
- Kamenčići za vrenje
- Laboratorijska žlica
- Metalni stativ
- Tronožac
- Plamenik
- Keramička mrežica
- Mufe
- Hvataljke
- Aparatura po Ungeru

- Liebigovo hladilo
- Erlenmayerove tikvice od 250 mL
- Bireta od 50 mL
- Mikropipeta od 200–1000  $\mu$ L
- Piknometri od 5 mL

### 3.1.3. Instrumenti

- Za vaganje je korištena Mettler Toledo XP 205 analitička vaga s točnošću odvage 0,01 mg.
- Za određivanje pH hidrolata korišten je Mettler Toledo MP 220 pH-metar s razlučivošću mjerenja od 0,01. Za kalibraciju je korišten pufer pH 4,00 i pH 7,00.
- Za određivanje indeksa refrakcije hidrolata korišten je Hanon A670 automatski refraktometar s razlučivošću mjerenja do 0,00001 (nD). Za kalibraciju je korištena redestilirana voda (indeks refrakcije je iznosio 1,3329).
- Za određivanje mutnoće hidrolata korišten je Hach 2100P turbidimetar (slika 5).



Slika 5. Hach 2100P turbidimetar

(preuzeto s <https://uk.hach.com>)

### 3.1.4. Uzorci

Uzorci hidrolata smilja prikupljeni su s lokalnih OPG-ova. Tri uzorka hidrolata dobivena su od smilja uzgojenog u obalnom području Dalmacije (dalmatinski hidrolat smilja 1, 2 i 3), a druga tri uzorka hidrolata su dobivena od smilja uzgojenog u kontinentalnoj Hrvatskoj (kontinentalni hidrolat smilja 1, 2 i 3).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Relativna gustoća

Relativna gustoća je omjer mase određenog volumena ispitivane tvari na temperaturi  $t_1$  i mase istog volumena vode na temperaturi  $t_2$ . S obzirom da gustoća ovisi o temperaturi bitno je navesti temperaturu kod koje se mjeri relativna gustoća. Ukoliko nije drugačije navedeno relativna gustoća određuje se na temperaturi od 20 °C. Određuje se pomoću hidrostatske vage (krutine), hidrometra (tekućine), digitalnog mjerača gustoće s oscilirajućim transduktorom (tekućine ili plinovi) ili piknometra (krutine ili tekućine) (Council of Europe, 2013). Piknometar je staklena bočica s čepom koji dobro prianja uz grlić bočice. Ima oznaku pomoću koje možemo uvijek naliti isti volumen tekućine u piknometar (Winterhalter i sur., 1990). Relativna gustoća je važan kriterij za čistoću eteričnog ulja te za eterična ulja iznosi između 0,690–1,118 (Kuštrak, 2005). Osim toga, na temelju relativne gustoće mogu se dobiti neki podaci o kemijskom sastavu eteričnog ulja. Tako je relativna gustoća za eterična ulja koja sadrže veću količinu terpena ispod 0,900, a za ona koja sadrže veću količinu aromatičnih sastojaka iznad 1,000 (Kovač-Bešović, 2001).

#### 3.2.1.1. Postupak mjerenja

Relativne gustoće dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata su određene pomoću piknometra. Volumen piknometra je poznat i iznosi 5 mL. Taj volumen odgovara volumenu uzorka hidrolata ( $V_{\text{uzorka(hidrolata)}}$ ) odnosno volumenu vode ( $V_{\text{vode}}$ ). Čisti i suhi piknometar se izvažuje na analitičkoj vagi ( $p$ ) s točnošću odvage 0,01 mg. Potom se piknometar napuni s hidrolatom tako da se kapilara u čepu ispuni do vrha. Višak tekućine koji izlazi iz kapilare se obriše jer piknometar prilikom vaganja mora biti potpuno suh, a masa piknometra s hidrolatom se izmjeri na analitičkoj vagi ( $p_2$ ). Gustoća uzorka (hidrolata) je određena prema sljedećem izrazu:

$$\rho_{\text{uzorka(hidrolata)}} = p_2 - p / V_{\text{uzorka(hidrolata)}}$$

Piknometar se potom isprazni, ispere s običnom, a zatim i destiliranom vodom. Napuni se s destiliranom vodom te se na isti način odredi masa piknometra s vodom ( $p_1$ ). Gustoća vode je određena prema sljedećem izrazu:



$$\rho_{\text{vode}} = p_1 - p / V_{\text{vode}}$$

Relativna gustoća hidrolata je određena na temperaturi od 20 ° C prema sljedećem izrazu:

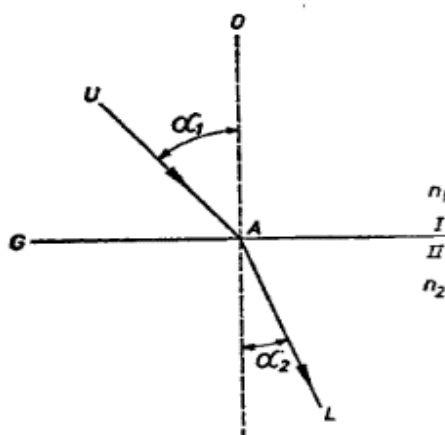
$$\text{Relativna gustoća} = \rho_{\text{uzorka(hidrolata)}} / \rho_{\text{vode}} = p_2 - p / p_1 - p$$

### 3.2.2. Indeks refrakcije

Indeks refrakcije ili loma nekog sredstva u odnosu na zrak je jednak omjeru sinusa kuta upada zrake svjetlosti u zraku ( $\alpha_1$ ) i sinusa kuta loma prelomljene zrake u tom sredstvu ( $\alpha_2$ ) (Council of Europe, 2013):

$$n_{1,2} = \sin \alpha_1 / \sin \alpha_2$$

Ovaj omjer predstavlja relativni indeks loma ( $n_{1,2}$ ) određenog sredstva i zraka (Winterhalter i sur., 1990). Svjetlost mijenja smjer rasprostiranja odnosno lomi se na granici dva sredstva (I i II) kao posljedica razlike u brzini rasprostiranja u ta dva sredstva (slika 6).



Slika 6. Lom svjetlosti na granici dva sredstva  
(preuzeto iz Winterhalter i sur., 1990)

Ukoliko su te brzine  $c_1$  i  $c_2$  onda je:

$$n_{1,2} = c_1 / c_2$$

Kako bi se optički karakterizirala pojedina sredstva koristi se apsolutni indeks loma ( $n_1$  za sredstvo I i  $n_2$  za sredstvo II). Apsolutni indeks loma nekog sredstva određuje se u odnosu na vakuum pa je tako jednak omjeru sinusa kuta upada zrake svjetlosti u vakuumu i sinusa kuta

loma prelomljene zrake u tom sredstvu. Iz apsolutnih indeksa loma dva sredstva može se lako izračunati relativni indeks loma dva sredstva (Winterhalter i sur., 1990):

$$n_{1,2} = n_2 / n_1$$

Vrijednost indeksa refrakcije ovisi o temperaturi i valnoj duljini. Što je temperatura veća, veća je brzina svjetlosti u određenom sredstvu te je manji indeks loma tog sredstva. Indeks loma je veći za kratkovalnu, a manji za dugovalnu svjetlost (Winterhalter i sur., 1990). Ukoliko nije drugačije propisano indeks loma se mjeri na temperaturi od  $20 \pm 0,5$  ° C s obzirom na valnu duljinu D-linije natrijevog spektra ( $\lambda = 589,3$  nm). U tim uvjetima indeks loma (n) često se zapisuje kao nD (Council of Europe, 2013).

Indeks refrakcije za eterična ulja iznosi između 1,43 i 1,61 te služi kao pokazatelj čistoće i kvalitete (Kovač-Bešović, 2001). Određuje se uz pomoć refraktometra koji mjeri granični kut totalne refleksije. Granični kut ( $\alpha_g$ ) je kut upada zrake svjetlosti za koji kut loma iznosi 90°. Pri tome svjetlost uopće ne prelazi u drugo sredstvo već se u potpunosti reflektira, a ta pojava se naziva totalna refleksija. Do totalne refleksije dolazi samo kada svjetlost prelazi iz sredstva većeg indeksa loma u sredstvo manjeg indeksa loma ( $n_1 > n_2$ ). Glavni dio refraktometra predstavlja prizma poznatog indeksa loma koja dolazi u dodir s tekućinom čiji se indeks refrakcije određuje. Određivanjem graničnog kuta upada, uz poznatu vrijednost kuta loma (90°) i indeksa loma prizme ( $n_1$ ), može se odrediti indeks loma ispitivane tekućine ( $n_2$ ) prema sljedećem izrazu (Winterhalter i sur., 1990):

$$\sin \alpha_g / \sin 90^\circ = n_{1,2} = n_2 / n_1$$

### 3.2.2.1. Postupak mjerenja

U ovom radu indeksi refrakcije hidrolata su određeni pomoću automatskog refraktometra. Za kalibraciju je korištena redestilirana voda (indeks refrakcije redestilirane vode je iznosio 1,3329), a mjerenje je provedeno na temperaturi od 20 ° C i pri valnoj duljini od 589,3 nm.

Indeks refrakcije uzoraka se mjeri tako da se mala količina uzorka stavi na mjernu prizmu pri čemu svjetlost putuje iz izvora kroz mjernu prizmu u uzorak. Svjetlost se potpuno reflektira na granici prizme i uzorka kada upadni kut prijeđe određenu vrijednost (granični upadni kut), a tako reflektiranu svjetlost prepoznaje CCD (Charge Coupled Device) senzor koji određuje vrijednost graničnog kuta. Uz poznatu vrijednost graničnog kuta i indeksa loma prizme, refraktometar izračuna vrijednost indeksa refrakcije uzorka ([www.gpsil.co.uk](http://www.gpsil.co.uk)).

Postupak se ponovi za sve uzorke pri čemu se između dva uzorka mjerna prizma ispere s destiliranom vodom.

### 3.2.3. Kiselinski broj

Kiselinski broj označava masu kalijevog hidroksida (KOH) u miligramima potrebnu za neutralizaciju slobodnih kiselina prisutnih u jednom gramu ispitivane tvari (Council of Europe, 2013). Mnoga eterična ulja sadrže male količine slobodnih kiselina, a njihov sadržaj se može izraziti kao kiselinski broj. Kiselinski broj odnosno sadržaj slobodnih kiselina je veći ukoliko je eterično ulje starije ili ukoliko je nepravilno skladišteno pa stoga vrijednost kiselinskog broja ukazuje na kakvoću. Povećanje slobodnih kiselina može biti posljedica oksidacije aldehida ili hidrolize estera (Kuštrak, 2005).

#### 3.2.3.1. Postupak mjerenja

U Erlenmayerovu tikvicu se stavi 1,00 mL uzorka hidrolata, doda se 30 ml 96% etanola i 2 kapi fenoftaleina kao indikatora. Potom se smjesa titrira s 0,1 M KOH do pojave ružičaste boje koja se zadržava barem 15 sekundi. Kiselinski broj se može odrediti iz izraza:

$$\text{Kiselinski broj} = 5,610 \times \text{mL (0,1 M KOH)} / \text{m(uzorka)}$$

pri čemu je masa 1,00 mL uzorka (m(uzorka)) izmjerena na analitičkoj vagi s točnošću odvage 0,01 mg.

### 3.2.4. pH-vrijednost

pH-vrijednost je negativni logaritam aktiviteta hidronijevih iona:

$$\text{pH} = -\log a(\text{H}_3\text{O}^+)$$

pH ispitivane otopine određuje se u usporedbi s pH-vrijednosti standardne otopine (pH<sub>S</sub>) prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{pH} = \text{pH}_S - (E - E_S) / k$$

pri čemu je  $E$  potencijal članka (V) s ispitivanom otopinom,  $E_S$  je potencijal članka (V) sa standardnom otopinom poznatog pH dok je  $k$  promjena potencijala po jedinici promjene pH izražena u voltima (V).  $k$  je dobivena iz Nernstove jednadžbe ( $k = 2,3026 RT/F$ ), a s obzirom da  $k$  ovisi o temperaturi i pH-vrijednost ovisi o temperaturi pa je bitno navesti temperaturu pri kojoj je određen pH (Council of Europe, 2013).

Potenciometrijsko mjerenje pH temelji se na mjerenju razlike potencijala između dviju elektroda uronjenih u ispitivanu otopinu. Jedna elektroda je radna ili indikatorska elektroda (obično je to staklena elektroda) koja je osjetljiva na vodikove ione odnosno čiji potencijal ovisi o aktivitetu  $H^+$  iona u ispitivanoj otopini. Druga elektroda je referentna elektroda (kalomel ili  $Ag/Ag^+$  elektroda) čiji je potencijal konstantan te ona služi kao standard prema kojem se mjeri potencijal radne elektrode. Ukoliko su staklena i referentna elektroda sastavljene zajedno onda čine kombiniranu pH-elektrodu (Skoog i sur., 1999.). Prilikom mjerenja pH prvo se odredi potencijal članka standardne otopine ( $E_S$ ) koja ima poznati aktivitet hidronijevih iona na određenoj temperaturi (pufer). Zatim se odredi potencijal članka s ispitivanom otopinom ( $E$ ), a uz poznatu pH-vrijednost standardne otopine i uz poznatu vrijednost  $k$  na određenoj temperaturi pH-metar izračuna i prikaže pH-vrijednost ispitivane otopine ([www.mt.com](http://www.mt.com)).

#### **3.2.4.1. Postupak mjerenja**

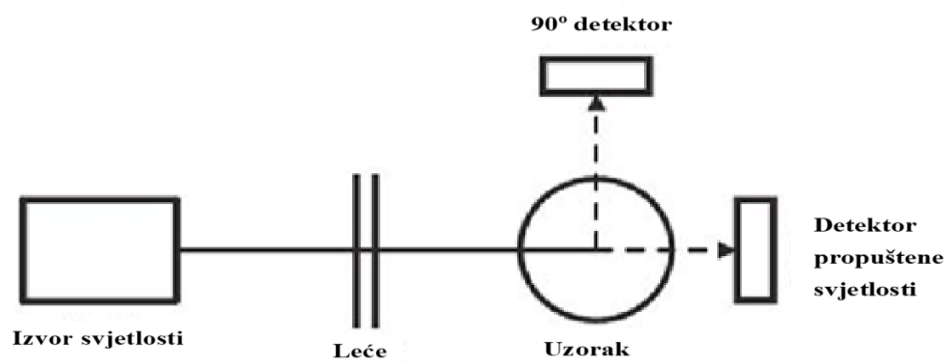
Elektroda se čuva uronjena u otopinu KCl (kalijevog klorida). Najprije se ispere s redestiliranom vodom i obriše te se pH-metar kalibrira s puferom pH 4,00 i pH 7,00 pri 20 ° C. Potom se elektroda ponovno ispere s redestiliranom vodom i obriše. Elektroda se uroni u uzorak hidrolata te se pričekava onoliko koliko je potrebno da se elektroda stabilizira i očita ispravnu pH-vrijednost. Nakon mjerenja elektroda se ispere, a isti postupak se ponovi i za ostale uzorke hidrolata. pH je određen pri temperaturi od 20 ° C.

#### **3.2.5. Mutnoća**

Mutnoća (eng. *turbidity*) je mjera zamućenosti tekućina te služi kao jednostavan pokazatelj kakvoće vode. Instrumentalne metode koje omogućuju mjerenje mutnoće su turbidimetrija i nefelometrija. Turbidimetrija je optička analitička metoda kojom se određuje mutnoća uzorka na temelju mjerenja intenziteta svjetlosti propuštene kroz uzorak. Intenzitet

propuštene svjetlosti ovisi o koncentraciji čestica u uzorku, veličini i obliku čestica te o omjeru indeksa loma čestice i okolnog medija. Za razliku od turbidimetrije, nefelometrija se temelji na mjerenju intenziteta svjetlosti raspršene na česticama uzorka (Bolf, 2020).

Mjerenje mutnoće zasniva se na slanju snopa upadne svjetlosti definiranih karakteristika prema uzorku. Dio svjetlosti se apsorbira, dio prolazi kroz uzorak, a dio svjetlosti se rasprši na česticama uzorka. Raspršenje svjetlosti na sitnim lebdećim česticama disperznih sustava naziva se Tyndallov efekt. Mutnoća se mjeri uz pomoć turbidimetra. Turbidimetar se sastoji od izvora svjetlosti, leće koja usmjerava snop svjetlosti kroz uzorak i fotoelektričnih detektora koji mjere intenzitet propuštene svjetlosti i svjetlosti raspršene pod kutom od  $90^\circ$  (slika 7).



Slika 7. Shematski prikaz turbidimetra

(preuzeto s <https://www.researchgate.net>)

Razlikuju se standardni turbidimetar (eng. *non-ratio turbidimeter*) i turbidimetar omjera (eng. *ratio turbidimeter*). Standardni turbidimetar ima samo detektor koji mjeri intenzitet raspršene svjetlosti pod kutom od  $90^\circ$  u odnosu na upadnu svjetlost, dok turbidimetar omjera ima dva detektora: detektor koji mjeri intenzitet raspršene svjetlosti i detektor koji mjeri intenzitet propuštene svjetlosti. Rezultati mjerenja izražavaju se u NTU (eng. *Nephelometric Turbidity Units*) jedinicama. Vrijednost NTU se kod standardnog turbidimetra dobije na temelju izmjerenog intenziteta raspršene svjetlosti pod kutom od  $90^\circ$ , a kod turbidimetra omjera iz omjera raspršene svjetlosti pod kutom od  $90^\circ$  i intenziteta propuštene svjetlosti (Bolf, 2020).

Za kalibraciju turbidimetra koriste se standardi koji imaju poznatu vrijednost mutnoće. Kao standard za mjerenje mutnoće se koristi suspenzija formazina koja se priprema miješanjem jednakih volumena otopine hidrazin sulfata i otopine heksametilentetramina te ima poznatu vrijednost mutnoće od 4000 NTU. Formazin je polimer s različitom duljinom

lanaca koja rezultira različitom veličinom i oblikom čestica, što je u skladu i sa stvarnim uzorcima, pa je stoga pogodan kao standard. Iz suspenzije formazina kao primarnog standarda pripremaju se druge referentne suspenzije koje imaju vrijednost mutnoće od 3 NTU, 6 NTU, 18 NTU i 30 NTU (Council of Europe, 2013).

Mjerenjem mutnoće može se odrediti i koncentracija čvrste tvari u suspenziji. Što je količina čestica u uzorku veća to je veće raspršenje upadne svjetlosti i time je mutnoća veća. Linearna ovisnost mutnoće i koncentracije se dobiva kada su sve čestice u uzorku približno jednake veličine i oblika te su homogeno raspoređene u uzorku (Council of Europe, 2013).

### **3.2.5.1. Postupak mjerenja**

Uređaj se kalibrira sa standardima koji imaju poznatu vrijednost mutnoće te stoga može automatski odrediti mutnoću ispitivanog uzorka. Uzorak hidrolata se ulije u okruglu kivetu do označene linije, a kiveta se zatvori čepom. Kiveta se obriše izvana uz pomoć tkanine bez dlačica kako bi se uklonile mrlje tekućine i otisci prstiju. Zatim se umetne u turbidimetar tako da se kiveta pravilno orijentira s obzirom na smjer upadnog snopa svjetlosti. Turbidimetar odredi vrijednost mutnoće u NTU jedinicama na temelju omjera signala detektora koji bilježi intenzitet raspršene svjetlosti pod kutom od  $90^\circ$  i signala detektora koji bilježi intenzitet propuštene svjetlosti. Postupak se ponovi za ostale uzorke hidrolata pri čemu se između dva mjerenja kiveta ispere s destiliranom vodom.

### **3.2.6. Sadržaj eteričnog ulja**

Za određivanje sadržaja eteričnog ulja najčešće se koristi vodena destilacija. Vodena destilacija uključuje uranjanje biljnog materijala u vodu koja se zagrijava do vrenja. Pri tome dolazi do isparavanja vode i eteričnog ulja čije se pare kondenziraju u hladilu te se skupljaju zajedno. S obzirom da je eterično ulje smilja lakše od vode ono se skuplja na površini (Marković, 2010). Budući da se eterično ulje i voda ne miješaju, njihovi parcijalni tlakovi se zbrajaju i kada njihov zbroj bude jednak atmosferskom tlaku smjesa će početi ključati. Stoga će takva smjesa uvijek ključati na temperaturi nižoj od točke vrenja komponente s manjim vrelištem (vode) odnosno ključat će ispod  $100^\circ\text{C}$ . Ta činjenica omogućuje izolaciju eteričnih ulja, koja predstavljaju složene smjese komponenti s vrlo visokim vrelištem, pri nižim temperaturama, a time i bez razgradnje (<https://chem.libretexts.org>). Sadržaj eteričnog ulja se

može odrediti volumetrijski (očitava se volumen izoliranog eteričnog ulja) ili gravimetrijski (određuje se masa izoliranog eteričnog ulja) (Kovač-Bešović, 2001).

### 3.2.6.1. Postupak mjerenja

Sadržaj eteričnog ulja u uzorcima hidrolata je određen volumetrijski. Uz pomoć graduirane pipete uzet je određeni volumen uzorka hidrolata ( $V(\text{uzorak})$ ) i prenesen je u okruglu tikvicu s ravnim dnom. Potom je u tikvicu dodano 160 mL destilirane vode te natrijev klorid kako bi se povećalo vrelište vode. Na kraju se dodaju kamenčići za vrenje koji osiguravaju ravnomjerno zagrijavanje uzorka. Tikvica se spoji s aparaturom po Ungeru i Liebigovim hladilom te se voda pusti kroz hladilo. Pripremljeni uzorak se zagrijava na plameniku preko keramičke mrežice, a kada počne ključati destilira se 1,5 sat. Voda i eterično ulje isparavaju, njihove pare se kondenziraju u hladilu te se kondenzat skuplja u graduiranoj cijevi koja omogućuje očitavanje volumena izoliranog eteričnog ulja. Kada destilacija završi, nakon 10 minuta se očitava volumen eteričnog ulja koje se, s obzirom da je lakše od vode, zadržava na vrhu graduirane cijevi. Graduirana cijev ima ljestvicu koja je podijeljena crticama, a svaka crtica predstavlja volumen od 20  $\mu\text{L}$ . Kako bi se odredio volumen eteričnog ulja ( $V(\text{eterično ulje})$ ), broj očitanih crtica ulja pomnoži se s 20  $\mu\text{L}$ , a postotni sadržaj eteričnog ulja u uzorku hidrolata se odredi prema sljedećem izrazu:

$$\% (\text{eterično ulje}) = (V(\text{eterično ulje}) (\text{mL}) / V(\text{uzorak}) (\text{mL})) \times 100$$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



#### 4.1. Određivanje relativne gustoće

Relativna gustoća predstavlja omjer mase određenog volumena ispitivane tvari na temperaturi  $t_1$  i mase istog volumena vode na temperaturi  $t_2$  (Council of Europe, 2013).

Relativne gustoće uzoraka hidrolata su određene pomoću piknometra pri temperaturi od 20 °C prema sljedećem izrazu:

$$\text{Relativna gustoća} = \rho_{\text{uzorka(hidrolata)}} / \rho_{\text{vode}} = p_2 - p / p_1 - p$$

pri čemu je  $p$  masa praznog piknometra,  $p_1$  je masa piknometra s vodom, a  $p_2$  je masa piknometra s uzorkom hidrolata. Postupak mjerenja relativne gustoće je opisan u poglavlju Materijali i metode. Relativna gustoća nema jedinicu jer predstavlja omjer gustoća. Izračunate vrijednosti relativne gustoće uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja su prikazane u tablici 2.

Tablica 2. Relativne gustoće uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja određene pomoću piknometra pri temperaturi od 20 °C

Uzorak hidrolata smilja	Relativna gustoća
Dalmatinski hidrolat 1	0,9995
Dalmatinski hidrolat 2	0,9850
Dalmatinski hidrolat 3	1,0490
Kontinentalni hidrolat 1	0,9834
Kontinentalni hidrolat 2	0,9834
Kontinentalni hidrolat 3	1,0750

Raspon relativne gustoće u tri uzorka dalmatinskog hidrolata je od 0,985 do 1,049, a u tri uzorka kontinentalnog hidrolata je od 0,983 do 1,075. Stoga se može zaključiti da se vrijednosti relativne gustoće dalmatinskog i kontinentalnog hidrolata međusobno ne razlikuju više nego vrijednosti uzoraka dalmatinskih hidrolata međusobno odnosno uzoraka kontinentalnih hidrolata međusobno.

Kod eteričnih ulja relativna je gustoća važan kriterij kvalitete i čistoće, a za eterično ulje smilja iznosi između 0,875 – 0,925 pri temperaturi od 20 °C što ukazuje da je eterično ulje smilja manje gustoće od vode pa stoga pluta na površini vode ([www.nhroorganiccoils.com](http://www.nhroorganiccoils.com)).

Vrijednosti relativnih gustoća uzoraka hidrolata su veće od vrijednosti određenih za eterično ulje smilja što je u skladu sa sastavom hidrolata koji pretežno čini voda dok je sadržaj hlapljivih organskih spojeva iz eteričnog ulja obično manji od 1 g/L (tj. 0,10%).

#### 4.2. Određivanje indeksa refrakcije

Indeks refrakcije ili loma nekog sredstva najčešće se izražava u odnosu na zrak pa je jednak omjeru sinusa kuta upada zrake ( $\alpha_1$ ) i sinusa kuta loma zrake ( $\alpha_2$ ) pri prijelazu svjetlosti iz zraka u to sredstvo:

$$n_{1,2} = \sin \alpha_1 / \sin \alpha_2$$

Određivanje indeksa refrakcije služi kao jednostavan pokazatelj čistoće i kvalitete (Council of Europe, 2013). Vrijednost indeksa refrakcije nije karakteristična za određeno eterično ulje, ali se u farmakopeji ipak propisuje za svako pojedino eterično ulje zato jer je ta vrijednost karakteristična za pojedine sastavnice eteričnog ulja. Stoga se može zaključiti da indeks refrakcije ovisi o kemijskom sastavu eteričnog ulja (Kuštrak, 2005). Indeks refrakcije eteričnog ulja smilja pri 20 ° C iznosi između 1,470 – 1,490 (www.nhrorganicoils.com). Vrijednosti indeksa refrakcije hidrolata smilja nisu dostupne u literaturi.

Vrijednosti indeksa refrakcije uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja su određene uz pomoć automatskog refraktometra pri temperaturi od 20 ° C i pri valnoj duljini od 589,3 nm. Za kalibraciju je korištena redestilirana voda čija je vrijednost indeksa refrakcije iznosila 1,3329. Postupak mjerenja je opisan u poglavlju Materijali i metode. Izmjerene vrijednosti indeksa refrakcije uzoraka hidrolata prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Indeksi refrakcije uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja određeni pomoću automatskog refraktometra pri 20 ° C i 589,3 nm

<b>Uzorak hidrolata smilja</b>	<b>Indeks refrakcije</b>
Dalmatinski hidrolat 1	1,3330
Dalmatinski hidrolat 2	1,3329
Dalmatinski hidrolat 3	1,3329
Kontinentalni hidrolat 1	1,3329
Kontinentalni hidrolat 2	1,3330
Kontinentalni hidrolat 3	1,3328

Izmjerene vrijednosti indeksa refrakcije dalmatinskog hidrolata 2, dalmatinskog hidrolata 3 i kontinentalnog hidrolata 1 su jednake indeksu refrakcije redestilirane vode dok se indeksi refrakcije ostalih uzoraka hidrolata razlikuju od indeksa refrakcije redestilirane vode za najviše  $\pm 0,0001$ . Dobivene vrijednosti indeksa refrakcije uzoraka hidrolata se slažu s činjenicom da više od 99% sastava hidrolata čini voda.

### 4.3. Određivanje kiselinskog broja

Kiselinski broj označava masu kalijevog hidroksida (KOH) u miligramima potrebnu za neutralizaciju slobodnih kiselina prisutnih u jednom gramu ispitivane tvari (Council of Europe, 2013):

$$\text{Kiselinski broj} = 5,610 \times \text{mL (0,1 M KOH)} / \text{m(uzorka)}$$

Kiselinski broj je pokazatelj kakvoće uzorka (u ovome radu hidrolata) jer ukazuje na sadržaj slobodnih kiselina prisutnih u uzorku. Sadržaj slobodnih kiselina je veći što je uzorak stariji ili ukoliko je nepravilno skladišten (primjerice pod utjecajem vlage dolazi do hidrolize estera prisutnih u uzorku).

Kiselinski broj uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja određen je titracijom s 0,1 M KOH uz fenolftalein kao indikator prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode. Dobivene vrijednosti kiselinskih brojeva uzoraka hidrolata prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Vrijednosti kiselinskog broja uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja

Uzorak hidrolata smilja	Kiselinski broj (mg KOH/g)
Dalmatinski hidrolat 1	0,581
Dalmatinski hidrolat 2	0,589
Dalmatinski hidrolat 3	0,553
Kontinentalni hidrolat 1	0,577
Kontinentalni hidrolat 2	0,562
Kontinentalni hidrolat 3	0,540

Vrijednosti kiselinskog broja uzoraka hidrolata nisu veće od 0,589 mg KOH/g te se vrijednosti kiselinskog broja između uzoraka hidrolata značajno ne razlikuju. Najveću

vrijednost kiselinskog broja ima dalmatinski hidrolat 2 što ukazuje na najveći sadržaj slobodnih kiselina, koji može biti posljedica starosti uzorka. S obzirom da u literaturi nisu dostupne vrijednosti kiselinskog broja eteričnog ulja smilja dobivene vrijednosti ne mogu se usporediti s vrijednostima za eterično ulje.

#### 4.4. Određivanje pH-vrijednosti

Hidrolati su kisele tekućine čiji se pH kreće između 4,5 i 5,5 iako pH hidrolata varira ovisno o vrsti iz koje se hidrolat dobiva. pH-vrijednost hidrolata utječe na njegove terapijske učinke, posebice na inhibitorni učinak na bakterije, koji je izraženiji što je hidrolat kiseliji (Aćimović i sur., 2020; Acheampong i sur., 2015).

Za određivanje pH-vrijednosti uzoraka hidrolata korišten je pH-metar s razlučivošću mjerenja od 0,01 pH jedinicu. Za kalibraciju je korištena standardna puferska otopina pH 4,00 i pH 7,00. Postupak mjerenja pH je opisan u poglavlju Materijali i metode. Izmjerene vrijednosti pH pri temperaturi od 20 °C uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Vrijednosti pH uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja izmjerene pomoću pH-metra pri 20 °C

Uzorak hidrolata smilja	pH
Dalmatinski hidrolat 1	3,81
Dalmatinski hidrolat 2	3,59
Dalmatinski hidrolat 3	3,52
Kontinentalni hidrolat 1	3,77
Kontinentalni hidrolat 2	4,66
Kontinentalni hidrolat 3	3,43

Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da se pH-vrijednosti hidrolata dalmatinskog i kontinentalnog smilja ne razlikuju više nego pH-vrijednosti dalmatinskog hidrolata međusobno odnosno kontinentalnog hidrolata međusobno. Svi uzorci hidrolata su kiseli i imaju pH-vrijednosti u rasponu od 3,43 do 3,81 osim kontinentalnog hidrolata 2 čiji je pH malo veći i iznosi 4,66. Catty (2001) navodi da se pH hidrolata *Helichrysum italicum* kreće

između 3,5 i 3,8, što se slaže s vrijednostima dobivenim u ovome radu uz prethodno spomenutu iznimku uzorka kontinentalnog hidrolata 2.

#### 4.5. Određivanje mutnoće

Mutnoća (eng. *turbidity*) je mjera zamućenosti tekućine. Što je količina čestica u uzorku veća to je veće raspršenje upadne svjetlosti, a time je i mutnoća veća (Bolf, 2020). Linearna ovisnost mutnoće i koncentracije suspendiranih čestica se dobiva kada su sve čestice u uzorku približno jednake veličine i oblika te su homogeno raspoređene u uzorku (Council of Europe, 2013). Osim o suspendiranim česticama mutnoća ovisi i o prisutnosti organskih tvari i ostalih plutajućih ostataka te mjehurića zraka. Mjerenje mutnoće je jednostavan pokazatelj kakvoće vode pa tako i kakvoće hidrolata. Osim što prisutnost zamućenja nije prihvatljiva zbog estetskog izgleda ona ukazuje i na moguću prisutnost kemijskih i mikrobnih onečišćenja (Bolf, 2020).

Mutnoća uzoraka hidrolata je izmjerena pomoću turbidimetra kako je opisano u poglavlju Materijali i metode te je izražena u NTU jedinicama. Za kalibraciju turbidimetra koristili su se standardi koji imaju poznatu vrijednost mutnoće. Izmjerene vrijednosti mutnoće za uzorke hidrolata prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Mutnoće uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja izmjerene pomoću turbidimetra

Uzorak hidrolata smilja	Mutnoća (NTU)
Dalmatinski hidrolat 1	1,66
Dalmatinski hidrolat 2	2,89
Dalmatinski hidrolat 3	1,49
Kontinentalni hidrolat 1	5,20
Kontinentalni hidrolat 2	1,18
Kontinentalni hidrolat 3	1,69

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da uzorak kontinentalnog hidrolata 1 ima najveću količinu suspendiranih čestica s obzirom na izmjerenu vrijednost mutnoće (5,20 NTU). Uzorak kontinentalnog hidrolata 2 ima najmanju mutnoću (1,18 NTU) pa time sadrži i najmanju količinu suspendiranih čestica. S obzirom na izmjerene vrijednosti nisu primijećene

razlike u mutnoći uzoraka hidrolata ovisno o porijeklu (dalmatinski odnosno kontinentalni hidrolat smilja) odnosno izmjerene vrijednosti razlikuju se među uzorcima neovisno o geografskom porijeklu biljke iz koje je hidrolat dobiven. Prisutne razlike mogle bi biti posljedica razlika u postupku dobivanja i čuvanja hidrolata. Vrijednosti mutnoće za hidrolat smilja nisu dostupne u literaturi, ali prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije vrijednost mutnoće pitke vode bi trebala iznositi < 5 NTU, a u idealnom slučaju < 1 NTU (www.who.int). Uzorci hidrolata smilja su, uzevši u obzir te vrijednosti, prikladne kakvoće izuzev uzorka kontinentalnog hidrolata 1.

#### 4.6. Određivanje sadržaja eteričnog ulja

Prinos eteričnog ulja, između ostalog, ovisi o stadiju rasta biljke, geografskoj lokaciji, klimatskim uvjetima i načinu skupljanja biljnog materijala. S obzirom da je količina eteričnog ulja u cvjetnim glavicama smilja manja od 0,05%, i u uzorcima hidrolata se očekuje mali sadržaj eteričnog ulja.

Prinos eteričnog ulja je najveći prije cvjetanja (0,21%) i u fazi kasnih ljetnih izbojaka (0,35%), a najmanji u fazi formiranja cvata (0,06%) (Blažeković i sur., 1995). Blažeković i sur. su pokazali kako prinos eteričnog ulja varira i ovisno o geografskoj lokaciji pa je tako prinos bio najveći za uzorak smilja prikupljen u Ljubuškom, a najmanji za uzorak smilja prikupljen u Benkovcu. Biljke uzgojene u kontinentalnim područjima u fazi cvjetanja sadrže 0,15% ulja, a nakon cvjetanja 0,13% eteričnog ulja (Rajić i sur., 2015). Biljni materijal za dobivanje eteričnog ulja i hidrolata se bere u vrijeme cvatnje kada je otvoreno 50 % cvjetova u nasadu jer je tada količina eteričnog ulja najveća (Pohajda i sur., 2015; Rajić i sur., 2015).

Sadržaj eteričnog ulja u uzorcima hidrolata određen je vodenom destilacijom pomoću aparature po Ungeru. Postotni sadržaj eteričnog ulja određen je volumetrijski prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ (eterično ulje)} = (V(\text{eterično ulje}) \text{ (mL)} / V(\text{uzorak}) \text{ (mL)}) \times 100$$

pri čemu su volumen eteričnog ulja i volumen uzorka određeni kako je opisano u poglavlju Materijali i metode. Sadržaji eteričnog ulja u uzorcima hidrolata su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Sadržaji eteričnog ulja u uzorcima dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja određeni vodenom destilacijom

<b>Uzorak hidrolata smilja</b>	<b>Sadržaj eteričnog ulja (%)</b>
Dalmatinski hidrolat 1	< 0,14
Dalmatinski hidrolat 2	< 0,11
Dalmatinski hidrolat 3	0,07
Kontinentalni hidrolat 1	< 0,08
Kontinentalni hidrolat 2	< 0,08
Kontinentalni hidrolat 3	< 0,12

Sadržaj eteričnog ulja u uzorcima dalmatinskih hidrolata iznosi između 0,07 i < 0,14%. Srednja vrijednost sadržaja eteričnog ulja u uzorcima dalmatinskih hidrolata iznosi 0,107%. Slično kao i u uzorcima dalmatinskih hidrolata, sadržaj eteričnog ulja u uzorcima kontinentalnih hidrolata se kreće između < 0,08 i < 0,12%, ali je srednja vrijednost sadržaja eteričnih ulja manja i iznosi 0,093%. Iz izmjerenih sadržaja eteričnog ulja hidrolata smilja može se zaključiti da su razlike u sadržaju eteričnog ulja koje postoje između uzoraka, porijeklom iz Dalmacije i s kontinenta, ali i uzoraka pojedinačno posljedica različitih uvjeta kojima je biljka bila izložena (klima, tlo, osunčanost), razlika u načinu prikupljanja biljnog materijala te razlika u stadiju razvoja biljke za vrijeme prikupljanja.

## 5. ZAKLJUČCI



U šest uzoraka dalmatinskih i kontinentalnih hidrolata smilja izmjerene vrijednosti za relativnu gustoću su iznosile između 0,9850 i 1,0750, za indeks refrakcije su bile između 1,3328 i 1,3330, vrijednosti kiselinskog broja su bile u rasponu između 0,540 i 0,589 mg KOH/g, a vrijednosti za mutnoću su bile između 1,18 i 5,20 NTU. Dobivene vrijednosti uspoređene su s dostupnim podacima za ispitivanje čistoće i kvalitete eteričnih ulja. Vrijednosti za relativnu gustoću uzoraka hidrolata su veće u odnosu na relativnu gustoću eteričnog ulja smilja (0,875 – 0,925) što ukazuje na činjenicu da je u sastavu hidrolata dominantan sastojak voda. Izmjerene vrijednosti indeksa refrakcije manje su u odnosu na vrijednosti indeksa refrakcije eteričnog ulja smilja (1,470 – 1,490), a jednake su ili se vrlo malo razlikuju od indeksa refrakcije vode (1,3330). Razlike u mutnoći uzoraka su vjerojatno posljedica razlike u dobivanju i čuvanju hidrolata.

pH-vrijednosti uzoraka hidrolata smilja su bile između 3,43 i 4,66 što je u skladu s dostupnim literaturnim pH-vrijednostima za hidrolate (3,5 – 3,8) uz iznimku uzorka kontinentalnog hidrolata 2 (pH = 4,66).

Sadržaj eteričnog ulja u uzorcima je velik (od 0,07% do < 0,14%) s obzirom na činjenicu da je sadržaj hlapljivih organskih spojeva iz eteričnog ulja u hidrolatu obično manji od 0,10%.

Provedena ispitivanja nisu pokazala značajnije razlike u izmjerenim parametrima između dalmatinskog i kontinentalnog hidrolata smilja iz čega se može zaključiti da nema bitne razlike u čistoći i kvaliteti hidrolata dalmatinskog i kontinentalnog smilja. Uzimajući u obzir sve širu primjenu hidrolata u medicinske i kozmetičke svrhe, postoji potreba za definiranjem i standardiziranjem ispitivanja kojima će se utvrđivati kvaliteta i čistoća hidrolata.

## **6. LITERATURA**

A guide to pH measurement - the theory and practice of laboratory pH applications, 2013., <https://www.mt.com>, pristupljeno 29.04.2021.

Acheampong A, Borquaye LS, Osafo Acquaaah S, Osei-Owusu J, Tuani GK. Antimicrobial Activities of Some Leaves and Fruit Peels Hydrosols. *Int j chem biomol sci*, 2015, 1(3), 158 – 162.

Aćimović MG, Tešević VV, Smiljanić KT, Cvetković MT, Stanković JM, Kiprovska BM, Sikora VS. Hydrolates – by-products of essential oil distillation: chemical composition, biological activity and potential uses. *Adv Technol*, 2020, 9(2), 54 – 70.

Appendino G, Ottino M, Marquez N, Bianchi F, Giana A, Ballero M, Sterner O, Fiebich BL, Munoz E. Arzanol, an Anti-inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol  $\alpha$ -Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *J Nat Prod*, 2007, 70, 608 – 612.

Bisset NG, Wichtl M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis, 2th Edition. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, 2001, str. 257 – 260.

Blažeković N, Petričić J, Stanić G, Maleš Ž. Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along Adriatic coast. *Acta Pharm*, 1995, 45, 517 – 522.

Bolf N. Mjerenje mutnoće – turbidimetrija i nefelometrija. *Kem. Ind.*, 2020, 69, 711 – 714.

Catty S. Hydrosols: The Next Aromatherapy. Rochester, Healing Arts Press, 2001, str. 81.

Conti B, Canale A, Bertoli A, Gozzini F, Pistelli L. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*, 2010, 107, 1455 – 1461.

Council of Europe. European pharmacopeia (Ph. Eur.) 8th edition, 2013, str. 21 – 26, 69, 155.

Ćavar Zeljković S, Šolić ME, Maksimović M. Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. *Nat Prod Res*, 2015, 29(19), 1874 – 1877.

Fraternale D, Flamini G, Ascricchi R. In Vitro Anticollagenase and Antielastase Activities of Essential Oil of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don. *J Med Food*, 2019, 22(10), 1041 – 1046.

- Galbany-Casals M, Blanco-Moreno JM, Garcia-Jacas N, Breitwieser I, Smissen RD. Genetic variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin. *Plant Biol*, 2011, 13, 678 – 687.
- Galbany-Casals M, Saez L, Benedi C. A taxonomic revision of *Helichrysum* sect. *Stoechadina* (Asteraceae, Gnaphalieae). *Can J Bot*, 2006, 84, 1203 – 1232.
- Gismondi A, Di Marco G, Canini A. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil: Composition and potential antineoplastic effect. *S Afr J Bot*, 2020, 133, 222 – 226.
- Guinoiseau E, Lorenzi V, Luciani A, Muselli A, Costa J, Casanova J, Berti L. Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. U: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Méndez Vilas A, urednik, Badajoz, Formatex Research Center, 2013, str. 1073 – 1080.
- Hruza LL, Pentland AP. Mechanisms of UV-Induced Inflammation. *J Invest Dermatol*, 1993, 100(1), 35 – 41.
- Kovač-Bešović E. Metode u farmakognoziji. Sarajevo, Sarajevo Publishing, 2001, str. 126 – 133.
- Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing – Tehnička knjiga, 2005, str. 219 – 221, 224 – 226.
- Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pages JM, Amaral L, Bolla JM. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5), 2209 – 2211.
- Maffei Facino R, Carini M, Franzoi L, Pirola O, Bosisio E. Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae). *Pharmacol Res*, 1990, 22(6), 709 – 721.
- Maksimovic S, Tadic V, Skala D, Zizovic I. Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry*, 2017, 138, 9 – 28.
- Mancini E, De Martino L, Marandino A, Scognamiglio MR, De Feo V. Chemical Composition and Possible in Vitro Phytotoxic Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. *Molecules*, 2011, 16, 7725 – 7735.

Marković S. Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka: temelji fitoaromaterapije, 2. izdanje. Zagreb, Centar Cedrus, 2010, str. 161 – 162.

Mastelic J, Politeo O, Jerkovic I, Radosevic N. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem Nat Compd*, 2005, 41(1), 35 – 40.

Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, Perrini R, Sabetta W, Blanco A, Lorusso E, Avato P. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Ind Crop Prod*, 2010, 32, 639 – 649.

Nostro A, Cannatelli MA, Musolino AD, Procopio F, Alonzo V. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*, 2002, 35, 181 – 184.

Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol*, 2000, 30, 379 – 384.

Opinion on fragrance allergens in cosmetic products, 2011, Bruxelles, Scientific Committee on Consumer Safety, broj 1459 (SCCS/1459/11)

Organic *Helichrysum* Essential Oil (*Helichrysum italicum*), 2007., <https://www.nhrorganicoils.com>, pristupljeno 09.05.2021.

Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol*, 2012, 4(3), 253 – 258.

Peršić M, Leko K, Dudaš S. Kriteriji kvalitete biljnog materijala i eteričnog ulja primorskog smilja (*Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don). *Zbornik Veleučilišta u Rijeci*, 2019, 7(1), 425 – 431.

Pohajda I, Dragun G, Puharić Visković L. Smilje. Zagreb, Savjetodavna služba, 2015, str. 1 – 15.

Politi M, Menghini L, Conti B, Bedini S, Farina P, Cioni PL, Braca A, De Leo M. Reconsidering Hydrosols as Main Products of Aromatic Plants Manufactory: The Lavandin (*Lavandula × intermedia*) Case Study in Tuscany. *Molecules*, 2020, 25, 2225.

Pravilnik o proglašavanju divljih svojiti zaštićenim i strogo zaštićenim, 2009, Zagreb, Narodne novine, broj 99 (NN/99/09)

Pravilnik o sakupljanju zaštićenih samoniklih biljaka u svrhu prerade, trgovine i drugog prometa, 2008, Zagreb, Narodne novine, broj 154 (NN/154/08)

Rajić M, Bilić M, Aladić K, Šimunović D, Pavković T, Jokić S. Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja. *Glasnik zaštite bilja*, 2015, 38(6), 16 – 26.

Refractometers – Measuring Principle, 2017., <https://www.gpsil.co.uk>, pristupljeno 25.04.2021.

Rigano D, Formisano C, Senatore F, Piacente S, Pagano E, Capasso R, Borrelli F, Izzo AA. Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150, 901 – 906.

Rodrigues AM, Silva L, Falé PLV, Serralheiro ML, Ascensão L. Glandular Trichomes and Biological Activities in *Helichrysum italicum* and *H.stoechas*, Two *Asteraceae* Species Growing Wild in Portugal. *Microsc. Microanal.*, 2015, 21(5), 91 – 92.

Rosa A, Pollastro F, Atzeri A, Appendino G, Melis MP, Deiana M, Incani A, Loru D, Dessì MA. Protective role of arzanol against lipid peroxidation in biological systems. *Chem Phys Lipids*, 2011, 164, 24 – 32.

Sala A, Recio MC, Giner RM, Mañez S, Tournier H, Schinella G, Rios JL. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54, 365 – 371.

Sala A, Recio MC, Schinella GR, Mañez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M, Rios JL. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur J Pharmacol*, 2003a, 461, 53 – 61.

Sala A, Recio MC, Schinella GR, Mañez S, Giner RM, Rios JL. A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from *Helichrysum italicum*. *Eur J Pharmacol*, 2003b, 460, 219 – 226.

Salehi B, Upadhyay S, Erdogan Orhan I, Kumar Jugran A, Jayaweera SLD, Dias DA, Sharopov F, Taheri Y, Martins N, Baghalpour N, Cho WC, Sharifi-Rad J. Therapeutic Potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*, 2019, 9, 738.

Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich de Buschiazso P, Ríos JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci.*, 2002, 70, 1023 – 1033.

Separation Theory, 2021., <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 04.05.2021.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Plinsko-tekućinska kromatografija. U: Osnove analitičke kemije. Bešenić D, urednica, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 674 – 684.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Potenciometrijske metode. U: Osnove analitičke kemije. Bešenić D, urednica, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 381, 388.

Tisserand R, Young R. Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals. Edinburgh, Churchill Livingstone/Elsevier, 2014, str. 309 – 310.

Viegas DA, Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151, 54 – 65.

Water quality and health - review of turbidity: Information for regulators and water suppliers, 2017., <https://www.who.int>, pristupljeno 30.05.2021.

Winterhalter D, Sliepčević A, Kuntarić A, Kempni K. Vježbe iz fizike za studente medicinskog, veterinarskog i farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Zagreb, Školska knjiga, 1990, str. 31 – 32, 102 – 105.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**



Smilje (*Helichrysum italicum*) (Roth) G. Don je mediteranska biljka koja se zbog svojih ljekovitih svojstava koristi u farmaceutske i kozmetičke svrhe. U ovome radu uspoređeni su dalmatinski i kontinentalni hidrolati smilja (n=6) na temelju mjerenja različitih parametara: relativne gustoće koja je bila između 0,9850 i 1,0750, indeksa refrakcije koji je iznosio između 1,3328 i 1,3330, kiselinskog broja koji je bio u rasponu između 0,540 i 0,589 mg KOH/g, pH koji je bio između 3,43 i 4,66, mutnoće koja je bila između 1,18 i 5,20 NTU i sadržaja eteričnog ulja koji je iznosio između 0,07% i < 0,14%. Budući da nema referentnih vrijednosti ovih parametara za hidrolate, izmjerene vrijednosti su uspoređene s dostupnim podacima za eterično ulje smilja. Provedena ispitivanja nisu pokazala značajnije razlike u izmjerenim fizikalnim i kemijskim vrijednostima između dalmatinskog i kontinentalnog hidrolata smilja. S obzirom na sve veću primjenu hidrolata u kozmetičke i farmaceutske svrhe potrebno je uvesti i standardizirati metode za utvrđivanje njihove kvalitete i čistoće.

Immortelle (*Helichrysum italicum*) (Roth) G. Don is a Mediterranean plant that is used for pharmaceutical and cosmetic purposes due to its medicinal properties. In this thesis, Dalmatian and continental immortelle hydrolates (n=6) were compared based on measurements of different parameters: relative density which was between 0.9850 and 1.0750, refractive index which was between 1.3328 and 1.3330, acid number which was between 0.540 and 0.589 mg KOH/g, pH which was between 3.43 and 4.66, turbidity which was between 1.18 and 5.20 NTU and essential oil content which was between 0.07% and < 0.14%. Since there are no reference values of these parameters for hydrolates, the measured values were compared with the available data for immortelle essential oil. The obtained results did not show significant differences in the measured physical and chemical values between Dalmatian and continental immortelle hydrolates. Considering increasing use of immortelle hydrolates for pharmaceutical and cosmetic purposes, it is necessary to introduce and standardize methods for determining their quality and purity.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitičku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska  
Hrvatski zavod za javno zdravstvo  
Odjel za dodatke prehrani i biološki aktivne tvari  
Rockefellerova 7, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Usporedba kvalitete i čistoće dalmatinskog i kontinentalnog hidrolata smilja

Lucija Bilandžija

#### SAŽETAK

Smilje (*Helichrysum italicum*) (Roth) G. Don je mediteranska biljka koja se zbog svojih ljekovitih svojstava koristi u farmaceutske i kozmetičke svrhe. U ovome radu uspoređeni su dalmatinski i kontinentalni hidrolati smilja ( $n=6$ ) na temelju mjerenja različitih parametara: relativne gustoće koja je bila između 0,9850 i 1,0750, indeksa refrakcije koji je iznosio između 1,3328 i 1,3330, kiselinskog broja koji je bio u rasponu između 0,540 i 0,589 mg KOH/g, pH koji je bio između 3,43 i 4,66, mutnoće koja je bila između 1,18 i 5,20 NTU i sadržaja eteričnog ulja koji je iznosio između 0,07% i < 0,14%. Budući da nema referentnih vrijednosti ovih parametara za hidrolate, izmjerene vrijednosti su uspoređene s dostupnim podacima za eterično ulje smilja. Provedena ispitivanja nisu pokazala značajnije razlike u izmjerenim fizikalnim i kemijskim vrijednostima između dalmatinskog i kontinentalnog hidrolata smilja. S obzirom na sve veću primjenu hidrolata u kozmetičke i farmaceutske svrhe potrebno je uvesti i standardizirati metode za utvrđivanje njihove kvalitete i čistoće.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 53 stranice, 7 grafičkih prikaza, 7 tablica i 53 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: sredozemno smilje, hidrolati, fizikalne i kemijske konstante, eterično ulje smilja

Mentor: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Lea Pollak**, *voditeljica Odjela za dodatke prehrani i biološki aktivne tvari Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Lea Pollak**, *voditeljica Odjela za dodatke prehrani i biološki aktivne tvari Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.*  
**Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Analytical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia  
Croatian National Institute of Public Health  
Department for Food Supplements and Biologically  
Active Substances  
Rockefellerova 7, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Comparison of quality and purity of Dalmatian and continental immortelle hydrolate

Lucija Bilandžija

#### SUMMARY

Immortelle (*Helichrysum italicum*) (Roth) G. Don is a Mediterranean plant that is used for pharmaceutical and cosmetic purposes due to its medicinal properties. In this thesis, Dalmatian and continental immortelle hydrolates (n=6) were compared based on measurements of different parameters: relative density which was between 0.9850 and 1.0750, refractive index which was between 1.3328 and 1.3330, acid number which was between 0.540 and 0.589 mg KOH/g, pH which was between 3.43 and 4.66, turbidity which was between 1.18 and 5.20 NTU and essential oil content which was between 0.07% and < 0.14%. Since there are no reference values of these parameters for hydrolates, the measured values were compared with the available data for immortelle essential oil. The obtained results did not show significant differences in the measured physical and chemical values between Dalmatian and continental immortelle hydrolates. Considering increasing use of immortelle hydrolates for pharmaceutical and cosmetic purposes, it is necessary to introduce and standardize methods for determining their quality and purity.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 53 pages, 7 figures, 7 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Immortelle, hydrolats, physical and chemical parameters, immortelle essential oil

Mentor: **Suzana Inić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lea Pollak, Ph.D.** Head of Department for Food Supplements and Biologically Active Substances, Croatian National Institute of Public Health

Reviewers: **Suzana Inić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lea Pollak, Ph.D.** Head of Department for Food Supplements and Biologically Active Substances, Croatian National Institute of Public Health  
**Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.

