

# Procjena čistoće i kvalitete dalmatinskog i kontinentalnog macerata smilja

---

**Bilandžija, Barbara**

**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:163:746735>

*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](#)



**Barbara Bilandžija**

**Procjena čistoće i kvalitete dalmatinskog i  
kontinentalnog macerata 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 pruženoj pomoći, strpljenju i uloženom vremenu za izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i dr. sc. Lei Pollak na savjetima i susretljivosti te 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 pružnoj pomoći oko eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno svojoj sestri na pomoći, podršci i razumijevanju tijekom studiranja.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Klasifikacija i rasprostranjenost <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don.....	2
1.2. Morfološke značajke <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don.....	3
1.3. Tradicionalna primjena <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don.....	4
1.4. Farmakološko djelovanje <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don.....	4
1.4.1. Protuupalno djelovanje.....	5
1.4.2. Antioksidativno djelovanje .....	7
1.4.3. Antimikrobno djelovanje.....	9
1.4.4. Insekticidno i repelentno djelovanje .....	11
1.4.5. Antidiijabetički učinak .....	11
1.4.6. Antikolagenazna i antielastazna aktivnost .....	12
1.4.7. Fotoprotektivno djelovanje .....	13
1.4.8. Antispazmodično djelovanje .....	13
1.4.9. Antineoplastično djelovanje .....	14
1.5. Eterična ulja - svojstva i kemijski sastav .....	15
1.5.1. Eterično ulje <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don.....	16
1.6. Metode dobivanja eteričnih ulja.....	18
1.6.1. Destilacija.....	19
1.6.2. Ekstrakcija.....	20
1.6.3. Tiještenje .....	21
1.7. Metode izolacije sastavnica iz <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don.....	21
1.8. Macerat i postupak maceracije .....	21
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	233
3. MATERIJALI I METODE .....	25
3.1. Materijali .....	26
3.1.1. Kemikalije .....	26
3.1.2. Laboratorijski pribor .....	26
3.1.3. Instrumenti .....	27
3.1.4. Uzorci .....	27
3.2. Metode.....	27
3.2.1. Kiselinski broj .....	27
3.2.1.1. Postupak mjerenja .....	28

3.2.2. Relativna gustoća (specifična težina).....	28
3.2.2.1. Postupak mjerenja .....	29
3.2.3. Indeks refrakcije .....	30
3.2.3.1. Postupak mjerenja .....	32
3.2.4. pH-vrijednost.....	33
3.2.4.1. Postupak mjerenja .....	35
3.2.5. Sadržaj eteričnog ulja .....	36
3.2.5.1. Postupak mjerenja .....	37
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	39
4.1. Određivanje kiselnog broja.....	40
4.2. Određivanje relativne gustoće .....	41
4.3. Određivanje indeksa refrakcije.....	42
4.4. Određivanje pH vrijednosti .....	44
4.5. Određivanje sadržaja eteričnog ulja .....	45
5. ZAKLJUČCI .....	47
6. LITERATURA.....	49
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	55
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

## **1. UVOD**

## 1.1. Klasifikacija i rasprostranjenost *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

Sredozemno smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don = *Helichrysum angustifolium* (Lam.) DC) biljka je koja pripada rodu *Helichrysum* (Miller) iz porodice glavočika (*Asteraceae*).

Porodica glavočika (*Asteraceae*) obuhvaća preko 800 rodova i preko 20 000 biljnih vrsta koje su se prilagodile životu na različitim staništima, ali ipak najbolje uspijevaju na mediteranskom području (Marković, 2010). Jedan od rodova ove porodice je i rod *Helichrysum* (Miller) koji obuhvaća preko 600 vrsta od kojih 25 vrsta raste na mediteranskom području. Osim na Mediteranu, vrste ovog roda rasprostranjene su i u drugim dijelovima svijeta i to u tri zone. Prva zona obuhvaća Mediteran, Srednju i Južnu Europu, Zapadnu i Centralnu Aziju, druga obuhvaća Sjeveroistočnu i Istočnu tropsku Afriku, Južnu Afriku i Madagaskar, a treća Istočnu i Jugoistočnu Australiju i Novi Zeland. Sve vrste roda *Helichrysum* prilagođene su životu na suhim staništima (kserofiti) te na velikome rasponu nadmorskih visina od razine mora do 1770 m iznad razine mora (Rajić i sur., 2015; Perrini i sur., 2009).

Vrsta *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don samoniklo raste na suhim, kamenitim i pjeskovitim staništima mediteranskog područja (Španjolska, Francuska, Italija, Hrvatska, Grčka, Cipar, Alžir, Maroko), a obuhvaća šest podvrsta koje nastanjuju različite dijelove Mediterana:

1. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (mediteransko područje)
2. *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman (Baleari, Sardinija, Korzika, Kreta i Cipar)
3. *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* Franco (Portugal, Španjolska, Francuska, Italija)
4. *Helichrysum italicum* subsp. *pseudolitoreum* (Fiori) Bacch. i sur. (Argentario, Gargano and Conero u Italiji)
5. *Helichrysum italicum* subsp. *serotinum* (Boiss.) P.Fourn (Iberski poluotok)
6. *Helichrysum italicum* subsp. *siculum* (Jord. & Fourr.) Galbany i sur. (Sicilija) (Viegas i sur., 2014).

U Hrvatskoj je uz sredozemno smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) prisutno i pješčano smilje (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) koje je prirodno rasprostranjeno u Srednjoj, Južnoj i Istočnoj Europi (Pohajda i sur., 2015; Bisset i Wichtl, 2001).

## 1.2. Morfološke značajke *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

Sredozemno smilje (*H. italicum* (Roth) G. Don) je višegodišnja biljka odnosno biljka trajnica, jakog aromatičnog mirisa, u obliku polugrma visine do 60 cm. Stabljika smilja je razgranata i prekrivena sitnim dlačicama, a na njoj se nalaze izmjenično poredani listovi. Listovi su uski, šiljasti i linearni, dugi do 5 cm, na rubu uvijeni, s lica zeleni, a s naličja sivo-zeleni. Kao prilagodba na suha staništa s velikim brojem sunčanih sati, listovi smilja prekriveni su debelom kutikulom i gustim dlačicama na naličju koje imaju ulogu smanjenja transpiracije. Smilje je ipak najpoznatije po svojim zlatnožutim cvjetovima prema kojima je i dobilo botanički naziv (od grčkih riječi *helios* – sunce i *chrysos* – zlatan) (Pohajda i sur., 2015; Rajić i sur., 2015; Gelenčir Jo i Gelenčir Ja, 1991).

Cvjetovi smilja gusto su zbijeni u cvatove kojima završava svaka stabljika. Cvat je glavica koja je s donje strane obavijena s većim brojem svijetlo žutih ovojnih (pricvjetnih) listova, a cvjetovi su cjevasti (*flos tubulatus*). Cjevasti cvjetovi imaju pravilno dvostruko ocvijeće građeno od slabo razvijene čaške i peterolatičanog vjenčića čije su latice srasle u kratku cijev zbog čega je cvijet i dobio naziv cjevasti (slika 1). Cvjetovi cvatu od svibnja do kraja srpnja, a i nakon cvatnje i sušenja zadržavaju svoju boju zbog čega je smilje dobilo i naziv „besmrtno cvijeće“. Plod je kao i kod drugih vrsta porodice *Asteraceae* roška (achenium) koja je glatka ili hrapava, sitna, izdužena i gotovo crne boje (Maleš, 2017; Pohajda i sur., 2015; Rajić i sur., 2015).



Slika 1. Polugrm sredozemnog smilja (preuzeto s <https://wyndley.com>)



### 1.3. Tradicionalna primjena *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don se zbog svojih korisnih svojstava već godinama primjenjuje u tradicionalnoj medicini mediteranskih zemalja. Uglavnom se od cvjetova i listova, a rjeđe i stabljike smilja izrađuju infuzi, dekokti, prašci i eterično ulje, koji se koriste za unutarnju ili vanjsku primjenu, za liječenje različitih poremećaja, a najčešće su to poremećaji probavnog sustava, dišnog sustava i kože (Viegas i sur., 2014). Tako se smilje tradicionalno primjenjuje kod jetrenih tegoba, tegoba sa žuči i žučnim putevima budući da djeluje kao koleretik (potiče jetru na pojačano stvaranje žuči) i kolagog (potiče pražnjenje žučnog mjehura u dvanaesnik). Primjenjuje se i kod probavnih poremećaja (smetnje sekrecije želučanih i crijevnih žlijezda, crijevne infekcije parazitima), kod kašlja i prehlade, faringitisa, laringitisa i bronhitisa, astme i alergija, te kod nekih kožnih poremećaja poput alopecije, kožnih upala, dermatomikoza, psorijaze i za zacjeljivanja rana, a zbog svojeg antikoagulantnog djelovanja za koje su zaslužni spojevi itolidioni ( $\beta$ -diketoni) primjenjuje se i kod hematoma. Osim toga, smilje se upotrebljava kod proširenih vena, flebitisa, glavobolje, zubobolje, bolova u trbuhu, nesanice i herpesa. Međutim, upotreba *H. italicum* za liječenje većine ovih stanja nije još potpuno znanstveno ispitana, a to se posebno odnosi na primjenu u analgetske svrhe (glavobolja, zubobolja, bol u trbuhu) te primjenu kod nesanice, probavnih poremećaja i alopecije. Problem je i to što se ispitivanja farmakološkog djelovanja uglavnom provode na organskim ekstraktima *H. italicum* u različitim otapalima, dok se u tradicionalnoj primjeni koriste uglavnom vodeni ekstrakti odnosno infuzi i dekokti, a vrsta i koncentracija sastavnica te posljedično njihov učinak ovise o metodi pripreme ekstrakata (Viegas i sur., 2014; Marković, 2010).

### 1.4. Farmakološko djelovanje *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

Zahvaljujući velikom broju različitih skupina spojeva koje sadržava, a od kojih su najčešći terpeni i fenolne komponente, vrsta *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ima širok spektar bioloških aktivnosti (Maksimović i sur., 2017) i široku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji te u proizvodnji parfema (Ninčević i sur., 2019).

### 1.4.1. Protuupalno djelovanje

Upala, posebno kronična, je proces povezan s nastankom mnogih bolesti (autoimune bolesti, rak, astma, ateroskleroza). Najvažniji medijatori koji posreduju upalu su prostaglandini i leukotrieni koji nastaju metabolizmom arahidonske kiseline uz enzime ciklooksigenazu-1 i 2 te 5-lipoksigenazu. Međutim osim posredovanja u upali, ovi medijatori imaju i fiziološke uloge u gastrointestinalnom sustavu, bubrezima, krvnim žilama, mozgu, uterusu. Upravo zbog toga, nesteroidni protuupalni lijekovi (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) koji inhibiraju njihovu sintezu izazivaju brojne nuspojave zbog čega se javlja potreba za pronalaskom novih lijekova koji će selektivnije inhibirati sintezu samo određenih prostaglandina i leukotriena (Bauer i sur., 2011).

Protuupalno djelovanje ispitivano je za metanolni ekstrakt *H. italicum* i za različite frakcije dobivene iz metanolnog ekstrakta uparavanjem ekstrakta, otapanjem suhog ostatka u vodi i ekstrakcijom s n-heksanom, diklormetanom, etil-acetatom i n-butanolom. Nakon analiza frakcija tankoslojnom kromatografijom (*thin layer chromatography*, TLC) i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz DAD detektor (*high-performance liquid chromatography with a diode-array detector*, HPLC-DAD), utvrđeno je kako je n-heksan frakcija sadržavala lipidne komponente i sitosterol, dok su ostale tri polarnije frakcije sadržavale uglavnom flavonoide i derivate acetofenona. Ispitivanje je provedeno na različitim modelima upale inducirane kod miševa. Pretpostavljeno je da je protuupalno djelovanje ekstrakata posljedica antioksidativnog djelovanja, inhibicije pro-inflamatornih citokina i učinaka sličnih kortikosteroidima (Sala i sur., 2002).

Spojevi iz *H. italicum* koji su pokazali protuupalno djelovanje su acetofenoni, flavonoidi i floriglucinol  $\alpha$ -piron arzanol (Viegas i sur., 2014).

Acetofenoni su dobiveni iz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc i BuOH frakcija metanolnog ekstrakta *H. italicum*. Njihovo protuupalno djelovanje se temelji na inhibiciji metabolizma arahidonske kiseline preko inhibicije enzima 5-lipoksigenaze (5-LOX) čime se smanjuje produkcija leukotriena B<sub>4</sub> (u neutrofilima štakora), te na inhibiciji ciklooksigenaze-1 (COX-1) čime se smanjuje produkcija prostaglandina E<sub>2</sub> (u humanim trombocitima). Prvo djelovanje pokazali su 4-hidroksi-3-(3-metil-2-butenil)acetofenon i 4-hidroksi-3-(2-hidroksi-3-izopentenil)acetofenon, dok je drugo djelovanje pokazao samo 4-hidroksi-3-(3-metil-2-butenil)acetofenon. Također, 4-hidroksi-3-(3-metil-2-butenil)acetofenon pokazao je sličan analgetski učinak u istoj dozi kao i aspirin. Budući da pokazuje dvojno, protuupalno i analgetsko

djelovanje, 4-hidroksi-3-(3-metil-2-butenil)acetofenon bi mogao poslužiti kao spoj uzor za nove antiinflamatorne lijekove i analgetike (Sala i sur., 2003b).

Flavonoidi gnafalin (metoksiflavon), pinocembrin (flavanon) i tilirozid (flavonol (kemferol) acil-glukozid) izolirani su iz metanolnog ekstrakta *H. italicum*. Gnafalin i pinocembrin smanjuju proizvodnju leukotriena B4 inhibicijom 5-lipooksigenaze, za razliku od tilirozida koji povećava produkciju leukotriena. Pretpostavlja se da je uzrok tome to što tilirozid inhibira peroksidaciju masnih kiselina pa tako povećava razinu arahidonske kiseline iz koje nastaju leukotrieni (molekule uključene u upalu, astmu i alergije kao i u druge fiziološke i patološke procese). U modelima upale kod miševa, sva su tri flavonoida pokazala učinak smanjenja edema. Takav učinak je, pretpostavlja se, između ostalog posljedica inhibicije oslobađanja histamina i serotonina iz mastocita. Jedino je u modelu kronične upale, koju uglavnom inhibiraju kortikosteroidi, samo tilirozid pokazao učinkovitost u smanjenju edema (Sala i sur., 2003a).

Arzanol, prenilirani heterodimerni floriglucinol  $\alpha$ -piron, ipak je najvažnija protuupalna komponenta izolirana iz *H. italicum*. Izoliran je iz etil-acetatne frakcije koja je dobivena iz acetonskog ekstrakta *H. italicum*. Ovaj spoj snažno inhibira nuklearni faktor kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) koji je ključan faktor koji regulira transkripciju gena uključenih u upalni odgovor i koji potiče proizvodnju citokina, kemokina, adhezijskih molekula i proteina akutne faze koji su uključeni u brojna upalna stanja. Kao posljedicu inhibicije NF- $\kappa$ B, arzanol je pokazao inhibitorno djelovanje na proizvodnju interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina-6 (IL-6), interleukina-8 (IL-8), faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Osim toga, arzanol djeluje i kao inhibitor enzima 5-lipooksigenaze (5-LOX), ciklooksigenaze-1 (COX-1) i mikrosomalne prostaglandin E<sub>2</sub> sintaze (mPGES). Budući da su COX-1/2 i 5-LOX zapravo dioksigenaze sa željezom u aktivnom mjestu koje se tijekom katalize oksidiraju i reduciraju, pretpostavlja se da je inhibicija ovih enzima posljedica antioksidativnog djelovanja arzanola, koje mu omogućava prekid redoks ciklusa ili održavanje željeza u inaktivnom, reduciranom stanju. Kako ne interferira s ciklooksigenazom-2 (COX-2) već samo s mPGES, arzanol inhibira stvaranje samo PGE<sub>2</sub>, a ne i drugih COX-2 prostanoida. Uz protuupalno, arzanol također posjeduje i anti-HIV-1 djelovanje (Bauer i sur., 2011; Appendino i sur., 2007).

## 1.4.2. Antioksidativno djelovanje

Superoksidni anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) su reaktivne kisikove vrste (*reactive oxygen species*, ROS) koje nastaju nepotpunom redukcijom molekuskog kisika. Poznato je da oni uzrokuju lomove molekule DNA, mijenjaju aktivnost enzima i dovode do stanične smrti. Također, jedan od procesa u kojem sudjeluju slobodni radikali je i lipidna peroksidacija. Lipidnom peroksidacijom dolazi do razgradnje masnih kiselina, koje su sastavni dio bioloških membrana, i posljedično tome do oštećenja membrana stanica te do oštećenja tkiva (Rosa i sur., 2007; Schinella i sur., 2002; Hruza i Pentland, 1993).

Antioksidativno djelovanje ispitivano je za metanolni ekstrakt *H. italicum* i za različite frakcije dobivene iz metanolnog ekstrakta na jednak način kao i kod ispitivanja protuupalnog djelovanja. Svi ekstrakti osim heksanskog pokazali su sposobnost hvatanja stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnog radikala, samo etil-acetatni i butanolni ekstrakt su pokazali sposobnost hvatanja superoksidnog radikala, dok niti jedan ekstrakt nema sposobnost hvatanja hidroksilnog radikala. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala važna je zato jer su slobodni radikali uključeni u aktivaciju nuklearnog faktora  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) i p38-mitogen-aktivirane protein kinaze koji potiču transkripciju gena za pro-inflamatorne enzime (poput ciklooksigenaze-2 i sintaze dušikovog oksida) i citokine (poput interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina 2 (IL-2) i faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )). Na temelju ovoga može se objasniti povezanost protuupalnog i antioksidativnog djelovanja ekstrakata *H. italicum*. Također, zbog sposobnosti hvatanja slobodnih radikala ekstrakti su inhibirali inicijaciju enzimske lipidne peroksidacije (Sala i sur., 2002).

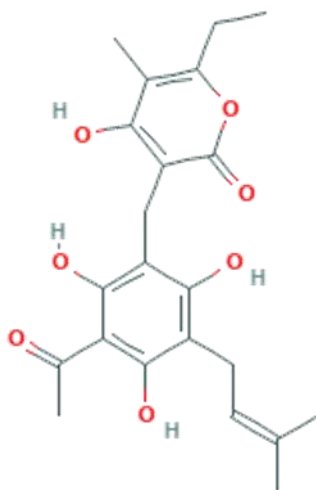
Antioksidativno djelovanje je ispitano za acetofenone, flavonoide i arzanol iz *H. italicum*.

Acetofenoni nisu pokazali antioksidativno djelovanje pa ono vjerojatno nije uključeno u njihovu protuupalnu aktivnost, a nisu pokazali niti inhibitorno djelovanje na ne-enzimsku ( $\text{Fe}^{2+}$ /askorbat sustav) i enzimsku lipidnu peroksidaciju ( $\text{CCl}_4$ /NADPH sustav). Jedino je 4-hidroksi-3-(3-metil-2-butenil)acetofenon inhibirao enzimsku lipidnu peroksidaciju. (Sala i sur., 2003b).

Od flavonoida iz *H. italicum*, tilirozid je pokazao puno jaču antioksidativnu aktivnost, (ima sposobnost hvatanja DPPH i superoksidnog slobodnog radikala) od gnafalina i pinocembrina. Antioksidativna aktivnost tilirozida ujedno je i povezana s njegovim

protuupalnim djelovanjem. Osim toga, tilirozid je jedini inhibirao ne-enzimsku i enzimsku lipidnu peroksidaciju, dok su gnafalin i pinocembrin inhibirali samo enzimsku lipidnu peroksidaciju. Pretpostavlja se da je razlog tome što mehanizam inhibicije lipidne peroksidacije gnafalina i pinocembrina uključuje inhibiciju enzima uključenih u inicijaciju lipidne peroksidacije, a mehanizam tilirozida uključuje i hvatanje slobodnih radikala (Sala i sur., 2003a). Također, utvrđeno je da tilirozid i gnafalin inhibiraju  $\text{Cu}^{2+}$  induciranu oksidaciju humanog lipoproteina niske gustoće (eng. *low density lipoprotein*, LDL) i to vjerojatno zbog hvatanja reaktivnih kisikovih vrsta i keliranja metala uključenih u produkciju slobodnih radikala, te tako smanjuju oksidativne modifikacije LDL-a i progresiju ateroskleroze. Iako je dokazano da su za antioksidativno djelovanje flavonoida najvažnije kateholna skupina na prstenu B, zatim 2,3-dvostruka veza konjugirana s 4-okso skupinom i 3-hidroksilna skupina na heterocikličkom prstenu, tilirozid i gnafalin pokazuju antioksidativno djelovanje unatoč tome što u svojoj strukturi nemaju sve navedene skupine ili su one modificirane (Schinella i sur., 2007).

Antioksidativno djelovanje arzanola ispitivano je u nekoliko *in vitro* modela. U modelu autooksidacije linolne kiseline arzanol je pokazao učinkovitost u hvatanju peroksilnih radikala masnih kiselina i inhibiciji autooksidacije. Za takvo antioksidativno djelovanje važnim su se pokazale broj i pozicija fenolnih skupina na aromatskom prstenu koje djeluju kao donori vodika te lipofilnost koja utječe na interakciju s masnom kiselinom (slika 2). I u drugim modelima arzanol je pokazao protektivno djelovanje, a jedino je u modelu  $\text{FeCl}_3$ - i EDTA- posredovane oksidacije linolne kiseline pokazao slabi učinak vjerojatno zbog slabih svojstava kelatora (Rosa i sur., 2007).



Slika 2. Kemijska struktura arzanola (preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Ispitivanja antioksidativnog potencijala prirodnih spojeva iz *H. italicum*, ali i drugih biljnih vrsta zanimljivo je prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji radi pronalaska prirodnih antioksidansa koji će biti sigurniji za primjenu od postojećih sintetskih (butil-hidroksitoluen (BHT) i butil-hidroksi anisol (BHA)). Ipak, da bi se mogli primjenjivati, za prirodne antioksidanse potrebno je ispitati njihovu učinkovitost, biodostupnost i sigurnost primjene *in vivo* (Rosa i sur., 2007).

### 1.4.3. Antimikrobno djelovanje

Neracionalna upotreba antibiotika, posebno u bolničkom okruženju, dovela je do pojave bakterija rezistentnih na više antibiotika odnosno multi rezistentnih (multidrug resistance, MDR) bakterija. Jedan od načina na koji multi rezistentne bakterije osiguravaju otpornost na antibiotike je prekomjerna ekspresija efluksnih pumpi, proteinskih nosača koji iz stanice bakterije mogu izbaciti različite antibiotike i tako ih učiniti neučinkovitim. Međutim, blokiranje efluksnih pumpi uz pomoć inhibitora (efflux pump inhibitors, EPIs) može povećati učinkovitost antibiotika (Guinoiseau i sur., 2013; Lorenzi i sur., 2009).

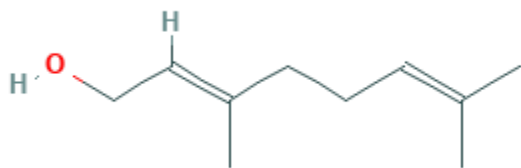
Stoga, napravljena je studija u kojoj se pokazalo da eterično ulje *H. italicum* značajno smanjuje rezistenciju Gram-negativnih bakterija (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) na kloramfenikol te da je učinkovito protiv onih sojeva koji prekomjerno ekspimiraju određene efluksne pumpe, zbog čega je pretpostavljeno da sadrži jednu ili više sastavnica koje djeluju kao inhibitori efluksnih pumpi (EPI). Otkriveno je da od svih sastavnica, geraniol djeluje kao snažni inhibitor efluksnih pumpi koji povećava osjetljivost bakterija ne samo na kloramfenikol, već i na klinički značajnije antibiotike poput  $\beta$ -laktama i fluorokinolona norfloksacina (Lorenzi i sur., 2009).

Napravljene su i druge studije u kojima je ispitivana učinkovitost antimikrobnog djelovanja eteričnog ulja *H. italicum* iz Hrvatske (Mastelic i sur., 2005), Bosne i Hercegovine i Francuske (Mollova i sur., 2020) te iz Alžira (Bouzid i sur., 2017). Antimikrobna aktivnost ispitivana je na Gram-pozitivnim, Gram-negativnim bakterijama i na gljivicama korištenjem disk difuzijske metode i određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (minimum inhibitory concentration, MIC). Jača antimikrobna aktivnost je utvrđena protiv Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) i gljivica (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*), dok je slabija antimikrobna aktivnost utvrđena protiv Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*

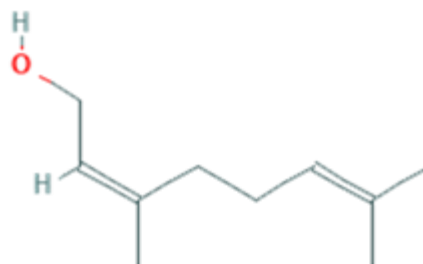
*pneumoniae*) (Bouزيد i sur., 2017; Mastelic i sur., 2005). Razlika u osjetljivosti Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija vjerojatno je posljedica različite građe njihovog staničnog zida. Tako Gram-pozitivne bakterije imaju stanični zid građen od citoplazmatske membrane i sloja peptidoglikana koji ne djeluju kao snažna barijera, dok Gram-negativne imaju stanični zid građen od citoplazmatske membrane, peptidoglikana i vanjske fosfolipidne membrane s lipopolisaharidima koji djeluju kao barijera prolasku lipofilnih molekula odgovornih za antimikrobnu aktivnost (Nostro i sur., 2000).

Osim eteričnog ulja, antimikrobnu aktivnost su pokazali i ekstrakt *H. italicum* u dietil-eteru (Nostro i sur., 2002; Nostro i sur., 2001) i etanolni ekstrakt (Nostro i sur., 2004). Ekstrakt u dietil-eteru je inhibirao rast *S. aureus*, inhibirao je enzimsku aktivnost deoksiribonukleaze, lipaze, termonukleaze i koagulaze, enzima koji se smatraju odgovornim za povećanje virulencije, te je već pri niskim koncentracijama inhibirao proizvodnju enterotoksina B i C (Nostro i sur., 2002; Nostro i sur., 2001). Etanolni ekstrakt je inhibirao rast *Streptococcus mutans*, bakterije povezane s nastankom karijesa, te je utjecao na njezin kariogeni potencijal smanjujući njezinu hidrofobnost (vjerojatno vežući se na proteine na površini stanice), adherenciju i agregaciju (Nostro i sur., 2004).

U nekim studijama ističe se da su za antimikrobno djelovanje odgovorni flavonoidi i terpeni (Nostro i sur., 2002; Nostro i sur., 2001; Nostro i sur., 2000) koji imaju lipofilni karakter pa se vjerojatno nakupljaju u citoplazmatskoj membrani mikroorganizama, narušavaju njezinu strukturu i funkciju te ona gubi svoj integritet i postaje propusna za ione (Nostro i sur., 2001). U drugim se studijama odgovornim smatraju monoterpenske sastavnice koje sadrže kisik kao što su geraniol (slika 3), nerol (slika 4), geranil-acetat i neril-acetat, iako se ističe da treba uzeti u obzir i njihov sinergizam s drugim komponentama (Bouزيد i sur., 2017; Mastelic i sur., 2005). Takve razlike u rezultatima su posljedica različitih okolišnih i klimatskih uvjeta koji utječu na sastav eteričnog ulja te različitih metoda ekstrakcije i testova za ispitivanje antimikrobne aktivnosti (Mollova i sur., 2020; Nostro i sur., 2000). Dobivena saznanja se mogu upotrijebiti u razvoju prirodnih konzervansa u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te u razvoju novih antimikrobnih lijekova (Nostro i sur., 2000).



Slika 3. Kemijska struktura geraniola



Slika 4. Kemijska struktura nerola

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

#### 1.4.4. Insekticidno i repelentno djelovanje

Sintetski insekticidi unatoč svojoj učinkovitosti, kod ponavljane primjene mogu imati neželjene učinke na okoliš i ljudsko zdravlje. Iz tog razloga postoji potreba za pronalaskom alternativa koje će biti jednako učinkovite, ali ekološki prihvatljivije i sigurnije za ljudsko zdravlje. Mnoge komponente izolirane iz biljaka pokazale su toksični učinak na komarce koji su vektori mnogih bolesti (malarija, filarijaza, žuta groznica). Stoga je istražena i učinkovitost eteričnog ulja *H. italicum* protiv ličinki komarca *Aedes albopictus*, a rezultati su pokazali da eterično ulje *H. italicum* posjeduje veliku toksičnost prema ličinkama *A. albopictus*, koja je ovisna o dozi, i da pri koncentraciji 300 ppm uzrokuje stopu smrtnosti 100% (Conti i sur., 2010). Osim toga, pokazalo se da eterično ulje *H. italicum* posjeduje i repelentni učinak protiv komarca *Aedes aegypti* koji je neovisan o koncentraciji eteričnog ulja (0,1-10%), te bi se ono zato moglo koristiti kao jedna od komponenti u repelentnim formulacijama (Drapeau i sur., 2009). Ipak, potrebno je još istražiti aktivnost eteričnog ulja *H. italicum* protiv drugih vrsta komaraca, kao i sastavnice odgovorne za insekticidno djelovanje (Conti i sur., 2010).

#### 1.4.5. Antidiijabetički učinak

Učinak metanolno-vodenog ekstrakta *H. italicum* na smanjenje tjelesne težine i razine glukoze u krvi ispitan je na modelu štakora kod kojih je, pomoću prehrane bogate mastima i šećerima, inducirano stanje inzulinske rezistencije te je značajno povećana njihova tjelesna težina i razina glukoze u krvi. Uz standardnu dijetu, skupina štakora je primala i ekstrakt *H. italicum* te je postigla značajnije smanjenje tjelesne težine od skupine koja ga nije primala.



Također, ekstrakt *H. italicum* je zbog svog antiinflamatornog djelovanja inhibirao upalu posredovanu s faktorom tumorske nekroze  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) i Toll-like receptorima (*toll-like receptors*, TLR) smanjujući ekspresiju TNF- $\alpha$  i TLR2 u intestinalnoj mukozii. Isto tako, zbog antioksidativnog djelovanja je smanjivao oksidativni stres koji pridonosi oslobađanju upalnih citokina i oštećenju tkiva koje dovodi do smanjene osjetljivosti tkiva na inzulin. Takvo djelovanje je važno budući da su se upala i oksidativni stres pokazali povezanim s pretilosti i inzulinskom rezistencijom. Protuupalno i antioksidativno djelovanje ekstrakta pripisuje se flavonoidima, iako se ne može isključiti niti uloga drugih sastavnica ekstrakta (Garza i sur., 2015). U studiji koju su proveli Garza i sur. je pokazano kako metanolno-vodeni ekstrakt *H. italicum* smanjuje razinu glukoze u krvi kod dijabetičkih *db/db* miševa, a za što se pretpostavlja da je posljedica povećane ekspresije enzima glukokinaze koji fosforilira glukozu u jetri, nakon čega ona u stanicama jetre podliježe procesu glikolize ili glikogeneze. Osim toga, opažena je smanjena ekspresija odnosna razina mRNA za nekoliko pro-inflamatornih markera (faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ciklooksigenaze-2 (COX-2) i nuklearnog faktora kappa B (NF $\kappa$ B)) u tkivu jetre i u masnom tkivu dijabetičkih *db/db* miševa, što je važno budući da bi djelovanje na smanjenje kronične upale moglo pomoći u liječenju šećerne bolesti tipa 2 (Garza i sur., 2014).

#### **1.4.6. Antikolagenazna i antielastazna aktivnost**

U formulacijama proizvoda za njegu kože često se nalazi eterično ulje smilja s ciljem odgađanja procesa starenja kože. Starenje kože može biti intrinzično i ekstrinzično, a razlikuje se po tome što je intrinzično starenje posljedica prirodnih procesa dok je ekstrinzično rezultat pretjerane izloženosti sunčevom zračenju (fotostarenje) koje dovodi do stvaranja slobodnih radikala i lipidnih peroksida, koji oštećuju ekstracelularni matriks i uzrokuju gubitak elastičnosti kože, ali i neke kožne tumore. Ono što je zajedničko kod oba procesa starenja je povećana aktivnost enzima kolagenaze, odgovornog za razgradnju kolagena, i enzima elastaze, odgovornog za razgradnju elastina u ekstracelularnom matriksu. Stoga bi otkriće novih prirodnih inhibitora ovih enzima, koji bi također imali protuupalno i antioksidativno djelovanje, bilo korisno za razvoj novih formulacija proizvoda protiv starenja kože. S tim ciljem, istraživana je antikolagenazna i antielastazna aktivnost eteričnog ulja *H. italicum* te aktivnost određenih sastavnica eteričnog ulja (neril-acetat, nerol, linalol,  $\alpha$ -pinen, limonen) iste koncentracije kao u eteričnom ulju. Najjači inhibitorni učinak pokazalo je eterično ulje,

vjerojatno zbog sinergističkog djelovanja sastavnica dok su slabiji učinak pokazali  $\alpha$ -pinen i limonen pojedinačno i u smjesi. Neril-acetat, nerol i linalol nisu imali učinka (Fraternale i sur., 2019).

#### **1.4.7. Fotoprotektivno djelovanje**

Izlaganje ultraljubičastom (UV) zračenju dovodi do povećane proizvodnje metabolita arahidonske kiseline (prostagandina  $E_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ), a nastali metaboliti imaju istaknutu ulogu u nastanku eritema. U nastanka eritema ulogu također imaju i degranulacije mastocita i oslobađanja histamina, za koji se pretpostavlja da potiče sintezu prostaglandina, te stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta koje dovode do lipidne peroksidacije, povećane aktivnosti fosfolipaze  $A_2$  ( $PLA_2$ ) i ponovno povećane proizvodnje prostaglandina (Hruza i Pentland, 1993). Topikalnom primjenom 8% alkoholne otopine sirovog ekstrakta *H. italicum* i 2% alkoholne otopine flavonoidne frakcije dobivene iz tog ekstrakta na zamorcima te primjenom flavonoidne frakcije na ljudima, prije i nakon izlaganja UVB zračenju, dokazano je da i ekstrakt i flavonoidna frakcija preveniraju nastanak eritema kod zamoraca i ljudi. Flavonoidna frakcija je također pružila zaštitni faktor 5. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja flavonoidne frakcije uključuje inhibiciju lokalne produkcije prostaglandina u iritiranoj koži (uglavnom posredovano s luteolinom), inhibiciju oslobađanja histamina iz mastocita i hvatanje slobodnih radikala (uglavnom posredovano s apigeninom). Iz tog razloga, flavonoidi iz *H. italicum* bi se mogli dodavati proizvodima za tretiranje opekline te proizvodima za zaštitu od sunca (Viegas i sur., 2014).

#### **1.4.8. Antispazmodično djelovanje**

Budući da je poznato da se biljni čaj *H. italicum* koristi kao tradicionalni lijek za liječenje probavnih tegoba, istraženo je djelovanje etanolnog ekstrakta *H. italicum* na kontrakcije gastrointestinalnog trakta *in vitro* te na motilitet zdravih crijeva i crijeva zahvaćenih upalom *in vivo*. Pokazalo se da etanolni ekstrakt posjeduje antispazmodični učinak odnosno da inhibira kontrakcije izoliranog crijeva miša inducirane s acetilkolinom i barijevim kloridom. Također, ekstrakt je inhibirao i motilitet crijeva eksperimentalnih miševa, te je snažniji učinak imao na crijeva zahvaćena upalom nego na zdrava crijeva. Sličan učinak na

motilitet crijeva opažen je i za loperamid, opioidni lijek, koji se koristi u liječenju poremećaja u motilitetu crijeva. Ovakva saznanja su važna zato jer ne samo da potvrđuju tradicionalnu upotrebu *H. italicum* u liječenju crijevnih tegoba već ostavljaju mogućnost za istraživanja novih lijekova za liječenje upalnih bolesti crijeva budući da trenutno korišteni lijekovi uzrokuju konstipaciju (Rigano i sur., 2013).

#### **1.4.9. Antineoplastično djelovanje**

Eterično ulje *H. italicum* pokazalo je antiproliferativno djelovanje na tumorskom modelu stanica mišjeg melanoma B16F10, koji brzo metastazira i vrlo je otporan na lijekove. Uzorci eteričnog ulja inhibirali su rast i smanjivali su proliferaciju tumorskih stanica ovisno o dozi i duljini izloženosti. Također, eterično ulje posjeduje i snažno antioksidativno djelovanje koje bi moglo objasniti njegova antineoplastična svojstva budući da je dokazano da su stanice karcinoma sklonije prekomjernom stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta, koje djeluju na signalne putove u stanici i dovode do nekontrolirane proliferacije istih. Iako je napravljena analiza sastava eteričnog ulja, identifikacija komponenti odgovornih za ovakvo djelovanje je teška zato što različite sastavnice ostvaruju takav učinak sinergističkim djelovanjem (Gismondi i sur., 2020).

Osim na modelu stanica mišjeg melanoma B16F10, antiproliferativno djelovanje je ispitano i na nekoliko humanih staničnih linija pri čemu je najjači inhibitorni učinak imalo na HeLa (stanice karcinoma cerviksa), MCF-7 (stanice karcinoma dojke) i MIA PaCa-2 (stanice karcinoma pankreasa) stanične linije. Pretpostavlja se da je kod HeLa i MCF-7 staničnih linija mehanizam antiproliferativnog djelovanja indukcija apoptoze dok su kod MIA PaCa-2 stanica uključeni drugi mehanizmi smrti stanice poput starenja i nekroze. U konačnici, ovakvi rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja eteričnog ulja *H. italicum* kao izvora novih antineoplastičnih lijekova (Malenica Staver i sur., 2018).

Na kraju se može zaključiti da unatoč tome što postoje studije u kojima je ispitano djelovanje eteričnih ulja, ekstrakata i pojedinih sastavnica *H. italicum* *in vitro* i *in vivo* na životinjskim modelima, još uvijek nedostaje kliničkih studija na ljudima koje bi potvrdile dobivene rezultate i tradicionalnu uporabu *H. italicum* i kojima bi se odredilo odgovarajuće doziranje ekstrakata s ciljem povećanja njihove učinkovitosti i sigurnosti primjene (Viegas i sur., 2014).

## 1.5. Eterična ulja - svojstva i kemijski sastav

Eterična ulja su smjese hlapljivih, lipofilnih spojeva, intenzivnog mirisa, koji se dobivaju izolacijom iz biljaka. Najčešće su bezbojne ili blijedožućkaste tekućine (iako su neka čvrsta pri sobnoj temperaturi) koje se dobro otapaju u lipofilnim otapalima (96% etanol, kloroform, eter, petroleter, benzen, tekući parafin, masna ulja), a teško u vodi, većinom imaju specifičnu težinu manju od vode, optički su aktivna i jako lome svjetlost (indeks refrakcije). Eterična ulja mogu nastajati u svim ili biti ograničena na određene biljne dijelove, a najčešće se stvaraju u listovima, cvjetovima, plodovima, korijenu, podanku i drvu, dok se rjeđe stvaraju u stabljici i kori. Nastala eterična ulja mogu se u biljci odlagati egzogeno u tvorevinama koje imaju oblik žlijezda i koje su karakteristične za vrste porodice *Asteraceae*, ili endogeno u posebnim stanicama zvanim uljenice te u intracelularnim prostorima ili kanalima (Kuštrak, 2005). Eterična ulja u biljkama imaju ulogu privlačenja kukaca zbog oprašivanja, zaštite biljaka od životinja i prevelikog isparavanja (Kovač-Bešović, 2001).

Prema kemijskom sastavu, eterična ulja su smjese velikog broja kemijski različitih sastavnica među kojima su glavne sastavnice prisutne u količini 20-95 %, dok su sastavnice u tragovima prisutne u količini manjoj od 1%. S obzirom na funkcionalne skupine prisutne u molekuli sastavnice eteričnih ulja mogu biti alkani, alkeni, alkini, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, eteri, karboksilne kiseline, esteri i laktoni, a s obzirom na biosintetsko podrijetlo temeljnog skeleta spoja mogu biti derivati terpena, fenilpropanski derivati i ostali spojevi (Kuštrak, 2005).

Derivati terpena su glavne komponente eteričnih ulja čija je građevna jedinica izopren ( $C_5H_8$ ). Terpeni se mogu oksidirati, reducirati i polimerizirati čime nastaje velik broj različitih spojeva koji se dijele u 7 skupina, a to su hemiterpeni ( $C_5$ , predstavljaju aktivni izopren ili izopentenil pirofosfat), monoterpeni ( $C_{10}$ , imaju 2 izoprenske jedinice), seskviterpeni ( $C_{15}$ , imaju 3 izoprenske jedinice), diterpeni ( $C_{20}$ , imaju 2 monoterenske jedinice), triterpeni ( $C_{30}$ , imaju 3 monoterenske jedinice), tetraterpeni ( $C_{40}$ ) i politerpeni. U sastav eteričnih ulja ulaze monoterpeni kao aciklički, monociklički i biciklički spojevi, seskviterpeni kao aciklički, monociklički, biciklički i triciklički spojevi te neki diterpeni i triterpeni.

Fenilpropanski derivati su spojevi čiju osnovnu strukturu čini benzenska jezgra i postranični propilni lanac ( $C_6-C_3$ ), a mogu biti u obliku aldehida, fenola i feniletera.

Ostalim spojevima pripadaju lančani ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom, dušikom i sumporom (Kovač-Bešović, 2001).

Eterična ulja poznata su po svojem antioksidativnom, antibakterijskom, antivirusnom, antifungalnom i insekticidnom djelovanju zbog čega su našla svoju primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, poljoprivredi, ali i u kozmetici (Xu i sur., 2011).

### 1.5.1. Eterično ulje *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

Eterično ulje *H. italicum* proizvodi se u žljezdanim trihomima građenim od 12 stanica, koji se nalaze na cvjetnim glavicama (laticama i lapovima), ovojnim listovima i listovima stabljike. Upravo je ono, među svim sekundarnim metabolitima *H. italicum*, najviše analizirano (Perrini i sur., 2009).

Prilagodba na različite okolišne čimbenike, osim što uzrokuje raznolikost morfoloških, kemijskih i genetskih karakteristika vrste *H. italicum*, također utječe i na kvalitativni i kvantitativni sastav eteričnog ulja ove biljke (Melito i sur., 2016).

Leonardi i sur. su ispitivali količinu i sastav eteričnih ulja dobivenih iz uzoraka *Helichrysum italicum ssp. italicum* prikupljenih na 7 različitih lokacija na otoku Elbi tijekom različitih perioda u godini (siječanj, svibanj i listopad), te su zaključili da su količina i sastav eteričnog ulja povezani sa staništem na kojem biljka raste i to posebno s tipom tla. Prema tome, eterična ulja biljaka prikupljenih s različitih lokacija imat će različitu količinu eteričnog ulja (0,1 do 0,6 %) i bit će bogata različitim sastavnicama (Leonardi i sur., 2013).

Blažeković i sur. su također pokazali kako lokacija na kojoj smilje raste utječe i na sadržaj eteričnog ulja (koji se za uzorke s različitih lokacija u Dalmaciji kretao između 0,08 i 0,32) i na zastupljenost pojedinih komponenti u eteričnom ulju. Osim lokacije, i faza rasta biljke utječe na količinu eteričnog ulja (0,06 do 0,35 %) i na količinu pojedinih sastavnica eteričnog ulja, dok nema značajan utjecaj na kvalitativni sastav eteričnog ulja. Tako je količina eteričnog ulja najveća u fazi prije cvjetanja, a od sastavnica, monoterpeni su dominantni u fazi rasta biljke, dok su seskviterpeni dominantni u fazi cvjetanja i fazi nakon cvjetanja biljke (Blažeković i sur., 1995).

Melito i sur. su istraživali razliku u sastavu eteričnih ulja *Helichrysum italicum ssp. microphyllum* s dva različita područja, obalnog (0 – 60 m nadmorske visine) i planinskog područja (60 – 1250 m nadmorske visine). Pokazalo se da postoje dva glavna kemotipa, obalni i planinski pri čemu obalni tip proizvodi više monoterpenskih, a planinski tip više seskviterpenskih sastavnica. Dobiveni rezultati su, osim toga, ukazali na to da nadmorska visina ima utjecaj na sastav eteričnog ulja te da neki spojevi poput nerola, italicena,  $\gamma$ -

kurkumena i ar-kurkumena pokazuju pozitivnu, dok drugi poput limonena, kariofilena, nerolidola i *cis*- $\beta$ -guainena pokazuju negativnu korelaciju s nadmorskom visinom. Uz nadmorsku visinu, i klimatski čimbenici kao što su prosječna zimska i maksimalna ljetna temperatura te proljetne, ljetne i jesenske oborine povezani su s udjelom pojedinih sastavnica. Nerolidol je pokazao najveću pozitivnu korelaciju sa zimskom, a guaiol s maksimalnom ljetnom temperaturom, dok su na italicen, bergamoten, nerol i kurkumen najviše pozitivno utjecale proljetne i ljetne, a na limonen jesenske oborine (Melito i sur., 2016).

Ćavar Zeljković i sur. su ispitali utjecaj nadmorske visine i klimatskih čimbenika pri čemu se pokazalo da eterična ulja dobivena od biljaka sakupljenih na različitim lokacijama u Dalmaciji, koje su se razlikovale prema nadmorskoj visini i izloženosti suncu, imaju sličan kvalitativni sastav, ali se razlikuju prema kvantitativnom sastavu. Niža nadmorska visina i manja izloženost suncu utjecale su na veći sadržaj oksigeniranih komponenti i manji sadržaj monoterpenkih ugljikovodika (Ćavar Zeljković i sur., 2015).

Na kraju, može se utvrditi da na sastav i količinu eteričnih ulja značajno utječu stanište na kojem biljka raste, posebno tip tla, faza rasta biljke, zatim nadmorska visina i klimatski čimbenici poput temperature, oborina i izloženosti suncu (Melito i sur., 2016; Ćavar Zeljković i sur., 2015; Leonardi i sur., 2013; Blažeković i sur., 1995).

Količina i sastav eteričnog ulja *H. italicum* iz različitih područja Hrvatske ispitan je u nekoliko studija (Malenica Staver i sur., 2018; Ćavar Zeljković i sur., 2015; Mastelić i sur., 2005; Blažeković i sur., 1995). Eksperimentalni podatci i dobiveni rezultati koji uključuju mjesto prikupljanja uzoraka, metodu identifikacije sastavnica, sadržaj eteričnog ulja (%), broj identificiranih sastavnica i glavne sastavnice prikazani su u tablici 1.

Između studija postoje razlike, pa su tako u nekim studijama najzastupljenija skupina spojeva u eteričnom ulju *H. italicum* bili seskviterpenki ugljikovodici, dok su u nekim studija to bili monoterpenki spojevi. Ipak, od pojedinačnih spojeva dominantne sastavnice su  $\alpha$ -pinen (monoterpenki ugljikovodik),  $\alpha$ - i  $\gamma$ -kurkumen (seskviterpenki ugljikovodici) te neril acetat (oksigenirani monoterpen). Ovakva varijabilnost kemijskog sastava eteričnog ulja *H. italicum*, dobivenog iz biljaka prikupljenih s različitih područja, posljedica je različitih klimatskih uvjeta (temperatura, oborine, broj sunčanih sati, duljina dana) i okolišnih čimbenika (tip i pH tla, nadmorska visina) kojima su biljke izložene (Malenica Staver i sur., 2018).

Tablica 1. Eksperimentalni podatci i dobiveni rezultati analize eteričnih ulja dobivenih iz biljaka vrste *H. italicum* prikupljenih na različitim područjima Hrvatske

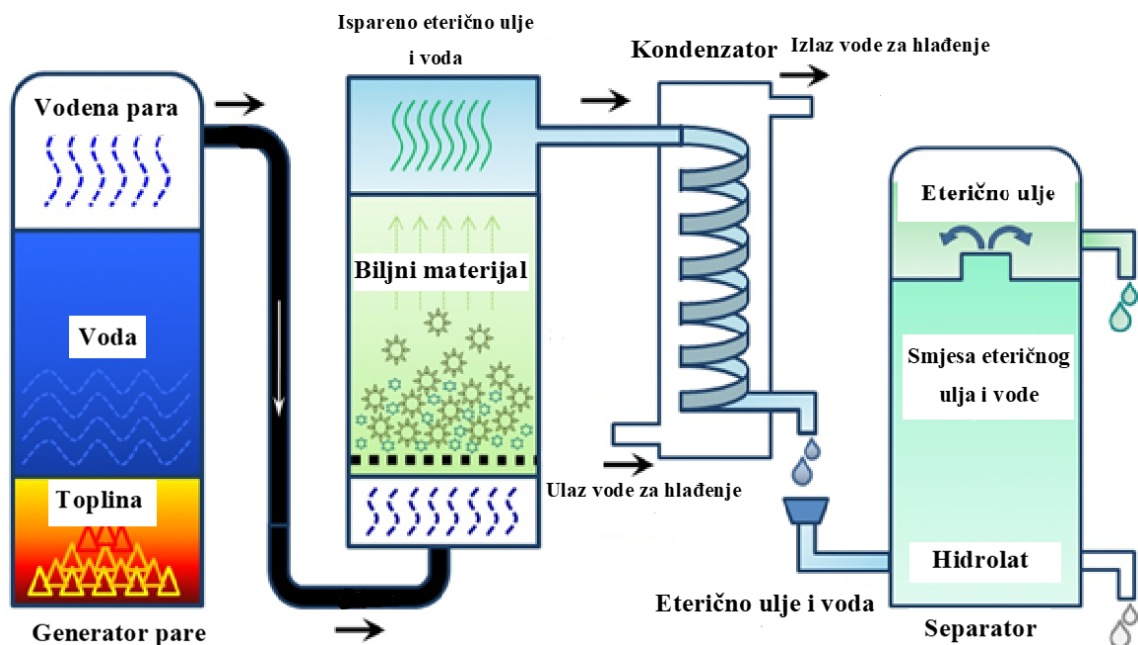
Mjesto prikupljanja uzoraka	Metoda identifikacije sastavnica	Sadržaj eteričnog ulja (%)	Broj identificiranih sastavnica	Glavne sastavnice	Izvor iz literature
Područje oko Zadra, Šibenika, Knina	GC-MS	0,020	38	$\alpha$ -pinen, $\gamma$ -kurkumen, neril acetat, $\beta$ -selinen, izotalicen, $\beta$ -kariofilen, $\alpha$ -kurkumen	Malenica Staver i sur., 2018
Područje Brača, Biokova, Tijarice, Makarske	GC-MS	0,02-0,12	97	neril acetat, $\alpha$ -trans-bergamoten, $\alpha$ -humulen, $\beta$ -akoradien, <i>ar</i> -kurkumen, rosifoliol	Čavar Zeljković i sur., 2015
Područje oko Splita	GC-MS	0,12	52	$\alpha$ -pinen, $\alpha$ -cedren, aromadendren, $\beta$ -kariofilen, neril acetat, geranil acetat	Mastelic i sur., 2005
Različite lokacije duž Jadranske obale	GC GC-MS	0,08-0,32	32	$\alpha$ -pinen, $\alpha$ -terpineol, neril acetat, $\alpha$ -cedren, <i>i</i> -italicen, $\alpha$ -kurkumen, $\gamma$ -kurkumen, Spatulenol	Blažeković i sur., 1995

## 1.6. Metode dobivanja eteričnih ulja

Način dobivanja eteričnog ulja ovisi o biljnom materijalu koji se koristi kao sirovina za dobivanje ulja, o količini i lokalizaciji eteričnog ulja, te o prisutnosti termostabilnih ili termolabilnih sastavnica u eteričnom ulju. Eterična ulja mogu se dobivati postupcima destilacije, ekstrakcije i tiještenja (Kovač-Bešović, 2001).

### 1.6.1. Destilacija

Metoda destilacije je najčešće primjenjivana metoda za dobivanje eteričnih ulja, a može biti vodena, vodenoparna i parna destilacija (zajednički se nazivaju hidrodestilacija) te vakuum destilacija. Pri vodenoj destilaciji biljni materijal je uronjen u ključalu vodu, dok se kod vodenoparne destilacije biljni materijal nalazi na perforiranoj podlozi iznad sloja vode i u izravnom je kontaktu samo sa zasićenom vodenom parom, a ne i s ključalom vodom. Na taj način smanjena je mogućnost razgradnje i osmoljavanja sastavnica (slika 5). Parna destilacija razlikuje se od prethodne dvije po tome što je biljni materijal odijeljen od izvora topline koji služi za proizvodnju pare, pa je stoga manji termički raspad sastavnica. Prilikom vakuum destilacije biljni materijal nije u izravnom kontaktu s vodenom parom već se ona nalazi u omotaču oko posude za destilaciju, a primjenom vakuuma mogu se snižavati točke vrenja sastavnica eteričnog ulja. Nedostatci postupaka destilacije su neprikladnost za izolaciju malih količina eteričnih ulja te za izolaciju eteričnih ulja sa sastavnicama visokog vrelišta, sastavnicama dobro topljivim u vodi i osjetljivim mirisnim sastavnicama (zbog moguće razgradnje pri visokim temperaturama) (Kuštrak, 2005; Kovač-Bešović, 2001).



Slika 5. Shematski prikaz postupka parne destilacije (preuzeto s <https://onlinelibrary.wiley.com>)



## 1.6.2. Ekstrakcija

Metode ekstrakcije koriste se za izolaciju malih količina eteričnih ulja te izolaciju eteričnih ulja sa sastavnicama visokog vrelišta i termolabilnim sastavnicama. Razlikuje se nakoliko postupaka ekstrakcije, a to su ekstrakcija pomoću organskih otapala, ekstrakcija pomoću nehlapljivih otapala i ekstrakcija superkritičnim fluidom.

Prvi postupak je ekstrakcija pomoću organskih otapala kod koje se koriste organska otapala različite polarnosti i temperatura vrenja, poput dietiletera, diklormetana, pentana, izopentana, petroletera i benzena, a dobivena su ulja polučvrste konzistencije zato jer sadržavaju zaostale nehlapljive spojeve (masna ulja, voskovi) i nazivaju se konkretima (*Essences concretes*). Iz njih se pročišćavanjem s apsolutnim etanolom dobivaju čista eterična ulja (*Essences absolutes*). Nedostatci ovog postupka su gubitak hlapljivih sastavnica eteričnog ulja prilikom otparavanja organskog otapala te mogućnost zaostajanja otapala u eteričnom ulju (Kuštrak, 2005; Kovač-Bešović, 2001).

Drugi postupak je ekstrakcija pomoću nehlapljivih otapala koja se može odvijati bez i uz primjenu topline. Kod ekstrakcije bez primjene topline (*Enfleurage à froid*), između staklenih ploča, s obje strane premazanih slojem neutralne masti (goveđi loj i svinjska mast) ili nekog drugog adsorptivnog sredstva (silikagel, ugljen, esteri polialkohola), stavljaju se cvjetovi iz kojih hlapi eterično ulje i adsorbira se u masnu podlogu. Nakon nekoliko sati ili dana, stavlja se novi sloj cvjetova i taj se postupak ponavlja sve dok se masna podloga ne zasiti eteričnim uljem. Kod ekstrakcije uz primjenu topline (*Enfleurage à chaud*), cvjetovi se stavljaju u ulje (maslinovo ulje, parafinsko ulje) ili rastaljenu mast (goveđi loj) temperature 50 – 80 °C. Nakon nekog vremena, stavljaju se novi cvjetovi i postupak se opet ponavlja kako bi se eterično ulje ukoncentriralo. Za oba postupka je zajedničko da se za ekstrakciju eteričnog ulja iz masnih podloga koristi 96% etanol, a nakon toga slijedi još nekoliko koraka kojima se dobiva čisto eterično ulje (Kuštrak, 2005; Kovač-Bešović, 2001).

Treći postupak ekstrakcije je ekstrakcija sa superkritičnim fluidom, a najčešće se kao superkritični fluid upotrebljava ugljikov dioksid (*supercritical carbon dioxide*, SC-CO<sub>2</sub>) zbog svojih brojnih povoljnih svojstava. Osim što ima niske kritične parametre (temperatura 30,9°C i tlak 73,8 bar) pa je pogodan za izolaciju termolabilnih sastavnica, ima veliku moć difuzije i nalazi se u plinovitom stanju pri sobnoj temperaturi i tlaku pa se lako uklanja iz ekstrahiranog produkta. Također, SC-CO<sub>2</sub> nije toksičan i zapaljiv, ekološki je prihvatljiv i prihvatljive je cijene (Xu i sur., 2011).

### 1.6.3. Tiještenje

Tiještenje je postupak koji se uglavnom koristi za dobivanje eteričnog ulja iz vanjskog dijela usplođa vrsta roda *Citrus*. Ovaj postupak može se provoditi ručnim istiskivanjem eteričnog ulja ili mehanički, pomoću strojeva s rotirajućim pločama s puno igala koje ubadaju usplođe i omogućavaju oslobađanje eteričnog ulja (Kuštrak, 2005; Kovač-Bešović, 2001).

### 1.7. Metode izolacije sastavnica iz *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

U studijama koje su provedene, biljne sastavnice iz *H. italicum* izolirane su uz pomoć tri metode izolacije: metode destilacije (vodene i parne), metode ekstrakcije superkritičnim CO<sub>2</sub> i metode ekstrakcije s organskim otapalima. Metodama vodene destilacije (najčešće se upotrebljava) i parne destilacije izolira se eterično ulje koje uglavnom sadrži terpenске sastavnice, ali i druge spojeve među kojima su značajni  $\beta$ -diketoni poznati i kao itolidioni. Ipak, iako su vodena i parna destilacija jednostavne metode nedostatak im je mali prinos eteričnog ulja (do 0,78 %). Ekstrakcija superkritičnim CO<sub>2</sub> omogućuje također dobivanje eteričnog ulja, u kojem će uz spomenute sastavnice značajnije biti prisutni seskviterpeni ( $\alpha$ -selinen,  $\beta$ -selinen, ar-kurkumen, kariofilen) i voskovi (zbog povećanog tlaka), a i bit će puno veći prinos eteričnog ulja (do 6,31 %). Za razliku od prethodnih metoda, ekstrakcijom pomoću organskih otapala (najčešće aceton, metanol i etanol) uz terpene se izolira i velika skupina fenolnih komponenti (flavonoidi, acetofenoni, floriglucinoli, tremetoni, kumarini i kumarati, fenolne kiseline i esteri) te pironi, lipidi i steroidi. Pomoću ekstrakcije organskim otapalima dobiveni su veliki prinosi (do 19,77 %) zbog male selektivnosti organskih otapala (Maksimović i sur., 2017).

### 1.8. Macerat i postupak maceracije

Macerat je pripravak koji se dobiva postupkom maceracije. Maceracija je metoda ekstrakcije koja se odvija pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku ostavljanjem biljne droge određeno vrijeme u polarnom ili nepolarnom otapalu. Postupak ekstrakcije sastavnica iz biljne droge uključuje penetraciju otapala u čvrsti matriks biljne droge, otapanje sastavnica droge u otapalu, difuziju otopljene tvari iz čvrstog matriksa i skupljanje ekstrahiranih

sastavnica. Na učinkovitost procesa ekstrakcije utječu brojni faktori kao što su ekstrakcijsko otapalo, veličina čestica biljne droge, omjer otapalo-biljna droga, duljina trajanja ekstrakcije i temperatura. Odabir otapala za ekstrakciju je jedan od najvažanijih faktora zato jer o njemu ovisi polarnost ekstrahiranih sastavnica. Uglavnom se odabir otapala temelji na principu da se slično otapa u sličnome, pa se tako za izolaciju lipofilnih sastavnica koriste nepolarnija otapala (primjerice masna ulja), a za izolaciju hidrofilnih sastavnica polarnija otapala. Čestice manje veličine, koje omogućuju bolju penetraciju otapala i difuziju sastavnica, veći omjer otapalo-biljna droga, dulje trajanje ekstrakcije i povećana temperatura povećavaju učinkovitost ekstrakcije. Ipak, povećanje trajanja ekstrakcije nakon nekog vremenskog perioda, kada se već uspostavila ravnoteža, neće više imati utjecaja na učinkovitost ekstrakcije, a previsoka temperatura pri kojoj se ekstrakcija provodi može dovesti do razgradnje termolabilnih sastavnica. Upravo zato su prednosti procesa maceracije, osim jednostavnosti, i to što se odvija pri sobnoj temperaturi pa nema razgradnje termolabilnih sastavnica, dok su glavni nedostaci dugo vrijeme potrebno za ekstrakciju i mala učinkovitost ekstrakcije. Aktivne komponente koje su prisutne u maceratu smilja u biljnom ulju su monoterpeni, seskviterpeni, oksigenirani monoterpeni, fenolne komponente i karoteni (Zhang i sur., 2018; Petersen, 2015; Marković, 2010).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

U tradicionalnoj medicini vrsta *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don upotrebljava se već godinama zbog svojih korisnih svojstava za liječenje različitih poremećaja od kojih su najčešći poremećaji probavnog, dišnog sustava i kože (Viegas i sur., 2014). Između različitih pripravaka smilja svoju primjenu je našao i macerat smilja koji se primjenjuje u medicinske i kozmetičke svrhe za tretiranje suhe, oštećene i iritirane kože, akni, dermatitisa, ekcema i psorijaze, hematoma i varikoznih vena, opekline, ožiljaka i strija te kože sklone upalama. Također, koristi se i za odgađanje procesa starenja kože, protiv bora i pigmentnih mrlja (Marković, 2010). Istraživanja koja su provedena uglavnom su usmjerena na sastav i djelovanje eteričnog ulja smilja i ekstrakata smilja u različitim organskim otapalima (najčešće aceton, metanol i etanol).

U ovome radu provedeno je određivanje kemijskih parametara (kiselinski broj) i fizikalnih parametara (relativna gustoća, indeks refrakcije), određivanje pH vrijednosti i određivanje sadržaja eteričnog ulja u uzorcima macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja u maslinovom ulju. Navedena ispitivanja općenito se primjenjuju u ispitivanju čistoće i procjeni kvalitete eteričnih i masnih ulja, a u ovom radu su provedena u svrhu ispitivanja čistoće i procjene kvalitete uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja u maslinovom ulju. Budući da za macerat smilja nisu dostupne referentne vrijednosti u literaturi, dobiveni rezultati uspoređivani su s referentnim vrijednostima za eterično ulje smilja i maslinovo ulje, koje su dostupne u literaturi. Osim toga, ovim radom se nastoji utvrditi postoje li razlike u izmjenjenim vrijednostima, a onda i razlike u čistoći i kvaliteti između uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja.

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

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Otopina KOH (kalijevo hidrokso),  $c=0,1\text{ M}$
- Fenolftalein (1% etanolna otopina), Kemika
- Etanol (96%), Kemika
- Redestilirana voda
- Heksan, Kemika
- Destilirana voda
- Standardna puferka otopina pH 4,00 (limunska kiselina / natrijev hidroksid / klorovodična kiselina) i standardna puferka otopina pH 7,00 (kalijevo dihidrofosfat / natrijev hidrofosfat dodekahidrat), Kemika
- NaCl (natrijev klorid),  $M=58,44$ , Kemika

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

#### 3.1.2. Laboratorijski pribor

- Erlenmayerove tikvice od 250 ml
- Menzure od 50 ml, 100 ml
- Mikropipete od 200-1000  $\mu\text{l}$
- Graduirane pipete od 10 ml
- Gumene propipete
- Bireta od 50 ml
- Piknometri od 5 ml
- Laboratorijske čaše od 25 ml, 50 ml, 100 ml
- Okrugla tikvica s ravnim dnom od 500 ml
- Metalni stativ
- Plamenik
- Tronožac
- Keramička mrežica
- Mufe

- Hvataljke
- Liebigovo hladilo
- Laboratorijska žlica
- Kamenčići za vrenje
- Aparatura po Ungeru

### **3.1.3. Instrumenti**

- Za vaganje je korištena Mettler Toledo XP 205 analitička vaga s točnošću odvage 0,01 mg.
- Za određivanje indeksa refrakcije macerata 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 pH macerata korišten je Mettler Toledo MP 220 pH-metar s razlučivošću mjerenja od 0,01. Za kalibraciju je korišten pufer pH 4.

### **3.1.4. Uzorci**

Uzorci macerata smilja komercijalno su nabavljeni s lokalnih OPG-ova. Tri uzorka macerata dobivena su od smilja uzgojenog u Dalmaciji (macerat dalmatinskog smilja 1,2,3) dok su druga tri uzorka macerata pripravljena od smilja uzgojenog u kontinentalnom dijelu Hrvatske (macerat kontinentalnog smilja 1,2,3). Macerati smilja pripremljeni su maceracijom u maslinovom ulju.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Kiselinski broj**

Kiselinski broj ( $I_A$ ) označava miligrame (mg) kalijevog hidroksida (KOH) koji su potrebni za neutralizaciju slobodnih kiselina u 1 gramu (g) tvari. Kiselinski broj određuje se titracijom propisane količine ispitivanog uzorka otopljenog u smjesi jednake količine 96%



etanola i petroletera (koji su prethodno neutralizirani s 0,1 M KOH ili 0,1 M NaOH) s 0,1 M kalijevim hidroksidom (KOH) ili 0,1 M natrijevim hidroksidom (NaOH) uz fenoltalein kao indikator. Određivanje kiselinskog broja koristi se za ispitivanje čistoće eteričnih ulja i za ispitivanje čistoće biljnih masnih ulja poput maslinovog ulja, čiji je macerat analiziran (Council of Europe, 2013). Eterična ulja većinom sadrže male količine slobodnih kiselina, a povećanje vrijednosti njihovog kiselinskog broja često je posljedica starenja eteričnih ulja, pri kojem dolazi do oksidacije i hidrolize estera. Isto je i sa masnim uljima koja, dok su svježija, imaju mali kiselinski broj budući da sadrže malo slobodnih masnih kiselina (Kuštrak, 2005).

### 3.2.1.1. Postupak mjerenja

U Erlenmayerovu tikvicu se uz pomoć mikropipete otpipetira 1,00 ml uzorka macerata smilja, a zatim se menzurom doda 30 ml 96% etanola. Potom se dodaju 2 kapi fenoltaleina koji služi kao indikator. Titracija se provodi s 0,1 M otopinom KOH do pojave ljubičaste boje koja se zadržava barem 15 sekundi. Iz utrošenog volumena 0,1 M otopine KOH ( $V_{\text{KOH}}$ ) u mililitrima te iz mase uzorka ( $m_{\text{uzorak}}$ ) u gramima izračuna se kiselinski broj ( $I_A$ ) prema izrazu:

$$I_A = 5,610 V_{\text{KOH}} / m_{\text{uzorak}}$$

Mase uzoraka ( $m_{\text{uzorak}}$ , g) volumena 1,00 ml izmjerene su na analitičkoj vagi. Postupak se ponovi za svih šest uzoraka macerata smilja.

### 3.2.2. Relativna gustoća (specifična težina)

Relativna gustoća ( $d_{t_2}^{t_1}$ ) je omjer mase određenog volumena ispitivane tvari pri temperaturi  $t_1$  i mase jednakog volumena vode pri temperaturi  $t_2$ . Uglavnom se izražava kao omjer mase određenog volumena ispitivane tvari pri 20°C i mase jednakog volumena vode pri 20 °C ili 4 °C odnosno kao  $d_{20}^{20}$  ili  $d_4^{20}$ , osim ukoliko nije drugačije propisano (Council of Europe, 2013). Budući da predstavlja omjer, relativna gustoća nema mjernu jedinicu. Relativna gustoća određuje se uz pomoć piknometra. Piknometar je staklena bočica koja ima čep koji dobro prijanja uz grlić boce i u kojem se nalazi kapilara. Kapilara treba biti do vrha ispunjena tekućinom kako bi se osiguralo da volumen tekućine kojoj se određuje gustoća odgovara volumenu naznačenom na piknometru. Budući da gustoća općenito ovisi o temperaturi, svaki piknometar je baždaren na određenu temperaturu, a uglavnom je to

temperatura od 20 °C na kojoj se najčešće provode mjerenja. To znači da će određena tekućina zauzimati volumen naznačen na piknometru pri temperaturi od 20 °C (Winterhalter i sur., 1990). Određivanje relativne gustoće koristi se za ispitivanje stupnja čistoće eteričnih ulja, biljnih masnih ulja (iako se za masna ulja, u novijim izdanjima farmakopeje, ono izostavlja) i tekućih ekstrakata poput macerata.. Vrijednost relativne gustoće važan je kriterij kakvoće eteričnih ulja i iznosi između 0,690 i 1,118 (Council of Europe, 2013; Kuštrak, 2005).

### 3.2.2.1. Postupak mjerenja

Volumen piknometra je poznat i iznosi 5 ml. Volumen piknometra odgovara volumenu uzorka macerata ( $V_{\text{macerat}}$ ) i volumenu vode ( $V_{\text{voda}}$ ). Na analitičkoj vagi izvažuje se čisti i suhi piknometar te se zabilježi njegova masa ( $p$ ). Zatim se piknometar napuni s uzorkom macerata smilja, pazeći pri tome da se kapilara u čepu piknometra u potpunosti ispunjuje s maceratom. Višak tekućine koja izađe iz kapilare piknometra obriše se pomoću filter papira kako bi piknometar bio potpuno suh prije vaganja. Prilikom punjenja i brisanja piknometra, piknometar treba držati za grlo kako ne bi došlo do zagrijavanja tekućine u piknometru te posljedične promjene volumena i gustoće tekućine. Zabilježi se izmjerena masa piknometra s maceratom ( $p_2$ ) u gramima. Gustoća uzorka macerata određuje se prema izrazu:

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

Nakon toga, piknometar se opere, zatim se ispere, osuši i napuni s destiliranom vodom. Vaganjem se dobiva masa piknometra s destiliranom vodom ( $p_1$ ) u gramima. Gustoća vode određuje se prema izrazu:

$$\rho_{\text{voda}} = (p_1 - p) / V_{\text{voda}}$$

Relativna gustoća uzorka macerata u odnosu na destiliranu vodu, pri temperaturi od 20 °C ( $d_{20}^{20}$ ), izračuna se prema izrazu:

$$d_{20}^{20} = \rho_{\text{macerat}} / \rho_{\text{voda}} = (p_2 - p) / (p_1 - p)$$

Postupak se ponovi za svih šest uzoraka macerata smilja.

### 3.2.3. Indeks refrakcije

Indeks loma nekog sredstva može se iskazati kao apsolutni i relativni indeks loma ili refrakcije. Apsolutni indeks loma nekog sredstva 1 ( $n_1$ ) jednak je omjeru sinusa kuta upada ( $\sin \alpha_0$ ) i sinusa kuta loma ( $\sin \alpha_1$ ) zrake svjetlosti pri prelasku svjetlosti iz vakuuma u sredstvo 1, odnosno jednak je omjeru brzine svjetlosti u vakuumu ( $c_0$ ) i brzine svjetlosti u sredstvu 1 ( $c_1$ ) prema izrazu:

$$n_1 = ( \sin \alpha_0 / \sin \alpha_1 ) = ( c_0 / c_1 )$$

Relativni indeks loma ( $n_{1,2}$ ) sredstva 2 u odnosu na sredstvo 1 jednak je omjeru sinusa kuta upada ( $\sin \alpha_1$ ) i sinusa kuta loma ( $\sin \alpha_2$ ) zrake svjetlosti pri prelasku zrake svjetlosti iz sredstva 1 (apsolutnog indeksa  $n_1$ ) u sredstvo 2 (apsolutnog indeksa  $n_2$ ), odnosno omjeru brzine svjetlosti u sredstvu 1 ( $v_1$ ) i u sredstvu 2 ( $v_2$ ) prema izrazu:

$$n_{1,2} = ( \sin \alpha_1 / \sin \alpha_2 ) = ( v_1 / v_2 ) = ( n_2 / n_1 )$$

Ipak, najčešće se izražava relativni indeks loma nekog sredstva u odnosu na zrak, pa je tako prema farmakopeji, indeks loma ili refrakcije ( $n_{\lambda}^t$ ) nekog sredstva u odnosu na zrak jednak je omjeru sinusa kuta upada zrake svjetlosti i sinusa kuta loma zrake svjetlosti pri prelasku zrake svjetlosti iz zraka u dani medij. Budući da ovisi o temperaturi i valnoj duljini svjetlosti, standardni uvjeti pri kojima se mjeri indeks refrakcije ( $n_D^{20}$ ) su temperatura od  $20 \pm 0,5$  °C i valna duljina  $D$  – linije natrijevog spektra ( $\lambda = 589,3$  nm), osim ukoliko nije drugačije propisano (Council of Europe, 2013, Winterhalter i sur., 1990).

Pojava loma svjetlosti, odnosno promjene smjera širenja svjetlosti pri prelasku svjetlosti iz jednog u drugo sredstvo, posljedica je različite brzine svjetlosti u tim dvama sredstvima. Pri prijelazu svjetlosti iz sredstva manjeg indeksa loma (optički rjeđeg sredstva) i veće brzine širenja u sredstvo većeg indeksa loma (optički gušće sredstvo) i manje brzine širenja svjetlosti, kut upada je veći od kuta loma odnosno svjetlost se lomi prema okomici na granicu ta dva sredstva, dok je pri prijelazu svjetlosti iz sredstva većeg u sredstvo manjeg indeksa loma obrnuto. Uz lom, pri prijelazu svjetlosti iz jednog u drugo sredstvo, dolazi i od parcijalne (djelomične) refleksije svjetlosti. Udio parcijalno-reflektirane svjetlosti ovisi o indeksima loma oba sredstva te o kutu upada. Što je kut upada veći, veći je i intenzitet parcijalno reflektirane svjetlosti (Winterhalter i sur., 1990).

Pri prijelazu svjetlosti iz optički gušćeg sredstva indeksa loma  $n_1$  u optički rjeđe sredstvo indeksa loma  $n_2$  uz parcijalnu može dolaziti i do totalne refleksije. Tako za kutove upada zrake svjetlosti koji su manji od graničnog kuta ( $\alpha < \alpha_g$ ) dolazi do loma svjetlosti

(prelaska u drugo u sredstvo i promjene smjera širenja) i do parcijalne (djelomične) refleksije koja je slabijeg intenziteta, dok za kutove upada koji su jednaki ili veći od graničnog kuta ( $\alpha \geq \alpha_g$ ) dolazi do totalne refleksije svjetlosti koja je puno jačeg intenziteta. Granični kut ( $\alpha_g$ ) je kut upada za koji kut loma iznosi  $90^\circ$  odnosno kut za koji svjetlost ne prelazi u drugo sredstvo nego se potpuno reflektira. Granični kut je manji što je razlika u indeksu loma dva sredstva veća (Winterhalter i sur., 1990).

Uređaj koji mjeri granični kut totalne refleksije te tako omogućuje određivanje indeksa refrakcije naziva se refraktometar. Rad refraktometra temelji se na fizikalnom principu loma svjetlosti odnosno na Snellovom zakonu prema kojem se odnos sinusa kuta upada ( $\sin \alpha_1$ ) i sinusa kuta loma ( $\sin \alpha_2$ ) zrake svjetlosti koja prelazi iz sredstva 1 indeksa loma  $n_1$  u sredstvo 2 indeksa loma  $n_2$  iskazuje se kao:

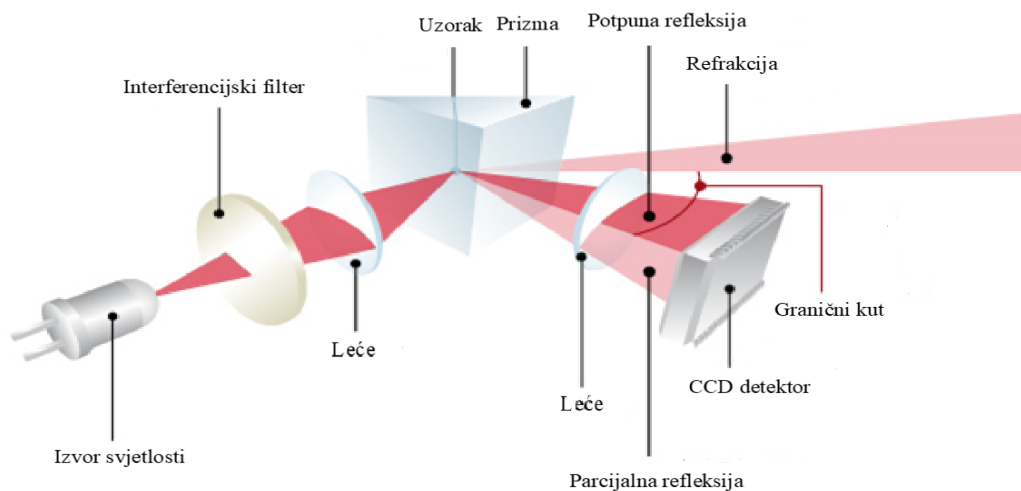
$$\sin \alpha_1 / \sin \alpha_2 = n_2 / n_1$$

Budući da za granični kut upada ( $\alpha_g$ ) kut loma iznosi  $90^\circ$ , određivanjem graničnog kuta uz poznati indeks refrakcije sredstva 1 ( $n_1$ ) može se izračunati nepoznati indeks refrakcije sredstva 2 ( $n_2$ ) prema izrazu:

$$\sin \alpha_g / \sin 90^\circ = n_2 / n_1$$

$$n_2 = n_1 \sin \alpha_g$$

Refraktometar se sastoji od izvora svjetlosti, interferencijskog filtera, leća, prizme i CCD detektora (*eng. Charge-coupled device*) (slika 6). Izvor emitira svjetlost koja prolazi kroz interferencijski filter, koji osigurava svjetlost točno određene valne duljine, što je važno zato jer je indeks refrakcije nekog sredstva različit za svjetlost različitih valnih duljina. Zrake svjetlosti se zatim uz pomoć konvergentnih leća usmjeravaju prema prizmi poznatog indeksa refrakcije, koja je u kontaktu s ispitivanom tekućinom kojoj se određuju nepoznati indeks refrakcije. Na granicu ta dva sredstva zrake svjetlosti dolaze pod različitim upadnim kutovima pri čemu će se zrake koje upadaju pod kutom manjim od graničnog kuta djelomično lomiti, a djelomično reflektirati, dok će se zrake koje padaju pod kutom većim od graničnog kuta potpuno reflektirati. CCD detektor mjeri intenzitet reflektirane svjetlosti i na taj način određuje granični kut totalne refleksije. Budući da granični kut ovisi o indeksima loma prizme i ispitivane tekućine, uz pomoć poznatog indeksa refrakcije prizme određuje se indeks refrakcije ispitivane tekućine. Korištenje CCD detektora omogućuje točnije i pouzdanije mjerenje indeksa refrakcije. Osim valne duljine, važno je kontrolirati i stabilizirati temperaturu tijekom procesa mjerenja indeksa refrakcije budući da i temperatura utječe na izmjereni indeks refrakcije (<https://wiki.anton-paar.com>).



Slika 6. Shematski prikaz dijelova refraktometra (preuzeto s <https://wiki.anton-paar.com>)

Određivanje indeksa refrakcije koristi se u svrhu ispitivanja čistoće i procjene kvalitete eteričnih ulja i masnih ulja. Općenito, indeks refrakcije eteričnih ulja kreće se između 1,450 i 1,590, a indeks refrakcije masnih ulja iznosi između 1,45 i 1,49 (Kuštrak, 2005).

### 3.2.3.1. Postupak mjerenja

Refraktometar se prije mjerenja indeksa refrakcije ispitivanih uzoraka mora kalibrirati uz redestiliranu vodu tako što se redestilirana voda stavlja na mjernu prizmu te se pričekava kako bi se očitao rezultat. Izmjereni indeks refrakcije redestilirane vode iznosi 1,3329. Mjerna prizma se zatim obriše uz pomoć vate kako bi se s nje uklonila redestilirana voda i na mjernu prizmu se stavlja uzorak macerata smilja kojemu se određuje nepoznati indeks refrakcije. Na temelju izmjerenog graničnog kuta totalne refleksije ( $\alpha_g$ ) i poznatog indeksa loma prizme ( $n_{prizma}$ ) dobiva se nepoznati indeks loma uzorka macerata smilja ( $n_{macerat}$ ) prema izrazu:

$$n_{macerat} = n_{prizma} \sin \alpha_g .$$

Mjerenje se izvodi pri standardnim uvjetima, temperaturi od  $20 \pm 0,5$  °C i pri valnoj duljini svjetlosti D – linije natrijevog spektra ( $\lambda = 589,3$  nm) budući da izmjereni indeks refrakcije ovisi o temperaturi i valnoj duljini. Između dva mjerenja mjerna prizma se obriše pomoću vate namočene s heksanom. Postupak se ponovi za svih šest uzoraka macerata smilja. Na kraju mjerenja mjerna prizma se očisti s 96% etanolom.

### 3.2.4. pH-vrijednost

pH vrijednost predstavlja negativni logaritam aktiviteta vodikovih ( $H^+$ ) iona prema izrazu:

$$pH = -\log a(H^+).$$

pH vrijednost otopine određuje se potenciometrijski, mjerenjem razlike potencijala između dvije elektrode uronjene u ispitivanu otopinu, pri čemu je jedna indikatorska elektroda koja je osjetljiva na vodikove ione (obično staklena elektroda), a druga je referentna elektroda (obično zasićena kalomel elektroda) (Council of Europe, 2013).

Referentna elektroda je elektroda čiji je potencijal  $E_{ref}$  stalan, poznat i potpuno neovisan o aktivitetu iona analita i drugih iona prisutnih u ispitivanoj otopini. Primjeri referentnih elektroda su zasićena kalomel elektroda i srebro/srebrov klorid elektroda. Zasićena kalomel elektroda sastoji se od unutrašnje cijevi ispunjene smjesom žive i živina (I) klorida ( $Hg/Hg_2Cl_2$ ) u zasićenoj otopini kalijevog klorida (KCl), te vanjske cijevi ispunjene sa zasićenom otopinom kalijevog klorida (KCl) koja je preko malog otvora povezana s unutarnjom cijevi, a preko porozne membrane s ispitivanom otopinom. Elektrodni potencijal ove elektrode iznosi 0,244 V pri temperaturi od 25 °C. Srebro/srebrov klorid elektroda sastoji se od žice srebra (Ag žice) uronjene u zasićenu otopinu kalijevog klorida (KCl) i srebrovog klorida ( $AgNO_3$ ) koja je preko porozne membrane povezana s ispitivanom otopinom, a potencijal ove elektrode iznosi 0,199 V pri temperaturi od 25 °C (Skoog i sur., 1999).

Indikatorska elektroda je elektroda čiji potencijal  $E_{ind}$  ovisi o aktivitetu iona analita ili skupine iona analita. Postoji nekoliko indikatorskih elektroda koje su vrlo selektivne za određene ione. Tako je primjerice, staklena elektroda osjetljiva i selektivna prema  $H^+$  ionima. Staklena elektroda sastoji se od staklene cijevi debelih stijenki, ispunjene s 0,1 M otopinom klorovodične kiseline (HCl) zasićene sa srebrovim kloridom (AgCl), u koju je uronjena srebrna žica (Ag žica), koja predstavlja unutarnju referentnu elektrodu, koja nije osjetljiva na promjene aktiviteta  $H^+$  iona. Na kraju staklene cijevi smještena je tanka staklena membrana osjetljiva na promjene aktiviteta  $H^+$  iona odnosno na promjene pH otopine (Skoog i sur., 1999).

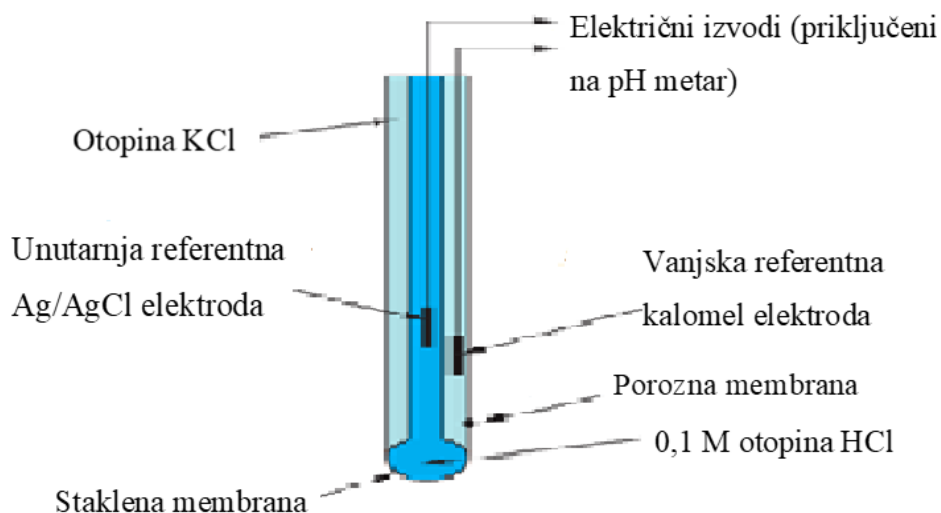
Staklena membrana sastoji se od mreže  $SiO_4^{4-}$  skupina u kojoj je svaki atom silicija vezan na četiri atoma kisika, a svaki atom kisik na dva atoma silicija. Atomi kisika unutar te mreže koji nisu vezani na dva atoma silicija posjeduju negativni naboj, na koji se mogu ionski vezati kationi poput  $Na^+$  iona (<https://chem.libretexts.org>). Kako bi bila osjetljiva na promjene pH važno je da površina staklene membrane s obje strane bude stalno hidratizirana (Skoog i

sur., 1999) zato jer će se tada na njezinoj površini, s obje strane, stvarati tanak sloj hidratiziranog gela u koji mogu migrirati  $H^+$  ioni. Budući da je staklena membrana s unutarnje strane u kontaktu s 0,1 M otopinom klorovodične kiseline (HCl), a s vanjske strane je uronjena u ispitivanu otopinu kojoj se određuje pH,  $H^+$  ioni iz unutarnje referentne i vanjske ispitivane otopine migrirat će u sloj gela staklene membrane i ionski se vezati za negativne naboje, dok će  $Na^+$  ioni iz staklene membrane difundirati u otopinu. Na taj način, na unutarnjoj strani staklene membrane uspostaviti će se ravnoteža izmjene iona koja će ovisiti o aktivitetu  $H^+$  u unutrašnjoj referentnoj otopini, dok će se na vanjskoj strani membrane uspostaviti ravnoteža izmjene iona koja će ovisiti o aktivitetu  $H^+$  iona u vanjskoj ispitivanoj otopini. Što je veći aktivitet  $H^+$  iona u otopini, to će se više  $H^+$  iona ionski vezati u sloju gela staklene membrane. Razlika u aktivitetima  $H^+$  iona s obje strane staklene membrane dovest će do neravnoteže u površinskom naboju između hidratiziranih slojeva što će rezultirati membranskim potencijalom koji ovisi o pH i može se opisati Nernstovom jednačbom:

$$E_{\text{membrana}} = E_{\text{unutarnji}} - E_{\text{vanjski}} = 0,0592 \log [(a_{\text{unutarnji}}) / (a_{\text{vanjski}})].$$

$E_{\text{unutarnji}}$  i  $E_{\text{vanjski}}$  su površinski potencijali s unutarnje i vanjske strane membrane izraženi u voltima, a  $a_{\text{unutarnji}}$  i  $a_{\text{vanjski}}$  predstavljaju aktivitet  $H^+$  iona u unutarnjoj referentnoj i vanjskoj ispitivanoj otopini. Teoretski se potencijal staklene membrane mijenja za 59,2 mV za svaku jedinicu promjene pH otopine. Pri vrlo visokom pH ( $pH > 10$ ) većina staklenih membrana postaje osjetljiva i na  $H^+$  i  $Na^+$  ione pa je izmjereni pH niži od stvarnog pH, dok pri niskom pH ( $pH < 1$ ) staklena membrana podložna zasićenju s  $H^+$  ionima pa je izmjereni pH viši od stvarnog pH (<https://chem.libretexts.org>).

Danas se najčešće za mjerenje pH koristi kombinirana pH elektroda (slika 7) koja je sastavljena od staklene i referentne zasićene kalomel elektrode smještene u istom kućištu (<https://chem.libretexts.org>). Kombinirana pH elektroda uroni se u ispitivanu otopinu, a preko vanjske referentne kalomel elektrode i unutarnje referentne srebro/srebrov klorid elektrode spoji se na priključke uređaja za mjerenje potencijala. Razlika potencijala mjeri se uz pomoć voltmetra koji mora imati nekoliko desetaka puta veći otpor od otpora članka kojemu se mjeri potencijal kako bi se potencijal mogao točno mjeriti. Takvi voltmetri s velikim unutarnjim otporom od  $10^{11}$  do  $10^{12} \Omega$  nazivaju se pH metrima. Očitavanje rezultata s pH metra može biti digitalno ili analogno, a točnost iznosi najmanje 0,05 pH jedinica (Skoog i sur., 1999).



Slika 7. Shematski prikaz kombinirane pH elektrode (preuzeto s <https://chem.libretexts.org>)

Prije mjerenje pH ispitivane otopine, potrebno je provesti kalibraciju uz pomoć standardnih otopina pufera poznatih pH vrijednosti. pH ispitivane otopine mjeri se u odnosu na pH standardne otopine prema izrazu:

$$\text{pH} = \text{pH}_s - ((E - E_s) / k).$$

$\text{pH}_s$  je pH vrijednost standardne otopine,  $E$  je potencijal ispitivane otopine kojoj se određuje pH izražen u voltima (V),  $E_s$  je potencijal standardne otopine poznatog pH izražen u voltima (V), a  $k$  je konstanta koja označava promjenu potencijala po jedinici promjene pH izraženu u voltima (V). Budući da konstanta  $k$  ovisi o temperaturi i pH vrijednost se mijenja s promjenom temperature pa se mjerenja provode pri temperaturi između 20 i 25 ° C, osim ukoliko nije drugačije propisano (Council of Europe, 2013).

#### 3.2.4.1. Postupak mjerenja

pH elektroda čuva se uronjena u otopinu kalijevog klorida (KCl) i prije mjerenja pH vrijednosti ispitivanih uzoraka mora se kalibrirati uz pomoć standardnih otopina poznatog pH. Kalibracija se provodi kako bi se na temelju izmjerenog potencijala standardnih otopina ( $E_s$ ) i njihovog poznatog pH ( $\text{pH}_s$ ) mogao odrediti nepoznati pH uzoraka macerata ( $\text{pH}_{\text{macerat}}$ ) smilja mjerenjem njihovog potencijala ( $E_{\text{macerat}}$ ) prema izrazu:

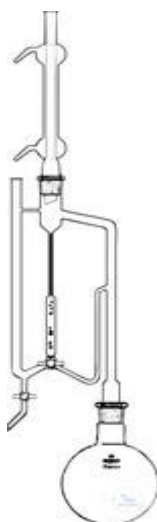
$$\text{pH}_{\text{macerat}} = \text{pH}_s - ((E_{\text{macerat}} - E_s) / k).$$



pH elektroda najprije se ispere s redestiliranom vodom i pažljivo se obriše sa staničevinom, a zatim se uroni u standardnu puferku otopinu pH 7,00 (kalijev dihidrogenfosfat / natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat). Pričeka se nekoliko sekundi kako bi se potencijal stabilizirao i pohranio. Elektroda se potom ponovno ispere, obriše i postupak mjerenja se ponovi sa standardnom puferkom otopinom pH 4,00 (limunska kiselina / natrijev hidroksid / klorovodična kiselina). Nakon kalibracije, elektroda se ponovno ispere, obriše i uroni u uzorak macerata nepoznatog pH. Opet je potrebno pričekati kako bi se potencijal membrane stabilizirao i kako bi se očitala točna pH vrijednost uzorka macerata. Mjerenja se izvodi pri temperaturi od 20 °C. Između dva mjerenja pH uzoraka macerata elektroda se ispere s 96% etanolom i redestiliranom vodom. Postupak se ponovi za svih šest uzoraka macerata smilja. Na kraju mjerenja pH elektroda se ponovno uroni u otopinu KCl.

### 3.2.5. Sadržaj eteričnog ulja

Sadržaj eteričnog ulja u biljnim drogama određuje se metodom destilacije (slika 8), a određivanje se temelji na svojstvu hlapljivosti eteričnih ulja s vodenim parama. Smjesa eteričnog ulja i vode vriti će kada se tlak pare smjese (koji je prema Daltonovom zakonu jednak zbroju parcijalnih tlakova plinova koji čine smjesu, pod uvjetom da plinovi međusobno ne reagiraju) izjednači sa atmosferskim tlakom, i pri temperaturi koja je niža od temperature vrenja one komponente smjese koja ima najniže vrelište. Kako je u ovom slučaju ta komponenta voda, do vrenja će dolaziti ispod 100 °C (Kuštrak. 2005; Kovač-Bešović , 2001).



Shematski prikaz aparature za određivanje eteričnih ulja po Ungeru

(preuzeto s <https://pmi-lab.odoo.com>)

Sam postupak destilacije može se provesti na nekoliko načina, ovisno o svojstvima eteričnog ulja, o njegovoj relativnoj gustoći i kemijskom sastavu. Kod volumetrijskog određivanja sadržaja eteričnih ulja lakših od vode navedena količina propisane droge pomiješa se u tikvici za destilaciju sa 400 ml vode i zagrijava se preko keramičke mrežice do ključanja, a potom se destilira 2,5 sata. Nakon što destilacija završi, očita se volumen eteričnog ulja i izračuna se njegov postotak prema izrazu:

$$\text{Vol \% eteričnog ulja} = 100 (b / a)$$

pri čemu je b volumen eteričnog ulja u mililitrima, dok je a odvaga droge u gramima. Za razliku od eteričnih ulja lakših od vode, kod volumetrijsko određivanje eteričnih ulja težih od vode najprije destilira smjesa 1 ml ksilena i 400 ml vode kako bi se odredio volumen ksilena u graduiranoj cijevi za mjerenje. Nakon toga provodi se destilacija smjese propisane količine biljne droge i vode kako bi se odredio volumen eteričnog ulja otopljenog u ksilenu. Iz razlike volumena eteričnog ulja otopljenog u ksilenu i volumena predestiliranog ksilena, izračuna se volumen eteričnog ulja u mililitrima u 100 grama droge (Kovač-Bešović , 2001).

Cvijet smilja sadrži vrlo malu količinu eteričnog ulja pa je za proizvodnju male količine eteričnog ulja potrebno ubrati veliku količinu cvjetova. Od približno 750 kg smilja može se dobiti svega 1 kg destilata eteričnog ulja. Osim toga, za dobivanje eteričnog ulja, biljka u cvatu se mora destilirati vodenom parom u roku 24 h nakon branja jer u slučaju duljeg stajanja može doći do truljenja i smanjenja kvalitete eteričnog ulja. (Pohajda i sur., 2015; Rajić i sur., 2015).

### **3.2.5.1. Postupak mjerenja**

Sadržaj eteričnog ulja u maceratu smilja određuje se metodom vodene destilacije po Ungeru. Postupak se provodi tako da se u okruglu tikvicu s ravnim dnom od 500 ml uz pomoć graduirane pipete doda određeni volumen uzorka macerata smilja. Zatim se u tikvicu menzurom dolije oko 160 ml destilirane vode (1/3 volumena tikvice) te se dodaju dvije žličice natrijevog klorida (NaCl) i kamenčići za vrenje. Uloga NaCl je povišenje vrelišta vode kako prilikom zagrijavanja ne bi sva voda isparila, a uloga kamenčića za vrenje je osiguravanje ravnomjernog zagrijavanja. Napunjena tikvica se potom spoji s aparaturom po Ungeru. Upali se plamenik i otvori se voda koja prolazi kroz hladilo. Zagrijavanjem tikvice dolazi do isparavanja eteričnog ulja iz uzorka macerata te do isparavanja vode. Pare eteričnog ulja i vode se zatim kondenziraju u hladilu, a nastali kondenzat se skuplja u graduiranoj cijevi.

Eterično ulje smilja zadržava se u gornjem dijelu graduirane cijevi, iznad vode, budući da ima gustoću manju od gustoće vode. Voda se skuplja ispod sloja eteričnog ulja i slijeva se natrag u tikvicu. Destilacija se provodi 90 min. Nakon 10 minuta od završetka destilacije očita se volumen sakupljenog eteričnog ulja tako što se broj crtica koje ono zauzima pomnoži s volumenom od 20 mikrolitara ( $\mu\text{l}$ ) jer razmak između dvije crtice iznosi 20  $\mu\text{l}$ . Postotak (% v/v) eteričnog ulja u uzorku macerata smilja izračuna se prema iz dobivenog volumena eteričnog ulja ( $V_{\text{eterično ulje}}$ ) u mililitrima i uzetog volumena uzorka macerata ( $V_{\text{macerat}}$ ) u mililitrima prema izrazu:

$$\% \text{ eteričnog ulja} = 100 (V_{\text{eterično ulje}} / V_{\text{macerat}})$$

Postupak se ponovi za svih šest uzoraka macerata smilja.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Određivanje kiselinskog broja

Kiselinski broj ( $I_A$ ) predstavlja miligrame (mg) kalijevo hidroksoida (KOH) koji su potrebni za neutralizaciju slobodnih kiselina u 1 gramu (g) tvari. Određivanje vrijednosti kiselinskog broja koristi se u ispitivanju čistoće te na taj način u procjeni kakvoće eteričnih i masnih ulja (Council of Europe, 2013).

Kiselinski brojevi uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja određeni su titracijom s 0,1 M KOH uz fenolftalein kao indikator prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Kiselinski broj uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja

Uzorak macerata	Kiselinski broj (mg KOH/g)
Macerat dalmatinskog smilja 1	2,84
Macerat dalmatinskog smilja 2	2,88
Macerat dalmatinskog smilja 3	1,80
Macerat kontinentalnog smilja 1	1,75
Macerat kontinentalnog smilja 2	1,71
Macerat kontinentalnog smilja 3	2,06

Iz dobivenih rezultata vidi se kako nema značajnih razlika u vrijednostima kiselinskog broja između uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja te se one kreću između 1,71 i 2,88 mg KOH/g. Najveću vrijednost kiselinskog broja ima uzorak dalmatinskog macerata smilja 2, dok najmanju vrijednost ima uzorak kontinentalnog macerata smilja 2. Ovakvi rezultati potvrđuju da na vrijednosti kiselinskog broja prvenstveno utječu starost uzoraka i način njihovog skladištenja, a ne različiti klimatski i geografski uvjeti kojima je smilje, čiji je macerat analiziran, bilo izloženo. Dobiveni rezultati uspoređeni su sa zahtjevom iz Europske farmakopeje za vrijednost kiselinskog broja maslinovog ulja (kiselinski broj ne smije biti veći od 2,0 određivano na 5,0 g uzorka (Council of Europe, 2013), odnosno veći od 0,4 određivano na 1,0 g uzorka) budući da podatci o vrijednostima kiselinskog broja eteričnog ulja smilja i macerata smilja nisu dostupni u literaturi. Kada bi se uspoređivale dobivene vrijednosti kiselinskog broja uzoraka macerata smilja sa zahtjevom iz farmakopeje za maslinovo ulje, moglo bi se zaključiti kako maslinovo ulje u uzorcima macerata smilja ne odgovara zahtjevima farmakopeje ( $\leq 0,4$ ). Međutim, treba uzeti u obzir da vrijednosti

kiselinskog broja vjerojatno pridonose i slobodne kiseline prisutne u smilju ekstrahiranom u maceratu i slobodne masne kiseline prisutne u maslinovom ulju. Mastelić i sur. tako navode kako su slobodne masne kiseline ((*E*)-2-metil-2-butenska, oktanska, dekanska, undekanska, dodekanska i tetradekanska kiselina) prirodno prisutne u eteričnom ulju smilja u količini od 3,7%, a još veći broj njih pronađen je nakon hidrolize estera prisutnih u eteričnom ulju s KOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (octena, propanska, izobutanska, izovalerijanska, dekanska i dodekanska kiselina) (Mastelić i sur., 2008). Također, maslinovo ulje sadrži smjesu triglicerida oleinske, palmitinske, linolne, a u manjim količinama i miristinske, stearinske i arahidonske kiseline (Kuštrak, 2005) čijom hidrolizom uslijed starenja i nepravilnog skladištenja dolazi do oslobađanja masnih kiselina, koje zatim uzrokuju povećanje vrijednosti kiselinskog broja.

#### 4.2. Određivanje relativne gustoće

Relativna gustoća ( $d_{t_2}^{t_1}$ ) predstavlja omjer mase određenog volumena ispitivane tvari pri temperaturi  $t_1$  i mase jednakog volumena vode pri temperaturi  $t_2$ , a najčešće se mjerenje provodi pri temperaturi ispitivane tvari od 20°C i pri temperaturi vode od 20 °C ili 4 °C. Mjerenje relativne gustoće koristi se za ispitivanje čistoće eteričnih ulja, biljnih masnih ulja i tekućih ekstrakata poput macerata (Council of Europe, 2013; Kuštrak, 2005).

Relativne gustoće uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja određene su uz pomoć piknometra pri temperaturi od 20 °C prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Relativna gustoća uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja pri 20 °C

Uzorak macerata	Relativna gustoća
Macerat dalmatinskog smilja 1	0,920
Macerat dalmatinskog smilja 2	0,905
Macerat dalmatinskog smilja 3	0,965
Macerat kontinentalnog smilja 1	0,931
Macerat kontinentalnog smilja 2	0,922
Macerat kontinentalnog smilja 3	0,988

Dobiveni rezultati pokazuju kako se vrijednosti relativne gustoće uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja kreću u rasponu od 0,905 do 0,988 odnosno da svi uzorci macerata smilja imaju gustoću manju od gustoće vode. Najmanju vrijednost relativne gustoće ima uzorak dalmatinskog macerata smilja 2, dok najveću vrijednost ima uzorak kontinentalnog macerata smilja 3. Na temelju nepostojanja većih razlika između relativne gustoće uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja, može se zaključiti kako nema značajnijeg utjecaja klimatskih čimbenika kojima je smilje bilo izloženo i geografskog položaja na kojem je raslo na vrijednosti relativne gustoće uzoraka. Usporedbom dobivenih vrijednosti relativne gustoće uzoraka s podacima koji su dostupni u literaturi, a to su relativna gustoća eteričnog ulja smilja koja pri 20 °C iznosi između 0,875 i 0,925 (<https://www.nhrorganiccoils.com>) te relativna gustoća maslinovog ulja koja pri 20 °C iznosi između 0,910 i 0,916 (CODEX STAN 33-81), vidi se kako su dobivene vrijednosti bliske referentnim vrijednostima. Ipak, uzorci macerata dalmatinskog smilja 3 te kontinentalnog smilja 1 i 3 imaju relativnu gustoću malo veću od relativne gustoće samog eteričnog ulja smilja, a svi uzorci osim macerata dalmatinskog smilja 2 imaju nešto veću relativnu gustoću od maslinovog ulja, vjerojatno zato jer macerat u svom sastavu sadrži maslinovo ulje kao ekstrakcijsko sredstvo i ekstrahirane sastavnice smilja među kojima i eterično ulje smilja.

#### 4.3. Određivanje indeksa refrakcije

Indeks loma ili refrakcije ( $n_{\lambda}$ ) nekog sredstva u odnosu na zrak jednak je omjeru sinusa kuta upada zrake svjetlosti u zraku i sinusa kuta loma zrake svjetlosti tom sredstvu, a najčešće se mjeri pri standardnim uvjetima, temperaturi od  $20 \pm 0,5$  °C i valnoj duljini D – linije natrijevog spektra od 589,3 nm, osim ukoliko nije drugačije propisano (Council of Europe, 2013). Izmjereni indeksi refrakcije koriste se u procjeni čistoće i kvalitete eteričnih ulja i masnih ulja (Kuštrak, 2005).

Indeksi refrakcije uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja određeni su uz pomoć automatskog refraktometra pri standardnim uvjetima (temperatura od 20 °C i valna duljina od 589,3 nm) i prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Indeksi refrakcije uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja pri 20 °C i valnoj duljini 589,3 nm

Uzorak macerata	Indeks refrakcije
Macerat dalmatinskog smilja 1	1,4740
Macerat dalmatinskog smilja 2	1,4739
Macerat dalmatinskog smilja 3	1,4743
Macerat kontinentalnog smilja 1	1,4693
Macerat kontinentalnog smilja 2	1,4691
Macerat kontinentalnog smilja 3	1,4742

S obzirom na dobivene vrijednosti indeksa refrakcije, može se zaključiti kako se uzorci macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja ne razlikuju međusobno više nego uzorci macerata dalmatinskog smilja međusobno odnosno uzorci macerata kontinentalnog smilja međusobno, te da na vrijednost indeksa refrakcije značajno ne utječe geografsko podrijetlo smilja čiji je macerat analiziran. Dobivene vrijednosti indeksa refrakcije kreću se između 1,4691 (najmanji izmjereni indeks refrakcije koji pripada uzorku macerata kontinentalnog smilja 2) i 1,4743 (najveći izmjereni indeks refrakcije koji pripada uzorku macerata dalmatinskog smilja 3). Kako u literaturi nisu pronađeni podatci o vrijednostima indeksa refrakcije macerata smilja, izmjerene vrijednosti uspoređene su s vrijednostima dostupnima u literaturi, a to su vrijednost indeksa refrakcije eteričnog ulja smilja i vrijednost indeksa refrakcije maslinovog ulja. Indeks refrakcije eteričnog ulja smilja pri 20 °C iznosi od 1,470 do 1,490 (<https://www.nhrorganicoils.com>), dok indeks refrakcije maslinovog ulja pri istoj temperaturi iznosi između 1,4677 i 1,4705 (CODEX STAN 33-81). Dobiveni indeksi refrakcije nekih uzoraka macerata smilja malo su veći od vrijednosti propisanih za indeks refrakcije maslinovog ulja, ali svi uzorci, osim uzoraka macerata kontinentalnog smilja 1 i 2, se nalaze se unutar referentnog raspona za eterično ulje smilja. Pri analizi vrijednosti indeksa refrakcije, važno je znati da indeks refrakcije eteričnih ulja nije karakteristična vrijednost za pojedino eterično ulje, već je karakteristična vrijednost za pojedine sastavnice eteričnog ulja i da na njegov iznos utječe kemijski sastav eteričnih ulja (Kuštrak, 2005). Tome u prilog ide i to da se indeks refrakcije eteričnih ulja izražava kao zbroj indeksa refrakcije pojedinih sastavnica eteričnog ulja pomnoženih s njihovim molarnim udjelom (Ospina i sur, 2016). Također, i indeks refrakcije masnih ulja, pa tako i maslinovog ulja, ovisi o kemijskom sastavu ulja odnosno o udjelu nezasićenih masnih kiselina. Općenito, trigliceridi u masnim uljima



imaju veći indeks refrakcije od odgovarajućih masnih kiselina (Kuštrak, 2005). Prema tome, može se pretpostaviti i da indeks refrakcije macerata smilja u maslinovom ulju ponajprije ovisi o sastavu maslinovog ulja i o ekstrahiranim sastavnicama smilja.

#### 4.4. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost predstavlja negativni logaritam aktiviteta vodikovih ( $H^+$ ) iona prema izrazu:

$$pH = -\log a(H^+).$$

Mjerenje pH vrijednost ispitivanih uzoraka koristi se za određivanje njihove kiselosti ili lužnatosti odnosno za određivanje prisutnosti kiselih i lužnatih onečišćenja u uzorcima. Kisela i lužnata onečišćenja mogu, između ostalog, potjecati od razgradnje sastavnica uzorka zbog čega se određivanje pH vrijednosti koristi u ispitivanju čistoće uzoraka (Council of Europe, 2013).

pH vrijednosti uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja određene su uz pomoć pH metra pri temperaturi od 20 °C prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. pH vrijednosti uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja pri 20 °C

Uzorak macerata	pH vrijednost
Macerat dalmatinskog smilja 1	4,74
Macerat dalmatinskog smilja 2	4,70
Macerat dalmatinskog smilja 3	4,40
Macerat kontinentalnog smilja 1	4,80
Macerat kontinentalnog smilja 2	5,25
Macerat kontinentalnog smilja 3	4,96

Izmjerene pH vrijednosti uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja iznose između 4,40 i 5,25, pri čemu najmanju pH vrijednost ima uzorak dalmatinskog macerata smilja 3, a najveću pH vrijednost ima kontinentalni macerat smilja 2. Svi uzorci macerata pokazuju vrijednosti pH u kiselom području. Srednja pH vrijednost uzoraka macerata dalmatinskog smilja iznosi 4,61 i nešto je niža od srednje pH vrijednosti uzoraka macerata kontinentalnog smilja koja iznosi 5,00. Međutim, takve razlike u izmjerenim pH

vrijednostima između uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja nisu velike te iznose manje od jedne pH jedinice. Osim sastavnica smilja ekstrahiranih maslinovim uljem i sami medij za maceraciju odnosno sastavnice prisutne u maslinovom ulju vjerojatno utječu na pH vrijednosti uzoraka. Ipak, dobivene vrijednosti nije moguće usporediti s literaturnim podacima budući da u literaturi nisu pronađeni podaci o pH vrijednostima macerata smilja.

#### 4.5. Određivanje sadržaja eteričnog ulja

Sadržaj eteričnog ulja u biljnim drogama određuje se metodom destilacije, a određivanje se temelji na svojstvu hlapljivosti eteričnih ulja s vodenim parama. (Kuštrak, 2005; Kovač-Bešović, 2001)

Sadržaj eteričnog ulja (%) u uzorcima macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja određen je metodom vodene destilacije po Ungeru prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Sadržaj eteričnog ulja (%) u uzorcima macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja

Uzorak macerata	Sadržaj eteričnog ulja (%)
Macerat dalmatinskog smilja 1	<0,24
Macerat dalmatinskog smilja 2	0,51
Macerat dalmatinskog smilja 3	<0,10
Macerat kontinentalnog smilja 1	<0,08
Macerat kontinentalnog smilja 2	<0,08
Macerat kontinentalnog smilja 3	<0,14

Sadržaj eteričnog ulja u analiziranim uzorcima macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja iznosi između <0,08 i 0,51%. Dobiveni rezultati pokazuju kako se u maceratu smilja nalaze određene količine eteričnog ulja smilja koje su postupkom maceracije prešle u biljno ulje, što je i očekivano budući da su eterična ulja smjese hlapljivih, lipofilnih spojeva, koje se dobro otapaju u lipofilnim otapalima poput masnih ulja (Kuštrak, 2005). Pri tome, uzorci macerata dalmatinskog smilja imaju veću srednju vrijednost sadržaja eteričnog ulja (0,28%) u usporedbi s uzorcima macerata kontinentalnog smilja (0,10). Od svih uzoraka, najveći sadržaj eteričnog ulja ima macerat dalmatinskog smilja 2 (0,51%), vjerojatno zbog

sadržaja eteričnog ulja ružmarina koji je naveden u sastavu macerata, a najmanji sadržaj eteričnog ulja imaju macerati kontinentalnog smilja 1 i 2 ( $<0,08\%$ ). Ovakve razlike u sadržaju eteričnog ulja između uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja mogu biti i posljedica različitog geografskog podrijetla smilja (dalmatinsko i kontinentalno) i različitih okolišnih uvjeta (temperatura, oborine, izloženost suncu) kojima je smilje bilo izloženo. Istraživanja koja su provedena pokazala su utjecaj staništa na kojem biljka raste i to posebno tipa tla (Leonardo i sur., 2013), zatim stadija razvoja biljke (Blažeković i sur., 1995), nadmorske visine i klimatskih čimbenika (Melito i sur., 2016; Čavar Zeljković i sur., 2015) na količinu i sastav eteričnog ulja smilja. Također, osim navedenih parametara moguće je da su razlikama u sadržaju eteričnog ulja između uzoraka macerata smilja međusobno pridonose i različiti uvjeti pri kojima se provodio proces maceracije (iako je ekstrakcijsko otapalo isto (maslinovo ulje), moguće su razlike u veličini čestica biljne droge, omjeru otapalo-biljna droga, duljini trajanja ekstrakcije i temperaturi). Dobivene vrijednosti sadržaja eteričnog ulja u uzorcima macerata uspoređene su s vrijednostima sadržaja eteričnog ulja dobivenog vodenom destilacijom nadzemnih dijelova smilja, prikupljenog na različitim lokacijama u Hrvatskoj, iz nekoliko istraživanja (Malenica Staver i sur., 2018; Čavar Zeljković i sur., 2015; Mastelić i sur., 2005; Blažeković i sur., 1995). Sadržaj eteričnog ulja smilja u navedenim istraživanjima iznosi od 0,02% do 0,32 %, a izmjereni sadržaji eteričnog ulja za uzorke macerata dalmatinskog smilja 1 i 3 te uzorke macerata kontinentalnog smilja 1, 2 i 3 nalaze se unutar navedenog raspona. Jedino uzorak macerata dalmatinskog smilja 2 ima veću vrijednost sadržaja eteričnog ulja (0,51%).

## 5. ZAKLJUČCI

U šest uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja određene su vrijednosti fizikalnih i kemijskih konstanti, pH vrijednosti i sadržaj eteričnog ulja u svrhu procjene čistoće i kakvoće ispitivanih macerata. Vrijednosti kiselinskog broja iznosile su između 1,71 i 2,88 mg KOH/g, vrijednosti relativne gustoće su bile između 0,905 i 0,988 a vrijednosti indeksa refrakcije su bile između 1,4691 i 1,4743. Izmjerene pH vrijednosti uzoraka macerata smilja su bile između 4,40 i 5,25. Sadržaj eteričnog ulja smilja u analiziranim uzorcima iznosio je od <0,08 do 0,51% pri čemu su veće vrijednosti izmjerene u uzorcima macerata dalmatinskog smilja što se može povezati s geografskim podrijetlom i klimatskim uvjetima kojima je smilje bilo izloženo. Dobivene vrijednosti uspoređene su s dostupnim literaturnim podacima za ispitivanje čistoće i kvalitete eteričnih i masnih ulja. Provedene analize su pokazale da nema značajnih razlika u čistoći i kvaliteti između uzoraka macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja. Budući da pripravnici smilja, među kojima i macerat smilja, imaju sve veću medicinsku i kozmetičku primjenu, postoji potreba za uvođenjem referentnih vrijednosti kemijskih i fizikalnih parametara koji će se koristiti u ispitivanju čistoće i procjeni kvalitete macerata smilja.

## **6. LITERATURA**

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 r-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *J Nat Prod*, 2007, 70, 608-612.

Basics of refractometry, 2019., <https://wiki.anton-paar.com>, pristupljeno 8.5.2021.

Bauer J, Koeberle A, Dehm F, Pollastro F, Appendino G, Northoff H, Rossi A, Sautebin L, Werz O. Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyl pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy *in vivo*. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81, 259-268.

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.

Bouزيد D, Nouioua W, Soltani E, De Haro JP, Angeles Esteban M, Zerroug MM. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharm J*, 2017, 25, 780-787.

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. 24, 25, 26, 155, 743, 745, 2900.

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

Drapeau J, Fröhler C, Touraud D, Kröckel U, Geier M, Rose A, Kunz W. Repellent studies with *Aedes aegypti* mosquitoes and human olfactory tests on 19 essential oils from Corsica, France. *Flavour Fragr J*, 2009, 24, 160-169.

Fraternale D, Flamini G, Ascrizzi 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.

- Garza AL, Etxeberria U, Haslberger A, Aumueller E, Martinez JA, Milagro FI. *Helichrysum* and Grapefruit Extracts Boost Weight Loss in Overweight Rats Reducing Inflammation. *J Med Food*, 2015, 18(8), 890-898.
- Garza AL, Etxeberria U, Palacios-Ortega S, Haslberger AG, Aumueller E, Milagro FI, Martinez JA. Modulation of hyperglycemia and TNF $\alpha$ -mediated inflammation by *helichrysum* and grapefruit extracts in diabetic *db/db* mice. *Food Funct*, 2014, 5, 2120-2128.
- Gelenčir Jo, Gelenčir Ja. Atlas ljekovitog bilja. Zagreb, Prosvjeta, 1991, str. 370.
- 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 Investig Dermatol*, 1993, 100(1), 35-41.
- Kovač-Bešović E. Metode u farmakognoziji. Sarajevo, Sarajevo Publishing, 2001, str. 109-120, 130-133.
- Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing – Tehnička knjiga, 2005, str. 181, 195, 219-226.
- Leonardi M, Ambryszewskaa KE, Melai B, Flamini G, Cioni PL, Parri F, Pistelli L. Essential-Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). *Chem Biodivers*, 2013, 10, 343-345.
- 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.
- 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.



- Malenica Staver M, Gobin I, Ratkaj I, Petrovic M, Vulinovic A, Dinarina-Sablic M, Broznic D. In vitro Antiproliferative and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Flowers and Leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Growing in Central Dalmatia (Croatia). *J Essent Oil-Bear Plants*, 2018, 21(1), 77-91.
- Maleš Ž. Farmaceutska botanika, predavanja, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2017.
- Marković S. Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka: temelji fitoaromaterapije, 2. izdanje. Zagreb, Centar Cedrus, 2010, str. 77, 176, 238, 245-247.
- Mastelić J, Politeo O, Jerković I. Contribution to the Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. – Determination of Ester Bonded Acids and Phenols. *Molecules*, 2008, 13, 795-803.
- 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.
- Melito S, Petretto GL, Podani J, Foddai M, Maldini M, Chessa M, Pintore G. Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition. *Ind Crop Prod*, 2016, 80, 242-250.
- Mollova S, Fidan H, Antonova D, Bozhilov D, Stanev S, Kostova I, Stoyanova A. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subspecies essential oils. *Turk J Agric For*, 2020, 44, 371-378.
- Ninčević T, Grdiša M, Šatović Z, Jug-Dujaković M. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. *Ind Crop Prod*, 2019, 138, 111487.
- Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germano MP, Alonzo V. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 17, 517-520.
- Nostro A, Cannatelli MA, Crisafi G, Musolino AD, Procopio F, Alonzo V. Modifications of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 38, 423-427.

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.

Organic *Helichrysum* Essential Oil (*Helichrysum italicum*), 2007., <https://www.nhrorganicoils.com>, pristupljeno 21.5.2021.

Ospina JD, Grande Tovar CD, Menjívar Flores JC, Sánchez Orozco MS. Relationship between refractive index and thymol concentration in essential oils of *Lippia origanoides* Kunth. *Chilean J Agric Anim Sci*, 2016, 32(2), 127-133.

Perrini R, Morone-Fortunato I, Lorusso E, Avato P. Glands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman. *Ind Crop Prod*, 2009, 29, 395-403.

Petersen D, Immortelle Essential Oil and Extract: Are Two Preparations Better than One?. *J Am Herb Guild*, 2015, 13(1), 21-27.

pH Electrodes, 2020., <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 15.5.2021.

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

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.

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.

Rosa A, Deiana M, Atzeri A, Corona G, Incani A, Melis MP, Appendino G, Dessi MA. Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated  $\alpha$ -pyrone–phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chem-Biol Interact*, 2007, 165, 117-126.

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

Schinella GR, Tournier HA, Máñez S, Buschiazzo PM, Recio MC, Ríos JL. Tiliroside and gnaphaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation. *Fitoterapia*, 2007, 78, 1-6.

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

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Potenciometrijske metode. U: Osnove analitičke kemije. Bešenić D, urednica, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 381-385, 388-391, 404, 406.

Standard For Olive Oils And Olive Pomace Oils, 1981, New York, Codex alimentarius, broj 33 (CODEX STAN 33-81).

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.

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. i 102-105.

Xu L, Zhan X, Zeng Z, Chen R, Li H, Xie T, Wang S. Recent advances on supercritical fluid extraction of essential oils. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2011, 5(9), 1196-1211.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*, 2018, 13(20), 1-26.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je tipična mediteranska biljka iz porodice *Asteraceae* koja zbog svojih ljekovitih svojstava ima dugogodišnju medicinsku i farmaceutsku primjenu. U ovom diplomskom radu izmjereni su kemijski (kiselinski broj) i fizikalni (relativna gustoća, indeks refrakcije) parametri, pH vrijednost i sadržaj eteričnog ulja macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja u maslinovom ulju (n=6) u svrhu ispitivanja čistoće i kvalitete macerata smilja. Izmjerena vrijednost kiselinskog broja iznosila je između 1,71 i 2,88 mg KOH/g, relativna gustoća iznosila je između 0,905 i 0,988, indeks refrakcije je bio između 1,4691 i 1,4743. Izmjerena pH vrijednost iznosila je između 4,40 i 5,25, a sadržaj eteričnog ulja je bio od <0,08 do 0,51 %. Dobivene vrijednosti uspoređene su s referentnim vrijednostima za eterično ulje smilja i maslinovo ulje budući da referentne vrijednosti za macerat smilja u maslinovom ulju nisu dostupne u literaturi. Dobiveni rezultati pokazuju da nema značajnih razlika između uzoraka macerata dalmatinskog i macerata kontinentalnog smilja. S obzirom na sve veću upotrebu pripravaka smilja u medicinske i kozmetičke svrhe, postoji potreba za definiranjem referentnih vrijednosti kemijskih i fizikalnih parametara za procjenu čistoće i kvalitete macerata smilja.

Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don), belonging to the family of *Asteraceae*, is a typically Mediterranean plant that has a long-lasting medicinal and pharmaceutical use. In this thesis, chemical (acid value) and physical (relative density, refractive indeks) parametres, pH value and essential oil content of Dalmatian and continental immortelle olive oil macerates were measured in order to investigate the purity and the quality of immortelle oil macerates. The measured acid value was between 1,71 i 2,88 mg KOH/g, the relative density was between 0,905 and 0,988, the refractive index was between 1,4691 and 1,4743. The measured pH value was between 4,40 and 5,25 and the essential oil content was from <0,08 to 0,51 %. The obtained values were compared with the reference values for immortelle essential oil and for olive oil because the reference values for immortelle olive oil macerate are not available in the literature. The obtained results showed that there are no significant differences between the samples of Dalmatian immortelle oil macerates and continental immortelle oil macerates. Considering the increasing use of immortelle preparations for medicinal and cosmetic purposes, there is a need to define the reference values of chemical and physical parameters to assess purity and quality of immortelle oil macerates.

**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

## Procjena čistoće i kvalitete dalmatinskog i kontinentalnog macerata smilja

**Barbara Bilandžija**

### SAŽETAK

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je tipična mediteranska biljka iz porodice *Asteraceae* koja zbog svojih ljekovitih svojstava ima dugogodišnju medicinsku i farmaceutsku primjenu. U ovom diplomskom radu izmjereni su kemijski (kiselinski broj) i fizikalni (relativna gustoća, indeks refrakcije) parametri, pH vrijednost i sadržaj eteričnog ulja macerata dalmatinskog i kontinentalnog smilja u maslinovom ulju (n=6) u svrhu ispitivanja čistoće i kvalitete macerata smilja. Izmjerena vrijednost kiselinskog broja iznosila je između 1,71 i 2,88 mg KOH/g, relativna gustoća iznosila je između 0,905 i 0,988, indeks refrakcije je bio između 1,4691 i 1,4743. Izmjerena pH vrijednost iznosila je između 4,40 i 5,25, a sadržaj eteričnog ulja je bio od <0,08 do 0,51 %. Dobivene vrijednosti uspoređene su s referentnim vrijednostima za eterično ulje smilja i maslinovo ulje budući da referentne vrijednosti za macerat smilja u maslinovom ulju nisu dostupne u literaturi. Dobiveni rezultati pokazuju da nema značajnih razlika između uzoraka macerata dalmatinskog i macerata kontinentalnog smilja. S obzirom na sve veću upotrebu pripravaka smilja u medicinske i kozmetičke svrhe, postoji potreba za definiranjem referentnih vrijednosti kemijskih i fizikalnih parametara za procjenu čistoće i kvalitete macerata smilja.

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

Rad sadrži: 57 stranica, 8 grafičkih prikaza, 6 tablica i 54 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Sredozemno smilje, macerati, 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

### Purity and quality assessment of Dalmatian and continental immortelle macerate

Barbara Bilandžija

#### SUMMARY

Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don), belonging to the family of *Asteraceae*, is a typically Mediterranean plant that has a long-lasting medicinal and pharmaceutical use. In this thesis, chemical (acid value) and physical (relative density, refractive indeks) parametres, pH value and essential oil content of Dalmatian and continental immortelle olive oil macerates were measured in order to investigate the purity and the quality of immortelle oil macerates. The measured acid value was between 1,71 i 2,88 mg KOH/g, the relative density was between 0,905 and 0,988, the refractive index was between 1,4691 and 1,4743. The measured pH value was between 4,40 and 5,25 and the essential oil content was from <0,08 to 0,51 %. The obtained values were compared with the reference values for immortelle essential oil and for olive oil because the reference values for immortelle olive oil macerate are not available in the literature. The obtained results showed that there are no significant differences between the samples of Dalmatian immortelle oil macerates and continental immortelle oil macerates. Considering the increasing use of immortelle preparations for medicinal and cosmetic purposes, there is a need to define the reference values of chemical and physical parameters to assess purity and quality of immortelle oil macerates.

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

Thesis includes: 57 pages, 8 figures, 6 tables and 54 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Immortelle, macerates, 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.