

Izolacija i identifikacija eteričnog ulja sredozemnog smilja - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

Đeldum Kustić, Marina

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:974437>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marina Đeldum Kustić

**Izolacija i identifikacija eteričnog ulja sredozemnog
smilja - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don**

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

Poslijediplomski specijalistički studij: **Fitofarmacija s dijetoterapijom**

Mentorica rada: prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Specijalistički rad obranjen je dana 18.07.2024. na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu (online), pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv.prof.dr.sc. Biljana Blažeković
2. prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević
3. prof.dr.sc. Renata Jurišić Grubešić

Rad ima 37 listova.

Specijalistički rad na poslijediplomskom specijalističkom studiju „Fitofarmacija s dijetoterapijom“ prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na iznimnoj pomoći i podršci u izradi i pisanju specijalističkog rada te doc. dr. sc. Maji Bival Štefan na pomoći u GC-MS analizi. Također se zahvaljujem OPG-u Guerino Kučić na velikodušnoj donaciji uzorka eteričnog ulja smilja sa otoka Cresa i na svim poslanim korisnim podacima. Na kraju veliko hvala obitelji i prijateljima koji su bili i stručna i moralna podrška.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj je ovog specijalističkog rada provesti izolaciju i identifikaciju eteričnog ulja sredozemnog smilja - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don s različitih lokacija na hrvatskim otocima.

Materijali i metode

Sadržaj eteričnog ulja u osušenim cvjetovima sredozemnog smilja određen je metodom destilacije pomoću vodene pare. Identifikacija izoliranog eteričnog ulja provedena je primjenom plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS).

Rezultati

Iz cvjetova sredozemnog smilja s otoka Visa, Paga i Cresa izolirano je 2,5-4 mL/kg eteričnog ulja. Identificirano je 70 sastavnica koje su činile 89,96-98,05% pojedinog eteričnog ulja. Glavne sastavnice eteričnog ulja uzorka s otoka Visa bili su α -pinen (26,80 %) i γ -kurkumen (20,33 %). Uzorak s otoka Paga sadržavao je najviše α -pinena (11,91 %) i neril-acetata (11,13 %). Najveći udio neril-acetata (16,03 %) određen je u eteričnom ulju s otoka Cresa koje je sadržavalo i značajne količine β -selinena (11,98 %).

Zaključci

Ustanovljene razlike u udjelima i kromatografskim profilima analiziranih eteričnih ulja najvjerojatnije su vezane za određeni genotip, razvojni stadij biljke, vegetacijsko razdoblje u kojem je prikupljen biljni materijal te su posljedica klimatskih i ekoloških čimbenika na lokacijama sabiranja kao i primijenjene metode izolacije.

SUMMARY

Objectives

The aim of this study is to isolate and identify the essential oil of immortelle - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from different locations on the Croatian islands.

Materials and methods

The essential oil content of the dried immortelle flowers was determined by steam distillation. The essential oil Immortelle was identified by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS).

Results

From the flowers of immortelle collected on the islands of Vis, Pag and Cres, 2.5-4 mL/kg of essential oil was isolated. Seventy components were identified, accounting for 89.96-98.05% of each essential oil. The main components of the essential oil sample from the island of Vis were α -pinene (26.80 %) and γ -curcumene (20.33 %). The sample from the island of Pag contained the most α -pinene (11.91 %) and neryl acetate (11.13 %). The highest proportion of neryl acetate (16.03 %) was found in the essential oil from the island of Cres, which also contained significant amounts of β -selinene (11.98 %).

Conclusion

The observed differences in the yields and chromatographic profiles of the essential oils analysed are most likely related to a specific genotype, the developmental stage of the plant and the growing season in which the plant material was collected, and are a consequence of the climatic and environmental factors at the place of collection and the isolation method used.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Sredozemno smilje - <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	2
1.2. Eterična ulja	3
1.3. Eterično ulje sredozemnog smilja	5
1.4. Djelovanje i primjena eteričnog ulja sredozemnog smilja	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Biljni materijal	12
3.2. Određivanje i izolacija eteričnog ulja	12
3.3. Analiza eteričnog ulja u vezanom sustavu: plinski kromatograf - spektrometar masa	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Određivanje sadržaja eteričnog ulja u cvjetovima sredozemnog smilja.....	17
4.2. Kromatografski profil eteričnog ulja cvjetova sredozemnog smilja.....	18
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA	26
7. ŽIVOTOPIS	31

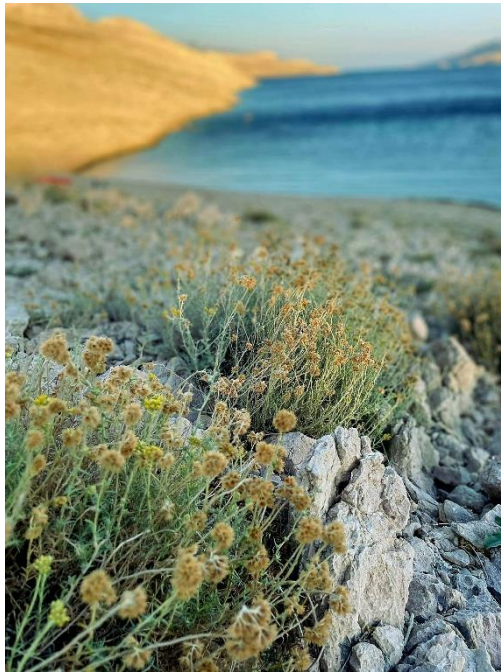
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Rod *Helichrysum* iz porodice Asteraceae relativno je veliki rod koji uključuje oko 600 vrsta rasprostranjenih širom svijeta (1). Sredozemno smilje - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don je višegodišnji polugrm koji raste duž mediteranske obale, a karakterističan je po svojim aromatičnim zlatno-žutim cvjetovima. Budući da cvjetovi zadržavaju žutu boju čak i kada se uberu i osuše, biljka je dobila ime *immortelle* prema riječi francuskog podrijetla sa značenjem „vječan“ (2). Sredozemno smilje dugo je poznato u tradicionalnoj medicini mediteranskih zemalja. Cvjetovi i listovi koriste se u liječenju alergija, prehlade, kašlja, zacjeljivanja rana, upala, infekcija, poremećaja spavanja te za ublažavanje crvenila i opekline od sunca (3, 4). Dosadašnja znanstvena istraživanja posebice ističu protuupalna, antioksidacijska i antimikrobna svojstva eteričnog ulja i različitih ekstrakata smilja (1, 3). Eteričnom ulju pripisuju se najvažnija farmakološka svojstva smilja vezana za primjenu na koži (5). Jedno je i od najpopularnijih eteričnih ulja u kozmetici jer je dokazano da potiče cirkulaciju u koži, regenerira kožu te umanjuje pojavu sitnih bora (6, 7).

Pored prikupljanja samoniklog biljnog materijala, sredozemno smilje se danas široko uzgaja. Pokazuje veliku varijabilnost kemijskog sastava ovisno o geografskom podrijetlu, starosti biljke i okolišnim čimbenicima (1), što značajno utječe na kvalitetu biljne sirovine za farmaceutsku i kozmetičku industriju. U Hrvatskoj je sredozemno smilje rasprostranjeno duž Jadranske obale i na otocima. Raste na kršovitom, suhom i siromašnom tlu (6). U ovom radu će se provesti usporedna karakterizacija eteričnog ulja izoliranog iz cvjetova prikupljenih na otocima Visu, Pagu i Cresu.

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

Sredozemno smilje - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don višegodišnji je polugrm visine do 70 cm koji raste duž mediteranske obale. Biljka je karakteristična po svojim vrlo aromatičnim zlatnožutim cvjetovima (slika 1), a cvate u razdoblju od svibnja/lipnja do kolovoza/rujna (1).



Slika 1. Smilje na otoku Pagu (fotografija Marina Đeldum Kustić, 8. rujna 2023.)

Stabljika je uspravna do uzlazno uspravna, paučinasto do gusto dlakava i prekrivena listovima. Pri bazi i sredinom vegetativne i cvjetne stabljike, listovi su sjedeći, izmjenični, linearni, s tupim do blago zaobljenim vrhovima, s gornje strane zelenkasti, a s donje srebrnasti. Dugi su 2-37 mm i široki 0,4-1,8 mm. Listovi se veličinom smanjuju prema vrhu stabljike koja nosi terminalni gronjasti cvat. Cvat se sastoji od 2-120 glavica koje su okruglaste do jajaste, valjkaste do usko zvonaste i raznospolne. Glavice sadrže 8-39 žutih cvjetića, od kojih je 1-12 ženskih i 7-29 dvospolnih. Pricvjetni listovi su crjepasto raspoređeni. Unutarnji su linearnog oblika, suhokožičasti i dulji od vanjskih. Vanjski pricvjetni listovi široko su zaobljeni, kožasti i dlakavi. Plod je tamnosmeđa cilindrična roška dimenzija 0,6-1.1 × 0,2–0,7 mm. Kao kserofitna biljka,

smilje raste na suhim, pješčanim i kamenitim područjima u širokom rasponu nadmorskih visina do 2200 m (1, 4).

1.2. Eterična ulja

Eterična su ulja aromatični i vrlo hlapljivi sekundarni biljni metaboliti sastavljeni od velikog broja različitih organskih spojeva među kojima su najzastupljenije terpenске molekule, a mogu sadržavati fenilpropane, lančane ugljikovodike te spojeve s dušikom i sumporom. Sposobnost stvaranja eteričnog ulja imaju vrste iz određenih biljnih porodica, primjerice Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae i dr. Biljke odlažu eterična ulja u posebnim spremnicima koji su histološki lako prepoznatljivi i čija je anatomska građa svojstvena cijelom rodu ili porodici. To mogu biti žljezdane dlake, uljenice te intracelularni prostori (kanali) lokalizirani u nadzemnim i podzemnim organima (8,9).

Terpeni su prirodni spojevi čiji se građevni princip zasniva na molekuli izoprena (2-metilbutadiena; C_5H_8). U eteričnim uljima koja se dobivaju destilacijom uglavnom su prisutni monoterpeni (C_{10}) i seskviterpeni (C_{15}), dok diterpene (C_{20}) i triterpene (C_{30}) nalazimo u eteričnim uljima koji se izoliraju ekstrakcijom ili mehaničkim postupcima. Njihova struktura može biti aciklična, mono-, bi- i triciklična. Prema stupnju oksidacije pripadaju skupinama ugljikovodika, alkohola, fenola, aldehida, ketona, estera, oksida i peroksida. Iako se u eteričnim uljima obično detektira veliki broj sastavnica, samo ih je nekoliko prisutno u većoj količini te one određuju mirisna, fizikalno-kemijska i biološka svojstva eteričnog ulja. Eterična ulja većinom su bistre, bezbojne do blijedožućkaste tekućine, a samo su rijetko intenzivnije obojene. Dobro se otapaju u lipofilnim otapalima, a teško su topljiva u vodi. Većina ih je lakša

od vode, a njihova specifična težina u rasponu je od 0,84 do 1,18. Točka vrelišta im je relativno visoka i kreće se u granicama od 150°C do 300 °C (8, 9).

Izolacija eteričnih ulja

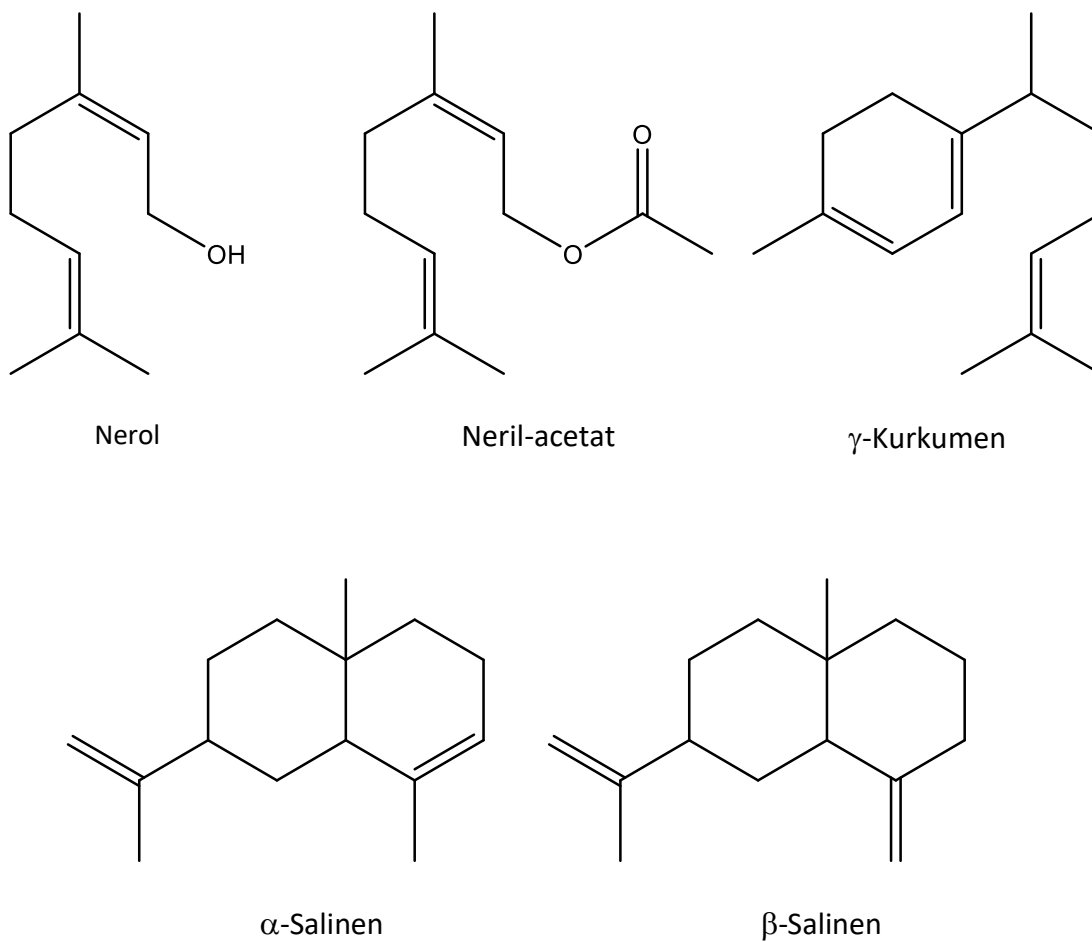
Izolacija eteričnih ulja provodi se konvencionalnim tehnikama koje uključuju destilaciju, ekstrakciju otapalima i mehaničke postupke kao što je hladno prešanje (10). Među naprednije tehnike ubraja se mikrovalna ekstrakcija bez otapala (11, 12) i ekstrakcija ugljikovim dioksidom u superkritičnom stanju (13, 14).

Destilacija je najčešće korišten postupak ekstrakcije eteričnog ulja iz biljnog materijala, a odvija se uz korištenje vrlo visoke temperature koja uzrokuje širenje sadržaja i povišenje tlaka unutar žlijezdane dlake te posljedično pucanje stanične stijenke i oslobađanje eteričnog ulja. Zajedno s vodenom parom, eterično ulje prenosi se dalje kroz hladilo te se uslijed kondenzacije u posudi skupljaju uljna i vodena faza koje se međusobno ne miješaju. Ovisno o načinu stvaranja vodene pare postoje tri vrste destilacije. Kod vodene destilacije biljni materijal uronjen je u kipuću vodu. Eterično ulje, zbog osmoze, difundira kroz staničnu stijenku uljnih stanica u vodu koja isparavanjem prenosi eterično ulje dalje kroz aparaturu. Druga vrsta je vodenoparna destilacija kod koje se biljni materijal nalazi iznad spremnika s kipućom vodom te je u kontaktu samo sa zasićenom vodenom parom, ali ne i s kipućom vodom. Kad se primjenjuje parna destilacija, biljni materijal nije u kontaktu s vodom, a vodena se para uvodi u kotao iz posebnog generatora pare, čime je smanjeno termičko raspadanje i nastajanje artefakata. Destilacija se može provoditi i samim zagrijavanjem biljnog materijala bez dodatka vode ili vodene pare te u odsustvu kisika iz zraka (suha destilacija). Ponekad je potrebno podvrgnuti eterično ulje ponovljenom postupku destilacije (redestilacija), s ciljem pročišćavanja od artefakata (10, 14).

1.3. Eterično ulje sredozemnog smilja

Eterično ulje sredozemnog smilja nalazi se u žljezdanim dlakama koje su prisutne na cvjetovima i listovima. Uglavnom se dobiva vodenom i parnom destilacijom vršnih dijelova u ranoj cvatnji (15). Međutim, ustanovljeno je da primjena visoke temperature ipak utječe na sastav te može umanjiti kvalitetu izoliranog eteričnog ulja (16). Prinosi eteričnog ulja vrlo su mali, obično manji od 0,5 %. Primjerice, jedna tona cvatućih vršnih dijelova daje oko 0,9-1,5 kg eteričnog ulja. Komatografski profil eteričnog ulja određuje se plinskom kromatografijom, uz detekciju temeljenu na plamenoj ionizaciji ili spektrometriji masa (15).

Sredozemno smilje pojavljuje se u nekoliko različitih podvrsta od kojih su najzastupljenije *H. italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* i *H. italicum* subsp. *mycrophyllum* (Wild.) Nyman (4). Sastav eteričnog ulja razlikuje se među podvrstama. No, i brojni drugi čimbenici, kao što su geografsko podrijetlo, ekološki čimbenici, stadij razvoja biljke, uvjeti uzgoja i dr. značajno određuju kromatografski profil eteričnog ulja. Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja sredozemnog smilja su α -pinen, limonen, α -terpineol, italicen, kurkumen, nerol, neril-acetat, neril-propionat i salineni. U literaturi su opisana tri glavna kemotipa: (i) nerol i njegovi esteri; (ii) α - i β -salinen te (iii) γ -kurkumen (1, 6, 15, 17). Strukture navedenih spojeva prikazane su na slici 2.



Slika 2. Strukture glavnih sastavnica eteričnog ulja sredozemnog smilja

Istraživanja hrvatskih uzoraka sredozemnog smilja također su pokazala veliku varijabilnost u sastavu eteričnih ulja. Tako je, primjerice, neril-acetat bio glavna sastavnica uzorka iz Splita (18), dok je analiza više uzoraka iz Srednje Dalmacije pokazala ovisnost sastava eteričnog ulja o mjestu prikupljanja i stadiju razvoja biljke. Monoterpeni su bili zastupljeniji prije cvatnje, dok su seskviterpeni prevladavali tijekom i nakon cvatnje (19). Istraživanje sredozemnog smilja s područja Srednje Dalmacije proveli su Čavar Zeljković i sur. (20). Metodom hidrodestilacije izolirali su 0,02-0,12 % eteričnog ulja iz nadzemnih biljnih dijelova. Uzorci s otoka Brača,

Biokova i okolice Trilja bili su bogati seskviterpenskim ugljikovodicima, dok je uzorak iz Makarske sadržavao najviše oksidiranih seskviterpena.

Recentno istraživanje prinosa i sastava eteričnog ulja sredozemnog smilja provedeno je na biljnim uzorcima s devet lokacija u Dalmaciji. Prinos eteričnog ulja nakon vodene destilacije, u trajanju od tri sata, iznosio je 0,23-0,46 %. Neril-acetat (4,48-21,36 %) bio je glavni spoj ispitanih eteričnih ulja, a udjelom su se također isticala i sljedeće sastavnice: limonen, α -pinen, α -kopaen, italicen, itolidoni, α -terpineol i α -kurkumen (6).

Za usporedbu hrvatskog smilja sa susjednim područjima valja spomenuti uzorak iz jugozapadnog dijela Crne Gore koji je bio bogat neril-acetatom (28,2 %), γ -kurkumenom (18,8 %), neril-propionatom (9,1 %) i α -kurkumenom (8,3 %) (21). Nadalje, komercijalni uzorak iz Crne Gore odlikovao se velikim udjelom seskviterpena β -eudesmena (21,65 %) i β -bisabolena (19,90 %), a monoterpensku frakciju najvećim dijelom činili su α -pinen (16,90 %) i neril-acetat (10,66 %) (22).

1.4. Djelovanje i primjena sredozemnog smilja

Helichrysum italicum (Roth) G. Don se zbog svog širokog spektra djelovanja već dugi niz godina primjenjuje u tradicionalnoj medicini mediteranskih zemalja. Uglavnom se od cvjetova i listova, a rjeđe i stabljike smilja, izrađuju infuzi, dekoti, prašci i eterično ulje, produkti koji se koriste za unutarnju ili vanjsku primjenu, za liječenje različitih poremećaja, a najčešće su to upale i alergije povezane s respiratornim traktom i kožom. Eterično ulje smilja se od davnina koristi u aromaterapiji, a ima antibakterijska, antivirusna, antifungalna, antioksidacijska i protuupalna svojstva (23). Zahvaljujući velikom broju različitih skupina spojeva koje sadrži, a od kojih su najčešći terpeni i fenolne komponente, sredozemno smilje pokazuje brojne biološke učinke i široku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji te u proizvodnji parfema (1, 16, 24).

Vrsta *H. italicum* bogata je fenolnim sastavnicama za koje je poznato da doprinose zdravlju zahvaljujući svom antioksidacijskom učinku te se mogu primijeniti u prevenciji različitih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom kao što su karcinom, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (25). Iako je broj kliničkih studija mali, pokazano je da dekoti i sirup smilja imaju pozitivan učinak na bronhitis i astmatičan kašalj te su primijećena i dokazana poboljšanja u pacijenata sa psorijazom i artritismom. Od kliničkih studija eteričnog ulja sredozemnog smilja ističe se ono koje su proveli Voinchet i Giraud-Robert (26). Tijekom deset dana ispitanici su oralno uzimali dvije kapi eteričnog ulja, dva puta na dan. Usporedno se provodila i topikalna primjenjena dva do tri mjeseca post-operativno. Studija je pokazala smanjenje upale, edema, crvenila i hematoma. Rezultati opservacijskih studija na ljudima i nekliničkih istraživanja te raportirana iskustva tradicionalne primjene pokazali su da je vrsta *H. italicum* sigurna za internu primjenu (25). Po pitanju vanjske primjene, D. Pratiwi i suradnici

su ustanovili da antimikrobna i protuupalna svojstva eteričnog ulja smilja doprinose boljem zacjeljivanju rana. U usporedbi s netretiranim pacijentima, oni koji su primjenjivali eterično ulje nisu razvili sekundarne infekcije te su imali normalnu do bržu stopu zacjeljivanja rana (27). Temeljem znanstvenih dokaza, sredozemno smilje se i danas koristi u rekonstruktivnoj kirurgiji za zarastanje rana i smanjenje hematoma (7, 28).

Jedno *in vivo* istraživanje je pokazalo da eterično ulje smilja ima snažan učinak u prevenciji peroksidacije lipida uzrokovane onečišćenim zrakom i UV zračenjem, u ovisnosti o primijenjenoj dozi. Smatra se da su protuupalna i fotoprotektivna svojstva smilja posljedica visokog udjela flavanoida koji neutraliziraju slobodne radikale, inhibiraju histamin i produkciju proupalnih citokina i tako ostvaruju pozitivan učinak na nadraženu kožu (20, 29–31).

Anti-age učinak je najpoznatiji razlog za primjenu smilja. Stimulacijom cirkulacije u koži potiče se regeneracija kože i sprječava se pojava sitnih bora, što eterično ulje smilja čini izrazito poželjnim u kozmetičkim pripravcima. α -Pinen je istaknut kao spoj iz eteričnog ulja smilja koji najviše doprinosi inhibiciji kolagenaze i elastaze. UV zračenje, između ostalog, inducira kolagenazu - enzimski proces koji smanjuje razinu kolagena u koži, što rezultira smanjenom elastičnošću i vidljivim posljedicama starenja kože. Eterično ulje smilja povećava proizvodnju lipida u koži, doprinosi stvaranju kožne barijere i diferencijaciji keratinocita te sintezi ceramida. Tijekom procesa starenja kože smanjuje se udio ceramida, kolesterola i masnih kiselina, što pojačava suhoću kože, smanjuje imunosni odgovor i usporava zarastanje rana. Ustanovljeno je da neril-acetat jača funkciju zaštitne barijere kože, čime doprinosi boljoj hidrataciji zbog zadržavanja vode, a dodatno smanjuje i ulazak nepoželjnih egzogenih spojeva koje mogu imati negativan učinak na kožu. Disfunkcija epiderme povećava osjetljivost, suhoću i infekcije kože. Eterično ulje smilja povoljno utječe na diferencijaciju stanica epidermisa, produkciju lipida i

ceramida te tako potiče jačanje zaštitne barijere, a upravo su očuvanje funkcije kožne barijere i održavanje vlažnosti kože preduvjet za mladoliki izgled kože (17, 31, 32).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Sredozemno smilje - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don važna je ljekovita biljka u tradicionalnoj medicini mediteranskih zemalja. Zbog svojih protuupalnih, antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava, eterično ulje i različiti ekstrakti sredozemnog smilja primjenjuju se u liječenju rana, modrica, kožnih i respiratornih bolesti. Eterično ulje sredozemnog smilja jedno je od najpopularnijih eteričnih ulja u kozmetici zbog sposobnosti poticanja cirkulacije u koži, regeneracije stanica i poboljšanja teksture kože.

Ovisno o geografskom podrijetlu, starosti biljke i okolišnim čimbenicima, eterično ulje sredozemnog smilja pokazuje veliku varijabilnost kemijskog sastava, što značajno utječe na kvalitetu biljne sirovine za farmaceutsku i kozmetičku industriju. Stoga je cilj ovog specijalističkog rada odrediti kromatografski profil eteričnog ulja samoniklog sredozemnog smilja s hrvatskih otoka Visa, Paga i Cresa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Cvatući vršni dijelovi sredozemnog smilja - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don prikupljeni su na tri hrvatska otoka: Visu, Pagu i Cresu. Biljni materijal sakupljen je u blizini grada Komiže 2. lipnja 2023., zatim u mjestu Metajna na otoku Pagu 30. lipnja 2023. te u mjestu Martinšćica na otoku Cresu 26. lipnja 2023. Prikupljeni biljni material osušen je na sobnoj temperaturi u zaštiti od svjetlosti (slika 3).



Slika 3. Osušeni cvjetovi sredozemnog smilja prikupljeni na otoku Pagu

3.2. Određivanje i izolacija eteričnog ulja

Osušeni cvjetovi sredozemnog smilja podvrgnuti su postupku destilacije pomoću vodene pare u aparaturi koju propisuje Europska farmakopeja (33). U tikvicu za destilaciju od 1000 mL stavljeno je 60 g osušenih cvjetova koji su preliveni s 500 mL destilirane vode te podvrgnuti destilaciji tijekom tri sata, pri brzini destilacije 2-3 mL/min (slika 4). Eterično ulje s otoka Cresa dobiveno je parnom destilacijom u aparaturi koja je prikazana na slici 5. U postupku je 140 kg

biljnog materijala podvrgnuto tijekom 90 minuta pari generiranoj parogeneratorom, pri brzini pare od 70 kg/min.



Slika 4. Aparatura za određivanje i izolacija eteričnog ulja iz cvjetova sredozemnog smilja s otoka Paga i Visa
(Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta)



Slika 5. Aparatura za parnu destilaciju za izolaciju eteričnog ulja iz cvjetova sredozemnog smilja s otoka Cresa (OPG Kučić Guerino)

3.3. Analiza eteričnog ulja u vezanom sustavu: plinski kromatograf –

spektrometar masa

Eterično ulje izolirano iz cvjetova sredozemnog smilja podvrgnuto je analizi u spregnutom sustavu plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (slika 6). Uzorak za analizu pripremljen je otapanjem eteričnog ulja u heksanu te je 1 μL uzorka injektiran u split modu (1:50), pri temperaturi 250 $^{\circ}\text{C}$. Kao plin nositelj korišten je helij s protokom 1 mL/min. Sastavnice eteričnog ulja odijeljene su u kapilarnoj koloni HP-5ms (5 % fenil-metilpolisiloksan) duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25 μm , uz sljedeći temperaturni program: početna temperatura kolone 60 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), zagrijavanje 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 300 $^{\circ}\text{C}$ te zadržavanje temperature kolone 10 min na 300 $^{\circ}\text{C}$. Odijeljene sastavnice analizirane su na masenom spektrometru (EI 70 eV, m/z 40-400). U svrhu izračuna retencijskih indeksa pod istim je uvjetima analizirana i smjesa n-alkana od C-8 do C-30. Obrada rezultata provedena je korištenjem računalnog paketa Agilent GC/MSD ChemStation verzija F.01.03. Sastavnice eteričnog ulja identificirane su usporedbom spektara masa u bazi NIST 14, Wiley 9 i HPCH 2205. Identifikacija je također provedena na temelju linearnog retencijskog indeksa (RI) koji je izračunat za svaku odijeljenu sastavnicu prema sljedećem izrazu:

$$RI = 100 \times C + 100 \frac{(t_R)_X - (t_R)_C}{(t_R)_{C+1} - (t_R)_C}$$

gdje je C broj C atoma n-alkana, t_R retencijsko vrijeme za pojedinu sastavnicu, a X komponenta za koju se računa retencijski indeks.



Slika 6. Spregnuti sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa u kojem je napravljena analiza eteričnog ulja
(Zavod za farmakognoziyu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje sadržaja eteričnog ulja u cvjetovima sredozemnog smilja

Određeno je da osušeni cvjetovi sredozemnog smilja s otoka Paga sadrže 4 mL/kg eteričnog ulja, a uzorak s otoka Visa 2,8 mL/kg (slika 7). Eterično ulje iz biljnog uzorka s otoka Cresa izolirano je parnom destilacijom s prinosom od 2,5 mL/kg (slika 8).



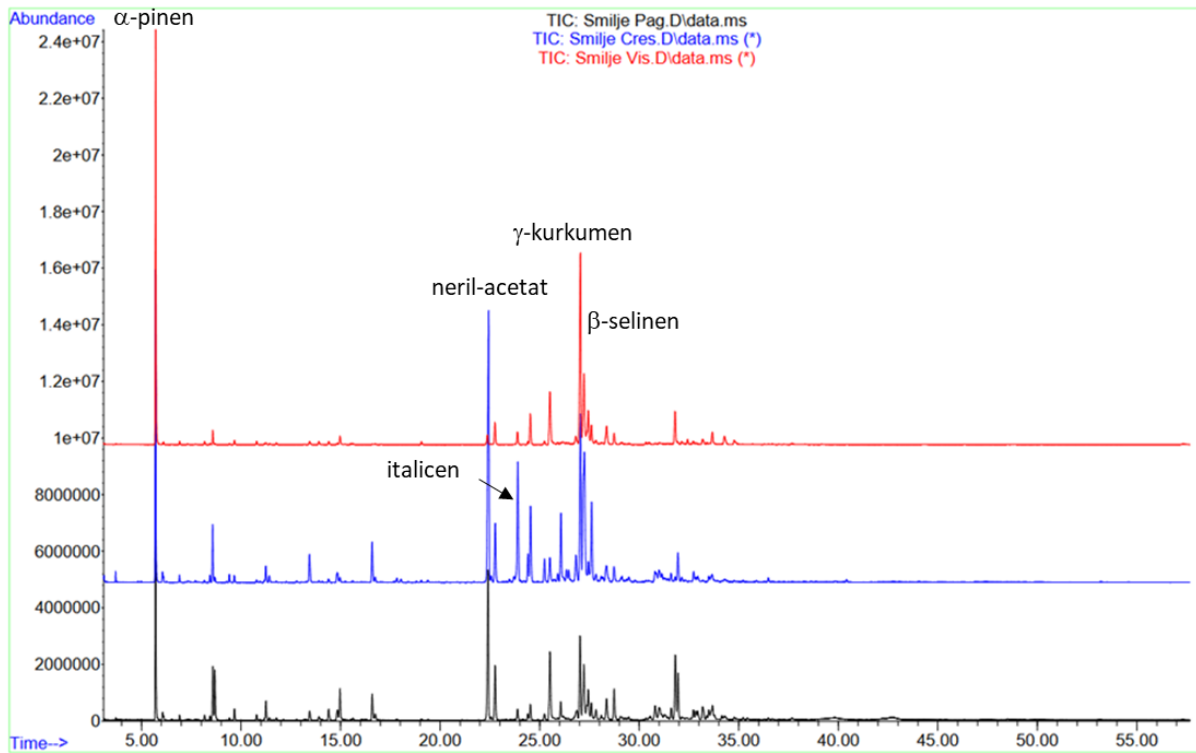
Slika 7. Eterično ulje sredozemnog smilja izolirano u aparaturi prema Europskoj farmakopeji



Slika 8. Eterično ulje sredozemnog smilja izolirano parnom destilacijom

4.2. Kromatografski profil eteričnog ulja cvjetova sredozemnog smilja

Istražen je sastav eteričnog ulja sredozemnog smilja prikupljenog na otocima Visu, Pagu i Cresu. Uzorci eteričnog ulja s otoka Visa i Paga dobiveni su iz cvjetova postupkom vodene destilacije u Clevenger aparaturi, dok je eterično ulje s otoka Cresa izolirano parnom destilacijom. Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja provedena je u vezanom sustavu: plinski kromatograf-spektrometar masa (GC-MS), uz uvjete navedene u poglavlju 3.2. Rezultati su prikazani na slici 9 i u tablici 1 koja prikazuje identificirane sastavnice prema redosljedu zadržavanja u koloni HP-5ms. Sastavnice eteričnog ulja identificirane su na temelju linearnog retencijskog indeksa (RI) koji je izračunat za svaku odijeljenu sastavnicu, kao i usporedbom njihovih spektara masa sa spektrima dostupnim u bazama spojeva. U analiziranim uzorcima ukupno je identificirano 70 sastavnica koji su činile od 89,96 % do 98,05 % pripadajućeg eteričnog ulja. Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja s otoka Visa su α -pinen (26,80 %), γ -kurkumen (20,33 %) i β -selinen (9,59 %). Eterično ulje s otoka Paga sadržavalo je najviše α -pinena (11,91 %) i neril-acetata (11,13 %). Najveći udio neril-acetata (16,03 %) određen je u eteričnom ulju s otoka Cresa koje je sadržavalo i značajne količine β -selinena (11,98 %), α -pinena (9,59 %), γ -kurkumena (8,95 %) i italicena (6,42 %). Usporedni kromatografski profili analiziranih eteričnih ulja prikazani su na slici 9.



Slika 9. Usporedni prikaz kromatografskog profila eteričnih ulja sredozemnog smilja s otoka Visa, Cresa i Paga

Tablica 1. Sastav eteričnog ulja sredozemnog smilja s otoka Visa, Paga i Cresa

No.	Sastavnica	RI (HP-5ms)	Udio (%)		
			Vis	Pag	Cres
1.	α-pinen	933	26,87	11,91	9,59
2.	α -fenhen	946		0,33	0,30
3.	kamfen	948	0,17	0,19	0,18
4.	β -pinen	976	0,23	0,23	0,25
5.	α -felandren	1004			0,06
6.	α -terpinen	1017	0,26	0,26	0,07
7.	<i>p</i> -cimen	1024		0,21	0,26
8.	limonene	1028	1,02	2,82	2,09
9.	1,8-cineol	1031		2,79	0,21
10.	izobutil-angelat	1051		0,11	0,31
11.	γ -terpinen	1058	0,36	0,63	0,27
12.	terpinolen	1088	0,29	0,33	0,12
13.	2,4-dimetil-heptan-3,5-dion	1099			0,07
14.	linalol	1101	0,17	1,29	0,72
15.	2-metilbutil-2-metilbutanoat	1105		0,15	0,29
16.	fenhol	1112		0,16	
17.	3-acetoksi-okten	1113	0,16		
18.	menton	1153			1,43
19.	2-metilbutil-angelat	1154	0,33	0,63	
20.	borneol	1165	0,31	0,26	0,07
21.	terpinen-4-ol	1177	0,30	0,74	0,16
22.	4,6-dimetilokta-3,5-dion	1187		0,90	0,64
23.	α -terpineol	1190	0,87	2,16	0,23
24.	nerol	1229		1,78	1,91
25.	bornil-acetat	1286			0,10
26.	timol	1294			0,10
27.	neril-acetat	1366	1,17	11,13	16,03
28.	α -ilangen	1369		0,26	0,36
29.	α -kopaen	1374	2,26	4,00	3,05
30.	izoitalicen	1397			0,31
31.	italicen	1401	1,29	0,78	6,42
32.	cis- α -bergamoten	1414	0,28	0,44	1,34
33.	β -kariofilen	1417	3,19	1,15	3,96
34.	trans- α -bergamoten	1434	0,38	0,46	1,14
35.	4,6,9-trimetildeka-8-en-3,5-dion	1441	6,75	5,85	1,39

36.	α -humalen	1451	0,18		0,37
37.	neril-propionat	1455	0,14	1,25	3,50
38.	<i>trans</i> - β -farnezen	1457	0,31		
39.	alo aromadendren	1458		0,32	
40.	α -akoradien	1462			0,50
41.	β -akoradien	1464			0,45
42.	γ -murolen	1475		1,21	
43.	selin-4-11-dien	1473	1,12		1,76
44.	γ-kurkumen	1479	20,33	6,04	8,95
45.	β-selinen	1483	9,59	5,44	11,98
46.	2,4,6,9-tetrametildeka-8-en-3,5-dion	1489	4,69	2,40	1,19
47.	α -selinen	1493	2,24	1,39	4,45
48.	α -murolen	1498	0,47	0,92	0,54
49.	δ -amorfen	1505		0,48	0,35
50.	γ -kadinen	1512	2,42	1,95	1,52
51.	δ -kadinen	1522	1,29	2,48	0,93
52.	italicen eter	1532	0,29	0,21	0,50
53.	α -kadinen	1535		0,15	
54.	α -kalokoren	1541		0,27	0,36
55.	<i>trans</i> -nerolidol	1563	0,23	0,13	
56.	spatulanol	1575		1,45	0,60
57.	3,5,7,10-tetrametilundek-9-en-4,6-dion	1580		1,92	0,97
58.	neril-izovalerat	1584			0,48
59.	viridiflorol	1589		0,35	
60.	gvajol	1596		0,83	0,44
61.	5-izopropil-1,7-dimetiloktahidro-1,4-metanoinden-8-ol	1601	3,61		
62.	rosifoliol	1604	0,27	3,35	1,52
63.	nerolidol oksid	1629		0,63	0,21
64.	epi- α -kadinol	1639	0,76	1,30	
65.	β -eudesmol	1647		0,73	0,25
66.	neointermedeol	1652	1,55	1,67	0,47
67.	α -eudesmol	1655		0,26	
68.	bulnesol	1665		0,27	
69.	β -epibisabolol	1668	1,26	0,49	0,14
70.	α -bisabolol	1682	0,64	0,12	
	ukupno identificirano		98,05	89,96	95,86

U tablici 2 navedeni su usporedni udjeli pojedinih skupina spojeva u analiziranim eteričnim uljima. Osnovu eteričnih ulja čine seskviterpeni (38,90-52,66 %) i monoterpeni (32,16-38,34 %), dok su alifatski spojevi manje zastupljeni (4,86-15,54 %). Među seskviterpenima prevladavaju ugljikovodici, posebice u uzorcima s Cresa (48,74 %) i Visa (45,35 %), dok ih je u eteričnom ulju s otoka Paga nešto manje (27,74 %). Paški je uzorak bogatiji seskviterpenskim alkoholima (10,95 %) u odnosu na ostala dva uzorka (3,42-4,71 %). Ugljikovodici su također najzastupljeniji monoterpeni (13,19-29,20 %), a najviše ih je prisutno u eteričnom ulju s otoka Visa. Monoterpenskim esterima najbogatije je eterično ulje sa Cresa (20,11 %). Njihov udio u uzorku s Paga iznosi 12,38 %, dok eterično ulje s Visa sadrži samo 1,31 % monoterpenskih estera. Alifatski spojevi su najviše prisutni u viškom (15,54 %) i paškom uzorku (11,96 %), dok ih je u eteričnom ulju s otoka Cresa značajno manje (4,86 %). Alifatski ugljikovodici prevladavaju u uzorku s Paga, dok su ostala dva uzorka bogatija alifatskim di-ketonima poznatih po nazivu italidoni.

Tablica 2. Usporedni udjeli pojedinih skupina spojeva u eteričnom ulju sredozemnog smilja s otoka Visa, Paga i Cresa

Sastavnice eteričnih ulja	Udio (%)		
	Vis	Pag	Cres
MONOTERPENI	32,16	36,10	38,34
Ugljikovodici	29,2	16,91	13,19
Alkoholi	1,65	6,39	3,09
Fenoli	-	-	0,10
Ketoni	-	-	1,43
Oksidi	-	3,42	0,42
Esteri	1,31	12,38	20,11
SESKVITERPENI	50,35	38,90	52,66
Ugljikovodici	45,35	27,74	48,74
Alkoholi	4,71	10,95	3,42
Oksidi	0,29	0,21	0,50
ALIFATSKI SPOJEVI	15,54	11,96	4,86
Ugljikovodici	0,16	11,07	-
Alkoholi	3,61	-	-
Ketoni	7,83	0,89	4,26
Esteri	3,94	-	0,60

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da eterično ulje s otoka Visa sadrži jako malo neril-acetata i drugih estera nerola, za razliku od ostala dva uzorka, posebice creškog koji je izrazito bogat neril-acetatom. Nadalje, viško eterično ulje ima dvostruko više α -pinena i γ -kurkumena u usporedbi s uzorcima prikupljenim na Pagu i Cresu. Međusobne razlike između pašskog i creškog uzorka su ipak značajno manje. U paškom eteričnom ulju određen je manji udio ukupnih seskviterpena, posebice ugljikovodika, dok je udio seskviterpenskih alkohola veći. Pored toga, eterično ulje s Paga sadrži više alifatskih spojeva, ponajviše ugljikovodika koji nisu prisutni u creškom uzorku u kojem prevladavaju alifatski di-ketoni (italidoni). Analizirana eterična ulja s otoka Cresa i Paga bogata su neril-acetatom te su sličnija većini ispitanih uzoraka sredozemnog smilja podrijetlom iz Hrvatske i susjednih područja (6, 21, 34). Na području Sardinije pronađeni su uzorci s vrlo visokim udjelom neril-acetata koji je dosezao više od 70 %

(35). Značajno više je rasprostranjen kemotip s manjim ali opet visokim udjelom neril-acetata u Italiji (36-40), Francuskoj (41), Crnoj Gori (42) i Hrvatskoj (43). Viški uzorak je izrazito bogat α -pinenom i γ -kurkumenom. Prethodnim istraživanjima je ustanovljeno da je smilje bogato α -pinenom rasprostranjeno u Italiji (38), Hrvatskoj (19) i Portugalu (44), dok su uzorci bogati γ -kurkumenom pronađeni na području Italije, Crne Gore i SAD-a (45).

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada provedeno je usporedno fitokemijsko istraživanje eteričnog ulja sredozemnog smilja - *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don prikupljenog na tri hrvatska otoka: Visu, Pagu i Cresu. Iz cvjetova prikupljenih na otoku Pagu izolirano je 4 mL/kg eteričnog ulja, dok su prinosi eteričnog ulja u uzorcima s Visa i Cresa bili značajno manji (2,8 mL/kg i 2,5 mL/kg).

Analizom izoliranog eteričnog ulja u vezanom sustavu plinske kromatografije i spektrometrije masa identificirana je 70 sastavnica, što predstavlja 89,96-98,05 % ispitanih eteričnih ulja. Osnovu analiziranih eteričnih ulja činili su monoterpenski ugljikovodici (13,19-32,16 %) i seskviterpenski ugljikovodici (27,74-49,74 %), dok su uzorci s otoka Cresa i Paga sadržavali i značajne količine monoterpenskih estera (20,11 % i 12,38 %). Itolidoni, alifatski diketoni karakteristični za eterično ulje smilja, bili su najzastupljeniji u viškom i paškom uzorku.

Eterično ulje s otoka Visa sadržavalo je najviše α -pinena (26,80 %), γ -kurkumena (20,33 %) i β -selinena (9,59 %). U eteričnom ulju s otoka Cresa određen je najveći udio neril-acetata (16,03 %), ali i značajni udjeli β -selinena (11,89 %), α -pinena (9,59 %), γ -kurkumena (8,95 %) i italicena (6,42 %). α -Pinen (11,91 %) i neril-acetat (11,13 %) bile su glavne sastavnice eteričnog ulja s otoka Paga.

Ustanovljene razlike u kromatografskim profilima analiziranih eteričnih ulja najvjerojatnije su vezane za određeni genotip, razvojni stadij biljke, vegetacijsko razdoblje u kojem je prikupljen biljni materijal te su posljedica klimatskih i ekoloških čimbenika na lokacijama sabiranja kao i primijenjene metode izolacije. Varijabilnost kemijskog sastava eteričnog ulja sredozemnog smilja potrebno je uzeti u obzir pri njegovoj primjeni u praksi budući da učinak značajno ovisi o kromatografskom profilu eteričnog ulja.

6. LITERATURA

1. Ninčević T, Grdiša M, Šatović Z, Jug-Dujaković M. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. In *Crops Prod* 2019;138:111487.
2. Mollova S, Fidan H, Antonova D i sur. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subspecies essential oils. *Turk J Agric Forestry* 2020;44:371-378.
3. Rigano D, Formisano C, Senatore F i sur. Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients. *J Ethnopharmacol* 2013;150(3):901-6.
4. 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.
5. Bezek K, Kramberger K, Barlič-Maganja D. Antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don hydrosol. *Antibiotics* 2022;11(8):1017.
6. Glumac M, Jažo Z, Paštar V i sur. Chemical profiling and bioactivity assessment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Essential oil: exploring pure compounds and synergistic combinations. *Molecules* 2023;28(14):5299.
7. Sarkic A, Stappen I. Essential oils and their single compounds in cosmetics—A Critical review. *Cosmetics* 2018;5(1):11.
8. Samuelson G. *Drugs of natural origin. a textbook of pharmacognosy*. Swedish Pharmaceutical Press; 2009, str. 366–412.
9. Tisserand R, Young R. *Essential oil safety: a guide for health care professionals*. Elsevier Limited; 2013, str.5–22.

10. Rassem HHA, Nour A, Yunus R. Techniques for extraction of essential oils from plants: A review. *Austral J Basic Applied Sci* 2016;10:117-127.
11. Cardoso-Ugarte GA, Juárez-Becerra GP, Sosa-Morales ME, López-Malo A. Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs. *J Microw Power Electromagnetic Energy* 2013;47(1):63–72.
12. Boukhatem MN, Ferhat MA, Rajabi M, Mousa SA. Solvent-free microwave extraction: an eco-friendly and rapid process for green isolation of essential oil from lemongrass. *Nat Prod Res* 2022;36(2):664–7.
13. Xiong K, Chen Y. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from tangerine peel: Experimental optimization and kinetics modelling. *Chem Eng Res Des* 2020;164:412–23.
14. Fikadu T. A review on extraction, isolation, characterization and some biological activities of essential oils from various plants. *Global Sci J* 2020;8(1):1692-1722.
15. Furlan V, Bren U. *Helichrysum italicum*: From extraction, distillation, and encapsulation techniques to beneficial health effects. *Foods* 2023;12(4):802.
16. Maksimović S, Tadić V, Skala D, Žižović I. Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry* 2017;138:9–28.
17. Lemaire G, Olivero M, Rouquet V i sur. Neryl acetate, the major component of Corsican *Helichrysum Italicum* essential oil, mediates its biological activities on skin barrier. *Mol Biolog* 2023;18:3.
18. Mastelić J, Politeo O, Jerković I, Radošević N. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem Nat Compound* 2005;41(1):35–40.

19. Blažević N, Petričić J, Stanić G, Maleš Z. 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(4):517-522.
20. Čavar Zeljković S, Šolić ME, Maksimović M. Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. *Nat Prod Res* 2015;29(19):1874–1847.
21. Kladar NV, Anačkov GT, Rat MM i sur. Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties. *Chem Biodiversity* 2015;12(3):419–431.
22. Oliva A, Garzoli S, Sabatino M i sur. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. *Nat Prod Res* 2020 ;34(3):445–458.
23. Staver MM, Gobin I, Ratkaj I i sur. 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 BearPlants* 2018;21(1):77–91.
24. Rigano D, Formisano C, Pagano E. A new acetophenone derivative from flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. *Fitoterapia* 2014;6:198-203.
25. Kramberger K, Kenig S, Jenko Pražnikar Z, Kočevar Glavač N, Barlič-Maganja D. A Review and evaluation of the data supporting internal use of *Helichrysum italicum*. *Plants* 2021;10(8):1738.
26. Voinchet V, Giraud-Robert AM. Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytotherapie* 2007; 5(2):6.

27. Pratiwi D, Santi T, Rusfianti M, Wijayadi LJ. The use of *Helichrysum italicum* essential oil in virgin coconut oil for wound healing: serial case reports. *J Kedokt Syiah Kuala* 2022; 22:24.
28. Genčić MS, Aksić JM, Živković Stošić MZ i sur. Linking the antimicrobial and anti-inflammatory effects of immortelle essential oil with its chemical composition – The interplay between the major and minor constituents. *Food Chem Toxicol* 2021;158:112666.
29. Combes C, Legrix M, Rouquet V i sur. *Helichrysum italicum* essential oil prevents skin lipids peroxidation caused by pollution and UV. *J Investig Dermatol* 2017;137(10):221.
30. Guinoiseau E, Lorenzi V, Luciani A i sur. Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. *Formatex* 2013;1073-1078.
31. Allenspach M, Steuer C. α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry* 2021;190:112857.
32. Salas-Oropeza J, Jimenez-Estrada M, Perez-Torres A i sur. Wound healing activity of α -Pinene and α -phellandrene. *Molecules* 2021;26(9):2488.
33. European Pharmacopoeia online. Available at: <https://pheur.edqm.eu/home>. Accessed February 11, 2023.
34. Talić S, Lukić T, Brkljača M, Bevanda AM, Lasić A. Chemodiversity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* essential oils from Bosnia and Herzegovina. *Fresenius Environ Bull* 2021;30: 2492-2502.
35. 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 Crops Prod* 2016;80:242-250.
36. Perrino E, Tomaselli V, Costa R, Pavone P. Conservation status of habitats (Directive 92/43 EEC) of coastal and low hill belts in a Mediterranean biodiversity hot spot. *Plant Biosyst* 2013;147:1006–1028.

37. Marongiu B, Piras A, Desogus E, Porcedda S, Ballero M. Analysis of the volatile concentrate of the leaves and flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman (Asteraceae) by supercritical fluid extraction and their essential oils. *J Essent Oil Res* 2003;15:120–126.
38. Leonardi M, Ambryszewska KE, Melai B i sur. Essential oil composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island. *Chem Biodiversity* 201;10:343–355.
39. Paolini J, Desjobert JM, Costa J. i sur. Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands. *Flav Fragr J* 2006;21:805–808.
40. Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C i sur. Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Ind Crops Prod* 2010;32: 639–649.
41. Bianchini A, Tomi P, Costa J, Bernardini AF. Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica. *Flav Fragr J* 2001;16:30–34.
42. Kladar NV, Anackov GT, Rat, M i sur. Biochemical ccharacterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: Phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties. *Chem Biodiversity* 2015;12:419–431.
43. Dzamic AM, Mileski KS, Ciric A, Ristic MS, Sokovic M, Marin PD. Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial properties of essential oil and deodorized extracts of *Helichrysum italicum* (Roth). *J Essent Oil Bear Plants* 2019;22:493–503.
44. Costa P, Loureiro JM, Teixeira MA, Rodrigues AE. Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO₂ from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal. *Ind Crops Prod* 2015;77:680–683.
45. Aćimović M, Ljujić J, Vulić J i sur. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil from Serbia: Chemical composition, classification and biological activity – May it be a suitable new crop for Serbia. *Agronomy* 2021;11(7):1282.