

Metode dobivanja i parametri procjene kakvoće eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



B. Bilandžija,^a L. Bilandžija,^a L. Pollak^b i S. Inić^{a*}

^a Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

^b Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Rockefellerova 7, 10 000 Zagreb

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. Cilj ovoga rada je istaknuti važnost standardizacije postupaka kao i definiranje raspona vrijednosti unutar kojih bi se trebali nalaziti parametri koji će služiti za procjenu kvalitete i čistoće eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja, uzimajući u obzir sve veći komercijalni interes za te pripravke. Ispitivanje kakvoće važno je radi utvrđivanja sigurnosti, ali i učinkovitosti primjene eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja, što ujedno otvara mogućnost njihove šire primjene u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Određivanje relativne gustoće, indeksa refrakcije, kiselinskog broja, pH vrijednosti, mutnoće i sadržaja eteričnog ulja već se primjenjuje kao standard za utvrđivanje kvalitete oficinalnih eteričnih ulja u europskoj farmakopeji. Uvođenje standardiziranih postupaka za ispitivanje kvalitete i čistoće eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja pomoglo bi boljoj analitičkoj kontroli tih pripravaka na tržištu.

Ključne riječi

Eterično ulje smilja, hidrolat, macerat, ispitivanje kvalitete, fizikalni i kemijski parametri

1. Uvod

Ljekovito i aromatično bilje već se stoljećima upotrebljava u tradicionalnoj medicini za liječenje različitih bolesti jer sadrži komponente koje imaju odgovarajuću terapijsku vrijednost. Jedna od takvih biljaka je i smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, Asteraceae), tipična mediteranska ljekovita biljka s eteričnim uljem koja je našla primjenu u tradicionalnoj medicini za liječenje poremećaja probavnog i dišnog sustava te kože. Zbog svojih dokazanih pozitivnih bioloških učinaka sve je veći interes farmaceutske i kozmetičke industrije za eteričnim uljem i drugim pripravcima smilja.^{1,2} Proveden je velik broj istraživanja, ali su ona uglavnom usmjerena na sastav i djelovanje eteričnog ulja smilja^{3–5} i ekstrakata smilja u različitim organskim otapalima (najčešće aceton, metanol i etanol),^{6–8} a s obzirom na sve širu primjenu eteričnog ulja vrste *H. italicum* važno je provesti ispitivanje njegove kvalitete. Pojedine farmakopeje za svako oficinalno eterično ulje propisuju granične vrijednosti za fizikalne i kemijske konstante na temelju kojih se prosuđuju njegova kakvoća i ispravnost.⁹ Eterično ulje smilja nije oficinalno u europskoj farmakopeji, što otežava ispitivanje njegove kakvoće i moguću primjenu u farmaciji, iako postoje brojni radovi o kvaliteti eteričnog ulja smilja, pa čak i pozitivno mišljenje Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) o svijetu pješčarskog smilja (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench).¹⁰ Među različitim preparatima smilja važno mjesto pripada maceratu i hidrolatu smilja koji se primjenjuju u medicini, kozmetičkoj industriji, industriji mirisa te u prehrambenoj industriji. Unatoč sve većoj uporabi macerata i hidrolata, nisu precizno definirani standardi kvalitete tih proizvoda.^{11–13}

2. Dobivanje eteričnog ulja smilja

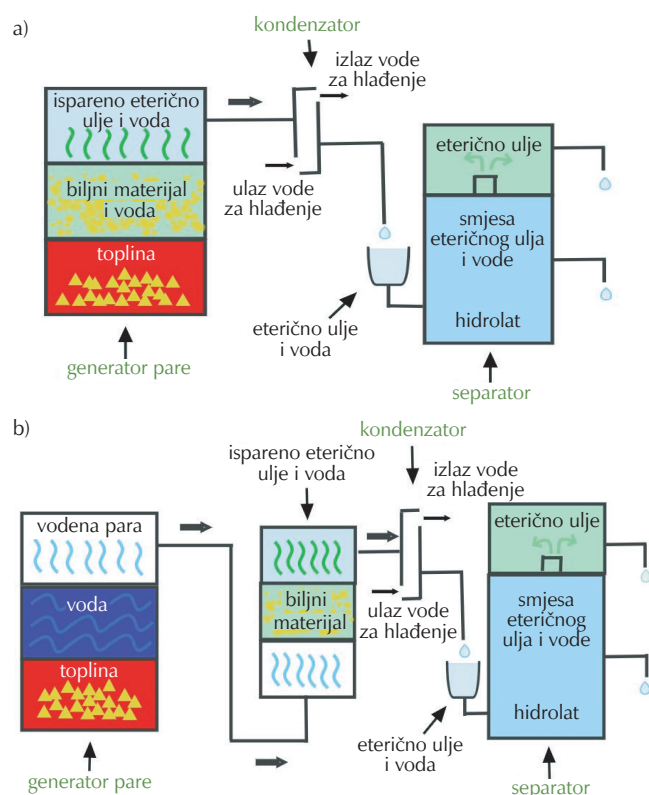
Eterično ulje je smjesa hlapljivih, lipofilnih sastavnica izoliranih iz biljnih dijelova. Način dobivanja eteričnog ulja ovisi o biljnom materijalu koji se upotrebljava kao sirovina za dobivanje ulja, o prisutnosti termostabilnih ili termolabilnih sastavnica u eteričnom ulju te o količini i lokalizaciji eteričnog ulja.^{14,15}

U brojnim studijama koje su provedene biljne sastavnice vrste *H. italicum* izolirane su sljedećim postupcima: vodenom destilacijom^{16,17} i parnom destilacijom,^{18,19} ekstrakcijom superkritičnim fluidom^{20,21} te ekstrakcijom s organskim otapalom.^{22,23}

Metodom vodene destilacije, koja se najčešće primjenjuje te parne destilacije (slika 1) izolira se eterično ulje koje uglavnom sadrži terpeneske sastavnice (α -pinen, limonen, nerol, neril acetat, α - i β -selinen, γ -kurkumen), ali i druge spojeve među kojima su važni β -diketoni poznati i kao itolidioni. Iako su metode destilacije jednostavne i ne zahtijevaju dodatno pročišćavanje dobivenog produkta, njihov nedostatak je mali prinos eteričnog ulja (do 0,78 %).¹⁶

Kod ekstrakcije sa superkritičnim fluidom (engl. *supercritical fluid*, SCF) kao fluid najčešće se upotrebljava ugljikov dioksid (engl. *supercritical carbon dioxide*, SC-CO₂) zbog brojnih prednosti u odnosu na druga ekstrakcijska sredstva. Niska vrijednost kritičnih parametara (temperatura 30,9 °C i tlak 73 800 kPa) čini ga pogodnim za izolaciju termolabilnih sastavnica. Osim toga, ima veliku moć difuzije i nalazi se u plinovitom stanju pri sobnoj temperaturi i tlaku, pa se lako uklanja iz ekstrahiranog produkta. Također, SC-CO₂ nije toksičan i zapaljiv, ekološki je prihvatljiv i prihvatljive je cijene.²⁴ Ekstrakcija pomoću SC-CO₂ osigurava veći prinos eteričnog ulja (do 6,31 %) te značajniju prisutnost se-

* Autor za dopisivanje: izv. prof. dr. sc. Suzana Inić
e-pošta: sinic@pharma.hr



Slika 1 – Shematski prikaz postupka: a) vodene destilacije; b) parne destilacije

Fig. 1 – Schematic diagram of: a) hydrodistillation; b) steam distillation

skviterpena (α -selinen, β -selinen, α -kurkumen, kariofilen) i voskova (zbog povećanog tlaka) u eteričnom ulju.¹⁶

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, floglucinoli, tremetoni, kumarini i kumarati, fenolne kiseline i esteri), zatim pironi, lipidi i steroidi, a dobiveni prinosi su veliki (do 19,77 %) zbog male selektivnosti organskih otapala. Nedostatci ovog postupka su gubitak hlapljivih sastavnica eteričnog ulja prilikom otparavanja organskog otapala te mogućnost zaostajanja organskih otapala u eteričnom ulju.^{9,16}

3. Eterično ulje smilja

Eterično ulje smilja sadrži monoterpe (α -pinen, limonen, nerol, geraniol, neril acetat, geranil acetat), seskviterpe (α -selinen, β -selinen, β -kariofilen, γ -kurkumen) i β -diketone. U nekim studijama najzastupljenija skupina spojeva u eteričnom ulju smilja bili su seskviterpenski ugljikovodici,^{25,26} dok su u nekim studijama to bili monoterpenski spojevi.²⁷ Ipak, od pojedinačnih spojeva dominantne sastavnice eteričnog ulja smilja uzgojenog na području Hrvatske su α -pinen (monoterpenski ugljikovodik), α - i γ -kurkumen (seskviterpenski ugljikovodici) te neril acetat (oksigenirani monoterpen).²⁸ Razlike u sastavu eteričnog ulja vrste *H. italicum* s različitih lokacija u Hrvatskoj i drugih mediteranskih područja prikazane su u tablici 1.

Tablica 1 – Sastav eteričnog ulja vrste *H. italicum* s različitih lokacija u Hrvatskoj i drugim mediteranskim državama

Table 1 – Composition of *H. italicum* essential oil from different locations in Croatia and other Mediterranean countries

Lokalitet	Metode identifikacije	Broj identificiranih komponenti	Ukupni postotak identificiranih komponenti / %	Glavne sastavnice	Literatura
različite lokacije duž Jadranske obale	GC-FID GC-MS	32	–	α -pinen, α -terpineol, neril acetat, α -cedren, <i>i</i> -italicen, α -kurkumen, γ -kurkumen, spatulenol	26
otok Amorgos, Grčka	GC-FID GC MS	24	82,06	geraniol, geranil acetat, E-nerolidol, neril acetat	29
Toskana, Sardinija, Korzika	GC-FID GC-MS ¹³ C NMR	45	84,5 – 94,2	α -pinen, neril acetat, β -selinen, β -kariofilen, α -selinen, neril propionat, β -diketoni, nerol, linalol, eudezm-5-en-11-ol	30
Split	GC-MS	52	90,6	α -pinen, α -cedren, aromadendren, β -kariofilen, neril acetat, geranil acetat	31

Tablica 1 – (nastavak)
Table 1 – (continued)

Lokalitet	Metode identifikacije	Broj identificiranih komponenti	Ukupni postotak identificiranih komponenti /%	Glavne sastavnice	Literatura
otoci toskanskog arhipelaga	GC-FID GC-MS ¹³ C NMR	49	83,6 – 97,7	nerol, neril acetat, neril propionat, β -diketoni, eudezm-5-en-11-ol, γ -kurkumen, α -pinen, limonen, ar-kurkumen	32
otok Elba, Toskana	GC-FID GC-MS	18	91,8	neril acetat, α -pinen, limonen, γ -kurkumen, neril propionat, nerol	33
nacionalni park Cilento i Vallo di Diano, Kampanija	GC-FID GC-MS	44	90,0	izoitalicen epoksid, 8-cedren-13-ol, (Z)- α -trans- bergamotol, β -kostol	34
otok Elba, Toskana	GC-FID GC-MS	115	96,8 – 99,8	nerol, neril acetat, eudezm-5-en-11-ol, γ -kurkumen, α -pinen, limonen, 1,8-cineol, neril propanoat	35
Brač, Biokovo, Tijarica, Makarska	GC-MS	97	47,3 – 66,7	neril acetat, α -trans-bergamoten, α -humulen, β -akoradien, ar-kurkumen, rosifoliol	36
otok Sardinija	GC-MS	34	–	nerilacetat, eudezmen-7-(11)-en-4-ol, neril propionat, γ -kurkumen,	17
Zadar, Šibenik, Knin	GC-MS	38	98,6	α -pinen, γ -kurkumen, neril acetat, β -selinen, izotalicen, β -kariofilen, α -kurkumen	28
Botanički vrt Sveučilišta u Rimu	GC-MS	20	–	neril acetat, α -pinen, nerol, neril fenilacetat, β -kariofilen, bisabolen, azulen	3

4. Hidrolat smilja

Hidrolat ili cvjetna vodica vodena je otopina zasićena pojedinim sastavnicama eteričnog ulja koja nastaje kao nusprodukt destilacije biljnog materijala. Hidrolat smilja je kisela tekućina (pH u rasponu od 3,5 do 3,8) koja obično sadrži manje od 1 g l⁻¹ (tj. 0,10 %) hlapljivih organskih spojeva iz eteričnog ulja, koji ostaju otopljeni u vodenoj fazi prilikom destilacije eteričnog ulja.^{11,13,37} S obzirom na to da hidrolat

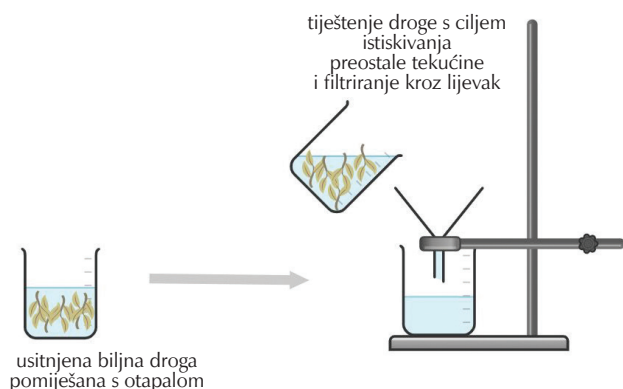
sadrži pretežno hidrofilne tvari iz eteričnog ulja, u hidrolatu smilja dominiraju oksigenirane komponente (kiseline, monoterpeni alkoholi, aldehidi, ketoni, seskviterpeni alkoholi i ketoni), dok su hidrofobni monoterpeni i seskviterpeni ugljikovodici znatno manje zastupljeni zbog slabije topljivosti u vodi.^{11,13,38,39}

Hidrolati su općenito zbog svojih bioloških učinaka i organoleptičkih svojstava pronašli primjenu u kozmetičkoj in-

dustriji gdje sve više zamjenjuju vodu, osiguravajući dodatne aktivne sastavnice kozmetičkom pripravku (primjerice, upotrebljavaju se kao vodena faza u proizvodnji krema, losiona i sapuna). Osim kozmetičke, upotrebljavaju se i u industriji parfema, zatim u aromaterapiji za smanjenje stresa i anksioznosti te kao repelenti protiv kukaca.¹¹ Hidrolat smilja ima analgetsko, antiinfektivno, protuupalno, antikoagulantno, ekspektorirajuće, lipolitično, mukolitično i sedativno djelovanje. Posjeduje također regenerirajući učinak pa pomaže ublažiti vidljivost svježih ožiljaka, potiče brže zacjeljivanje rana, masnica i upalnih stanja kože, a učinkovit je i u liječenju paradontoze i gingivitisa. Hidrolat se može primjenjivati i kao tonik za čišćenje lica te za njegu kože lica. Zbog svojih učinaka, mirisa i mogućnosti lokalne primjene bez razrjeđivanja, hidrolat smilja nalazi primjenu u kozmetičkoj industriji te industriji sapuna i mirisa.^{1,37}

5. Macerat smilja

Macerat je pripravak koji se dobiva postupkom maceracije, odnosno ekstrakcije koja se odvija pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku, ostavljanjem biljne droge određeno vrijeme u otapalu (slika 2). Postupak ekstrakcije sastavnica iz biljne droge uključuje nekoliko koraka: penetraciju otapala u čvrsti matriks biljne droge, otapanje sastavnica droge u otapalu, difuziju otopljenog tvari iz čvrstog matriksa i skupljanje ekstrahiranih sastavnica.



Slika 2 – Shematski prikaz postupka maceracije

Fig. 2 – Schematic diagram of maceration procedure

Na učinkovitost procesa ekstrakcije, odnosno na količinu ekstrahiranih aktivnih biljnih sastavnica iz smilja, utječu brojni faktori. Odabir otapala za ekstrakciju jedan je od najvažnijih faktora zato što o njemu ovisi polarnost ekstrahiranih sastavnica. Uglavnom se odabir otapala temelji na načelu da se slično otapa u sličnome, pa se tako za izolaciju hidrofilnih sastavnica upotrebljavaju polarnija otapala (metanol, etanol, aceton, diklormetan), a za izolaciju lipofilnih sastavnica primjenjuju se nepolarnija otapala (primjerice masna ulja). Drugi značajni čimbenici su veličina čestica biljne droge, omjer otapalo-biljna droga, duljina trajanja ekstrakcije i temperatura. Čestice manje veličine, koje omogućuju bolju penetraciju otapala i difu-

ziju sastavnica, veći omjer otapalo-biljna droga, dulje trajanje ekstrakcije i veća temperatura povećavaju učinkovitost ekstrakcije. Ipak, produljenje postupka ekstrakcije nakon nekog razdoblja, kad se već uspostavila ravnoteža, neće više imati utjecaj na učinkovitost ekstrakcije, a previsoka temperatura pri kojoj se ekstrakcija provodi može dovesti do razgradnje termolabilnih sastavnica.

Stoga su prednosti procesa maceracije, osim jednostavnosti, i to što se odvija pri sobnoj temperaturi, pa ne dolazi do razgradnje termolabilnih sastavnica, dok su glavni nedostaci dugo vrijeme potrebno za ekstrakciju te mala učinkovitost ekstrakcije. Aktivne komponente, prisutne u maceratu smilja dobivenom ekstrakcijom s biljnim uljem uključuju: monoterpene, seskviterpene, oksigenirane monoterpene, fenolne komponente i karotene. Kao i hidrolat smilja, macerat smilja (slika 3) najčešće se primjenjuje u medicinske i kozmetičke svrhe, i to za tretiranje suhe, oštećene i iritirane kože, akni, dermatitisa, ekcema i psorijaze, hematoma i varikoznih vena, opeklina, ožiljaka i strija te kože sklone upalama. Upotrebljava se također za odgađanje procesa starenja kože, protiv bora i pigmentnih mrlja.^{13,40}



Slika 3 – Macerat smilja

Fig. 3 – Immortelle macerate

6. Ispitivanje čistoće i kvalitete eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja

Farmakopeje za svako oficinalno eterično ulje propisuju granične vrijednosti za fizikalne parametre (relativna gustoća, indeks refrakcije, optička rotacija, krutište, vrelište i topljivost) i kemijske parametre (kiselinski, peroksidni i saponifikacijski broj) na temelju kojih se prosuđuju kakvoća i ispravnost eteričnog ulja.^{9,41} Razlike u vrijednostima tih parametara ukazuju na razlike u kvaliteti pojedinog eteričnog ulja, na moguće postojanje onečišćenja i na razlike u biljnom materijalu iz kojeg se ulje dobiva.¹⁵ S obzirom na to da eterično ulje smilja nije oficinalno u europskoj farmakopeji, ne postoje precizno definirana ispitivanja niti vrijednosti ispitivanih parametara koji bi predstavljali standard za kvalitetu i čistoću eteričnog ulja smilja. Također, nisu točno definirana niti ispitivanja kojima se procjenjuju kakvoća i ispravnost, odnosno standardi kvalitete hidrolata

smilja.^{11,12} Isto vrijedi i za macerat smilja. Stoga, uzimajući u obzir sve širu primjenu eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja u medicinske, kozmetičke i druge svrhe, javlja se potreba za definiranjem i standardiziranjem ispitivanja te za određivanjem referentnih vrijednosti fizikalnih i kemijskih parametara koji bi se primjenjivali u procjeni čistoće i kvalitete eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja. Određivanje fizikalnih parametara, poput relativne gustoće i indeksa refrakcije, kemijskih parametara, poput kiselinskog broja te pH-vrijednosti, mutnoće i sadržaja eteričnog ulja, moglo bi biti korisno u ispitivanju kvalitete komercijalnih preparata smilja.

7. Relativna gustoća

Relativna gustoća je važan kriterij čistoće eteričnih ulja, biljnih masnih ulja (iako se za masna ulja u novijim izdanjima farmakopeje izostavlja) i tekućih ekstrakata poput macerata. Osim toga, na temelju relativne gustoće mogu se dobiti neki podaci o kemijskom sastavu eteričnog ulja. Tako je relativna gustoća za eterična ulja koja sadrže veću količinu terpena ispod 0,900, a za ona koja sadrže veću količinu aromatičnih sastojaka iznad 1,000.^{9,15,41} Relativna gustoća predstavlja omjer mase određenog volumena ispitivane tvari na temperaturi t_1 i mase istog volumena vode na temperaturi t_2 , a uglavnom se mjeri pri temperaturi od 20 °C (osim ako nije drugačije navedeno). S obzirom na to da gustoća ovisi o temperaturi, bitno je navesti temperaturu kod koje se mjeri relativna gustoća. Relativna gustoća može se odrediti pomoću hidrostatske vage (krutine), hidrometra (tekućine), digitalnog mjerača gustoće s oscilirajućim transduktorom (tekućine ili plinovi) ili piknometra (krutine ili tekućine).⁴¹ Piknometar je staklena bočica s čepom baždarena na određenu temperaturu (najčešće na temperaturu od 20 °C) pri kojoj će tekućina kojoj se određuje relativna gustoća zauzimati uvijek isti volumen naznačen na piknometru.⁴² Mjerenjem mase suhog piknometra (p), mase piknometra s destiliranom vodom (p_1) i mase piknometra s uzorkom (p_2) u gramima pri temperaturi od 20 °C može se izračunati relativna gustoća (ρ) uzorka prema jedn. (1).

$$\rho = \frac{p_{\text{uzorka}}}{p_{\text{vode}}} = \frac{p_2 - p}{p_1 - p} \quad (1)$$

Relativna gustoća eteričnog ulja smilja iznosi 0,875 – 0,925 pri temperaturi od 20 °C.⁴³ Uzorci macerata trebali bi, s obzirom na to da sadrže biljno ulje, ali i ekstrahirane sastavnice smilja, među kojima i eterično ulje, imati relativnu gustoću manju od gustoće vode, a veću od gustoće biljnog ulja u kojem je macerat izrađen. Stoga bi se u praksi, primjerice, mogle primjenjivati vrijednosti relativne gustoće macerata smilja u maslinovom ulju između 0,920 i 0,990 s obzirom na to da je vrijednost relativne gustoće maslinova ulja pri 20 °C između 0,910 i 0,916, a vode je 1,000. Vrijednosti relativne gustoće uzorka hidrolata očekivano bi trebale biti veće od vrijednosti određenih za eterično ulje smilja zbog sastava hidrolata, koji pretežno čini voda, dok je sadržaj hlapljivih organskih spojeva iz eteričnog ulja obično manji od 1 g l⁻¹ (tj. 0,10 %). Relativna gustoća hidrolata smilja bi, prema tome, trebala biti veća od 1,000,

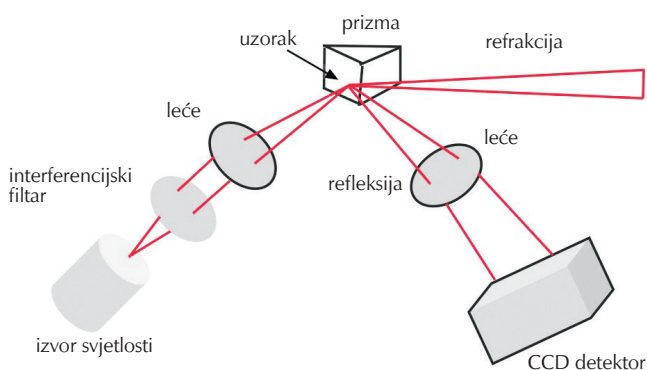
što se slaže i s vrijednostima relativne gustoće hidrolata ružmarina (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) odnosno timijana (*Thymus vulgaris*, Lamiaceae), koje iznose između 1,003 i 1,005 odnosno između 1,010 i 1,015.⁴⁴

8. Indeks refrakcije

Indeks refrakcije služi kao jednostavan pokazatelj čistoće i kvalitete eteričnih i masnih ulja.⁴¹ Indeks refrakcije eteričnih ulja nije karakteristična vrijednost za pojedino eterično ulje, već je karakteristična vrijednost za pojedine sastavnice eteričnog ulja, odnosno na iznos indeksa refrakcije utječe kemijski sastav eteričnog ulja. Indeks refrakcije masnih ulja također ovisi o kemijskom sastavu ulja, odnosno o udjelu nezasićenih masnih kiselina u tom ulju. Općenito, trigliceridi u masnim uljima imaju veći indeks refrakcije od odgovarajućih masnih kiselina.⁹ Indeks refrakcije eteričnog ulja smilja pri 20 °C iznosi 1,470 – 1,490.⁴³ Za indeks refrakcije hidrolata očekuje se da će biti blizak vrijednosti indeksa refrakcije vode s obzirom na to da više od 99 % sastava hidrolata čini voda. Vrijednosti indeksa refrakcije za hidrolat ružmarina iznose između 1,334 i 1,336, a za hidrolat timijana iznose između 1,335 i 1,338, što pokazuje da su vrijednosti indeksa refrakcije hidrolata veće od indeksa refrakcije vode, koji pri 20 °C iznosi 1,3330.⁴⁴ Stoga bi i vrijednosti indeksa refrakcije hidrolata smilja u praksi trebale biti veće od 1,3330. Indeks refrakcije macerata smilja ovisit će ponajprije o sastavu biljnog ulja u sastavu macerata te o sastavnicama smilja ekstrahiranim u tom maceratu. Kako indeks refrakcije maslinova ulja pri 20 °C iznosi između 1,4677 i 1,4705, u praksi bi se mogle primjenjivati vrijednosti indeksa refrakcije macerata smilja u maslinovom ulju između 1,4690 i 1,4745, što je usporedivo i s vrijednostima indeksa refrakcije macerata gospine trave (*Hypericum perforatum*, Hypericaceae) u maslinovom ulju, koji iznosi između 1,4670 i 1,4693.⁴⁵ Indeks refrakcije određuje se uz pomoć refraktometra, a najčešće se određuje relativni indeks loma nekog sredstva u odnosu na zrak, pa je tako, prema farmakopeji, indeks loma ili refrakcije (n_{λ}) nekog sredstva u odnosu na zrak jednak omjeru sinusa kuta upada zrake svjetlosti i sinusa kuta loma zrake svjetlosti pri prelasku zrake svjetlosti iz zraka u dani medij.⁴¹ S obzirom na to da vrijednost indeksa refrakcije ovisi o temperaturi i valnoj duljini, bitno je definirati pri kojoj se temperaturi i valnoj duljini indeks refrakcije određuje. Ako nije drugačije propisano, indeks loma mjeri se na temperaturi od 20 ± 0,5 °C s obzirom na valnu duljinu D-linije natrijeva spektra ($\lambda = 589,3$ nm).⁴¹

Refraktometar mjeri granični kut totalne refleksije. Granični kut (α_g) je kut upada zrake svjetlosti za koji kut loma iznosi 90°. Pri tome svjetlost uopće ne prelazi u drugo sredstvo, već se u potpunosti reflektira, a ta se pojava naziva totalna refleksija. Refraktometar (slika 4) se sastoji od izvora svjetlosti, interferencijskog filtra, leća, prizme i CCD detektora (engl. *charge-coupled device*). Izvor emitira svjetlost koja prolazi kroz interferencijski filter, koji osigurava svjetlost točno određene valne duljine. Konvergentne leće usmjeravaju zrake svjetlosti prema prizmi poznatog indeksa refrakcije, koja je u kontaktu s ispitivanom tekućinom kojoj se određuje indeks refrakcije. Zrake svjetlosti koje na granicu tih dvaju sredstva (prizme i ispitivane tekućine

ne) upadnu pod kutom većim od graničnog kuta potpuno će se 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, refraktometar određuje indeks refrakcije ispitivane tekućine.⁴⁶



Slika 4 – Shematski prikaz refraktometra
Fig. 4 – Schematic diagram of refractometer

9. Kiselinski broj

Određivanje kiselinskog broja primjenjuje se u ispitivanju kakvoće eteričnih ulja i biljnih masnih ulja, a moglo bi se primjenjivati i u ispitivanju kakvoće macerata zato što ukazuje na sadržaj slobodnih kiselina prisutnih u uzorku.⁴¹ Kiselinski broj, odnosno sadržaj slobodnih kiselina, veći je ako je uzorak dulje stajao skladišten, budući da stajanjem dolazi do oksidacije aldehida i hidrolize estera prisutnih u uzorku ili ako je uzorak nepravilno skladišten, primjerice ako je izložen utjecaju vlage, pri čemu dolazi do hidrolize estera prisutnih u uzorku.^{9,14} Kiselinski broj maslinova ulja ne smije biti veći od 0,4, određivano na 1,0 g uzorka. Za macerat smilja u maslinovom ulju vrijednosti kiselinskog broja bile bi nešto veće (0,5) zbog sadržaja eteričnog ulja i ostalih sastavnica macerata. To je u skladu i s vrijednošću kiselinskog broja macerata gospine trave u maslinovom ulju koji iznosi 0,5.⁴⁵

Kiselinski broj označava masu kalijeva hidroksida (KOH) u miligramima potrebnu za neutralizaciju slobodnih kiselina prisutnih u jednom gramu ispitivane tvari, a određuje se titracijom propisane količine ispitivanog uzorka (m_{uzorak}), 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. Kiselinski broj izračuna se iz utrošenog volumena KOH ili NaOH u mililitrima te iz mase uzorka u gramima prema jedn. (2).⁴¹

$$\text{kiselinski broj} = \frac{5,610 \cdot V_{0,1M \text{ KOH/NaOH}}}{m_{\text{uzorak}}} \quad (2)$$

10. pH-vrijednost

Mjerenje pH-vrijednosti ispitivanih uzoraka primjenjuje se za određivanje njihove kiselosti ili lužnatosti, odnosno za određivanje prisutnosti kiselih i lužnatih onečišćenja u uzorcima. Kisela i lužnata onečišćenja mogu, među ostalim, potjecati od razgradnje sastavnica uzorka zbog čega se određivanje pH-vrijednosti primjenjuje u ispitivanju čistoće uzoraka, a ukazuje i na kemijsku stabilnost uzoraka.⁴¹

pH-vrijednost predstavlja negativni dekadski logaritam aktiviteta vodikovih (H^+) iona. pH-vrijednost otopine određuje se potenciometrijski, mjerenjem razlike potencijala između dviju elektroda koje su uronjene u ispitivanu otopinu. Jedna elektroda je indikatorska ili radna elektroda (obično staklena elektroda) koja je osjetljiva na vodikove ione, odnosno njezin potencijal ovisan je o aktivitetu H^+ iona u ispitivanoj otopini. Druga elektroda je referentna elektroda (obično zasićena kalomel elektroda) čiji je potencijal konstantan te ona služi kao standard prema kojem se mjeri potencijal radne elektrode.⁴¹ Ako su staklena i referentna elektroda sastavljene zajedno, one čine kombiniranu pH-elektrodu. Razlika potencijala mjeri se uz pomoć voltmetra koji mora imati nekoliko desetaka puta veći otpor od otpora članka kojemu se mjeri potencijal. Takvi voltmetri s velikim unutarnjim otporom od 10^{11} do $10^1 \Omega$ nazivaju se pH-metrima.⁴⁷ Prije mjerenja pH-vrijednosti ispitivanih uzoraka, pH-metar se mora kalibrirati uz pomoć standardnih otopina pufera poznatih pH-vrijednosti. Iz izmjerenog potencijala standardne otopine (E_s) izraženog u voltima (V) i njezina poznatog pH (pH_s), mjerenjem potencijala ispitivanog uzorka (E), pH-metar može odrediti nepoznati pH uzorka (pH) prema sljedećoj jednadžbi:

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k} \quad (3)$$

gdje je k konstanta koja označava promjenu potencijala po jedinici promjene pH izraženu u voltima. S obzirom na to da k ovisi o temperaturi kao i pH-vrijednost, važno je navesti temperaturu pri kojoj se provode mjerenja pH, a najčešće je to temperatura između 20 i 25 °C (osim ako nije drugačije navedeno).⁴¹

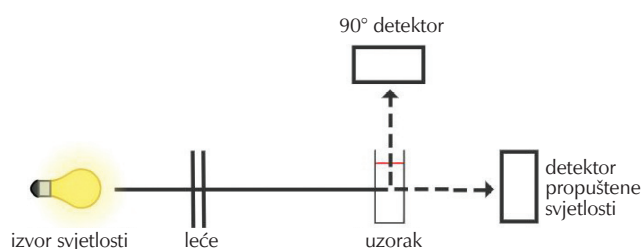
Hidrolati su kisele tekućine i njihova se pH-vrijednost kreće između 4,5 i 5,5, premda pH hidrolata može varirati ovisno o vrsti biljne droge iz koje se dobiva. Tako se, primjerice, pH-vrijednost hidrolata smilja kreće između 3,5 i 3,8. Osim što ukazuje na prisutnost kiselih i lužnatih onečišćenja, pH-vrijednost hidrolata utječe i na njegove terapijske učinke, posebice na inhibitorski učinak na bakterije, koji je izraženiji što je hidrolat kiselij. ^{11,37}

11. Mutnoća

Mutnoća (engl. *turbidity*) je mjera zamućenosti tekućina koja služi kao jednostavan pokazatelj kakvoće vode. Mjerenjem mutnoće može se odrediti i koncentracija čvrste tvari u suspenziji. Osim o suspendiranim česticama, mutnoća ovisi i o prisutnosti organskih tvari i ostalih plutajućih ostataka te mjehurića zraka. Mjerenje mutnoće jednostavan je pokazatelj kakvoće vode pa tako i kakvoće hidro-

lata. Osim što prisutnost zamućenja nije prihvatljiva zbog estetskog izgleda, ona ukazuje i na moguću prisutnost kemijskih i mikrobnih onečišćenja.⁴⁸ Vrijednosti mutnoće za hidrolat smilja nisu dostupne u literaturi, ali prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije vrijednost mutnoće pitke vode trebala bi iznositi < 5 NTU, a u idealnom slučaju < 1 NTU.⁴⁹ S obzirom na to da sastav hidrolata pretežno čini voda, vrijednosti mutnoće za hidrolat smilja trebale bi iznositi < 5 NTU.

Mutnoća se mjeri uz pomoć turbidimetra, a rezultati mjerenja izražavaju se u NTU (engl. *Nephelometric Turbidity Units*) jedinicama. Turbidimetar se sastoji od izvora svjetlosti, leće koja usmjerava snop svjetlosti kroz uzorak i fotoelektričnih detektora koji mjere intenzitet propuštene svjetlosti i svjetlosti raspršene pod kutem od 90° (slika 5).



Slika 5 – Shematski prikaz turbidimetra

Fig. 5 – Schematic diagram of turbidimeter

Mjerenje mutnoće turbidimetrom zasniva se na slanju snopa upadne svjetlosti definiranih karakteristika prema uzorku, pri čemu se dio svjetlosti apsorbira, dio prolazi kroz uzorak, a dio svjetlosti se rasprši na česticama uzorka. Kod standardnog turbidimetra (engl. *non-ratio turbidimeter*) detektor mjeri samo intenzitet raspršene svjetlosti pod kutem od 90° u odnosu na upadnu svjetlost, dok turbidimetar omjera (engl. *ratio turbidimeter*) ima dva detektora: detektor koji mjeri intenzitet raspršene svjetlosti i detektor koji mjeri intenzitet propuštene svjetlosti. Za kalibraciju turbidimetra primjenjuju se standardi koji imaju poznatu vrijednost mutnoće, kao što je, primjerice, suspenzija formazina. Vrijednost mutnoće suspenzije formazina iznosi 4000 NTU, a ona služi kao primarni standard iz kojeg se pripremaju druge referentne suspenzije s manjim vrijednostima mutnoće (3, 6, 18 i 30 NTU).^{41,48}

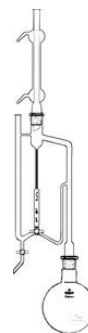
12. Sadržaj eteričnog ulja

Sadržaj eteričnog ulja u biljnim drogama određuje se metodom destilacije, a određivanje se temelji na svojstvu hlapljivosti eteričnih ulja s vodenim parama. Sam postupak destilacije može se provesti na nekoliko načina, ovisno o svojstvima eteričnog ulja, o njegovoj relativnoj gustoći i kemijskom sastavu, a sadržaj eteričnog ulja može se odrediti volumetrijski (očitava se volumen izoliranog eteričnog ulja) ili gravimetrijski (određuje se masa izoliranog eteričnog ulja).^{9,15} Prinos eteričnog ulja smilja najveći je prije cvjetanja (0,21 %) i u fazi kasnih ljetnih izbojaka (0,35 %), a

najmanji u fazi formiranja cvata (0,06 %). Stoga se biljni materijal za dobivanje eteričnog ulja bere u vrijeme cvatnje kad je otvoreno 50 % cvjetova u nasadu, jer je tad količina eteričnog ulja najveća.^{1,26,50}

Određene količine eteričnog ulja očekuju se i u hidrolatu i u maceratu smilja. Hidrolat je zasićen hidrofilnijim, a macerat obično lipofilnijim sastavnicama eteričnog ulja, što proizlazi iz različitog načina dobivanja tih pripravaka.⁹

Sadržaj eteričnog ulja u biljnim drogama kao i u hidrolatu i maceratu smilja može se odrediti volumetrijski, metodom vodene destilacije po Ungeru. Shematski prikaz aparature za određivanje eteričnih ulja po Ungeru prikazan je na slici 6.



Slika 6 – Shematski prikaz aparature po Ungeru za određivanje sadržaja eteričnih ulja

Fig. 6 – Schematic diagram of Unger's apparatus for determination of essential oils content

Kod određivanja sadržaja eteričnog ulja u biljnom materijalu, postupak vodene destilacije uključuje zagrijavanje biljnog materijala u vodi. Za određivanje sadržaja eteričnog ulja u hidrolatu ili maceratu, zagrijava se određeni volumen uzorka (hidrolata ili macerata) i vode.

Zagrijavanjem dolazi do isparavanja eteričnog ulja i vode. Nastale pare kondenziraju se u hladilu te se dobiveni kondenzat skuplja u građiranoj cijevi, pri čemu se eterično ulje smilja zadržava u gornjem dijelu građirane cijevi, iznad vode, budući da ima gustoću manju od gustoće vode.

S obzirom na brojna pozitivna terapijska svojstva eteričnog ulja smilja, poželjna je njegova prisutnost u hidrolatu i maceratu smilja. Razlike u sadržaju eteričnog ulja u uzorcima hidrolata i macerata mogu biti posljedica razlika u biljnom materijalu koji je upotrijebljen za njihovo dobivanje te razlika u uvjetima pri kojima se provodi postupak destilacije odnosno postupak maceracije (primjerice, količina eteričnog ulja u maceratu ovisi o ekstrakcijskom otapalu, veličini čestica biljne droge, omjeru otapalo-biljna droga, duljini trajanja ekstrakcije i temperaturi). Razlike u sadržaju eteričnog ulja i drugih sastavnica smilja u hidrolatu i maceratu nastaju i kao posljedica različitog geografskog podrijetla smilja i različitih okolišnih uvjeta (temperature, oborina, izloženosti suncu) kojima je smilje bilo izloženo. Istraživanja koja su provedena pokazala su utjecaj staništa

na kojem biljka raste i to posebno vrste tla,³⁵ zatim stadija razvoja biljke,²⁶ nadmorske visine i klimatskih čimbenika^{17,36} na količinu i sastav eteričnog ulja smilja. U literaturi su dostupni podatci iz nekoliko studija o sadržaju eteričnog ulja smilja prikupljenog na području Hrvatske. Sadržaj eteričnog ulja smilja prema *Malenica Staver i sur.* iznosio je 0,02 %, ²⁸ prema *Čavar Zeljković i sur.* bio je između 0,02 i 0,12 %, ³⁶ prema *Mastelic i sur.* iznosio je 0,12 %, ³¹ a prema *Blažeković i sur.* bio je od 0,08 do 0,32 %.²⁶ Kako hidrolat i macerat sadrže manju količinu eteričnog ulja, može se očekivati da će sadržaj eteričnog ulja u navedenim pripravcima biti manji od prethodno navedenih vrijednosti iz provedenih studija.

13. Zaključak

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je aromatična mediteranska biljka koja zbog svojih ljekovitih svojstava ima stoljetnu primjenu u tradicionalnoj medicini. Danas pripravnici smilja, u obliku eteričnog ulja, hidrolata i macerata, nalaze sve širu primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Stoga postoji potreba za definiranjem referentnih vrijednosti kemijskih i fizikalnih veličina za procjenu čistoće i kvalitete eteričnog ulja, hidrolata i macerata smilja koji bi uključivali relativnu gustoću, indeks refrakcije, kiselinski broj, pH-vrijednost, mutnoću i sadržaj eteričnog ulja.

Svi se navedeni parametri već primjenjuju za ispitivanje kakvoće eteričnih ulja biljnih droga koje su oficinalne u europskoj farmakopeji, a njihova standardizacija za eterično ulje, hidrolat i macerat smilja pridonijela bi većoj kvaliteti tih pripravaka na tržištu.

Popis kratica i simbola

List of abbreviations and symbols

EMA	– Europska agencija za lijekove – European Medicines Agency
SCF	– superkritični fluid – supercritical fluid
SC-CO ₂	– superkritični ugljikov dioksid – supercritical carbon dioxide
ρ	– relativna gustoća – relative density
ρ	– masa suhog piknometra, g – mass of dried pycnometer, g
ρ_1	– masa piknometra s destiliranom vodom, g – mass of pycnometer with distilled water, g
ρ_2	– masa piknometra s uzorkom, g – mass of pycnometer with sample, g
ρ_{uzorka}	– gustoća uzorka, g cm ⁻³ – density of sample, g cm ⁻³
ρ_{vode}	– gustoća vode, g cm ⁻³ – density of water, g cm ⁻³
n_{λ}^t	– indeks refrakcije – refractive index

λ	– valna duljina, nm – wavelength, nm
α_g	– granični kut, ° – critical angle, °
m_{uzorak}	– masa ispitivanog uzorka, g – mass of sample, g
KOH	– kalijev hidroksid – potassium hydroxide
NaOH	– natrijev hidroksid – sodium hydroxide
$V_{0,1\text{ M KOH/NaOH}}$	– volumen 0,1 M KOH ili NaOH, cm ³ – volume of 0.1 M KOH or NaOH, cm ³
pH _s	– pH standardne otopine – pH of standard solution
E	– potencijal ispitivane otopine, V – potential of test solution, V
E_s	– potencijal standardne otopine, V – potential of standard solution, V
k	– konstanta promjene potencijala po jedinici promjene pH, V – constant of the change in potential per pH change, V
NTU	– nefelometrijska jedinica zamućenja – Nephelometric Turbidity Unit

Literatura

References

1. M. Rajić, M. Bilić, K. Aladić, D. Šimunović, T. Pavković, S. Jokić, Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja, *Glasnik zaštite bilja* **38** (6) (2015) 16–26.
2. D. A. Viegas, A. Palmeira-de-Oliveira, L. Salgueiro, J. Martinez-de-Oliveira, R. Palmeira-de-Oliveira, *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data, *J. Ethnopharmacol.* **151** (2014) 54–65, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.005>.
3. A. Gismondi, G. Di Marco, A. Canini, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil: Composition and potential antineoplastic effect, *S. Afr. J. Bot.* **133** (2020) 222–226, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.031>.
4. S. Mollova, H. Fidan, D. Antonova, D. Bozhilov, S. Stanev, I. Kostova, A. Stoyanova, Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subspecies essential oils, *Turk. J. Agr. Forest.* **44** (2020) 371–378, doi: <https://doi.org/10.3906/tar-1909-34>.
5. D. Bouzid, W. Nouioua, E. Soltani, J.P. De Haro, M. Angeles Esteban, M. M.Zerroug, 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.* **25** (2017) 780–787, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.11.001>.
6. A. L. Garza, U. Etxeberria, A. Haslberger, E. Aumüller, J. A. Martinez, F. I. Milagro, *Helichrysum* and Grapefruit Extracts Boost Weight Loss in Overweight Rats Reducing Inflammation, *J. Med. Food.* **18** (8) (2015) 890–898, doi: <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0088>.
7. D. Rigano, C. Formisano, E. Pagano, F. Senatore, S. Piacente, M. Masullo, R. Capasso, A. A. Izzo, F. Borrelli, A new acetophenone derivative from flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*, *Fitoterapia* **99** (2014) 198–203,

- doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.09.019>.
8. J. Bauer, A. Koeberle, F. Dehm, F. Pollastro, G. Appendino, H. Northoff, A. Rossi, L. Sautebin, O. Werz, Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyl pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy *in vivo*, *Biochem. Pharmacol.* **81** (2011) 259–268, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.09.025>.
 9. D. Kuštrak, Farmakognozija fitofarmacija. Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb, 2005., str. 181, 195, 219–226.
 10. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-helichrysum-arenarium-l-moench-flos_en.pdf (20. 3. 2022.).
 11. M. G. Acimović, V. V. Tešević, K. T. Smiljanić, M. T. Cvetković, J. M. Stanković, B. M. Kiprovski, V. S. Sikora, Hydrolates – by-products of essential oil distillation: chemical composition, biological activity and potential uses, *Adv. Technol.* **9** (2) (2020) 54–70, doi: <https://doi.org/10.5937/savteh2002054A>.
 12. M. Politi, L. Menghini, B. Conti, S. Bedini, P. Farina, P.L. Cioni, A. Braca, M. De Leo, Reconsidering Hydrosols as Main Products of Aromatic Plants Manufactory: The Lavandin (*Lavandula intermedia*) Case Study in Tuscany, *Molecules* **25** (2020) 2225, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25092225>.
 13. S. Marković, Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka: temelji fitoaromaterapije. Centar Cedrus, Zagreb, 2010., str. 77, 176, 238, 245–247.
 14. J. L. Rios, Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined, u V. R. Preedy (ur.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, San Diego, 2015., str. 3–9.
 15. E. Kovač-Bešović, Metode u farmakognoziji. Sarajevo Publishing, Sarajevo, 2001., str. 109–120, 130–133.
 16. S. Maksimovic, V. Tadic, D. Skala, I. Zizovic, Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts, *Phytochemistry* **138** (2017) 9–28, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.001>.
 17. S. Melito, G. L. Petretto, J. Podani, M. Foddai, M. Maldini, M. Chessa, G. Pintore, Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition, *Ind. Crop. Prod.* **80** (2016) 242–250, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.014>.
 18. I. Morone-Fortunato, C. Montemurro, C. Ruta, R. Perrini, W. Sabetta, A. Blanco, E. Lorusso, P. Avato, Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm, *Ind. Crop. Prod.* **32** (2010) 639–649, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.023>.
 19. R. Perrini, I. Morone-Fortunato, E. Lorusso, P. Avato, Glands, essential oils and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman, *Ind. Crop. Prod.* **29** (2009) 395–403, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.07.010>.
 20. P. Costa, J. M. Loureiro, M. A. Teixeira, A. E. Rodrigues, Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO₂ from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal, *Ind. Crop. Prod.* **77** (2015) 680–683, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.042>.
 21. S. Maksimovic, Z. Kesic, I. Lukic, S. Milovanovic, M. Ristic, D. Skala, Supercritical fluid extraction of curry flowers, sage leaves, and their mixture, *J. Supercrit. Fluids.* **84** (2013) 1–12, doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.09.003>.
 22. A. L. Garza, U. Etxeberria, S. Palacios-Ortega, A. G. Haslberger, E. Aumueller, F. I. Milagro, J. A. Martinez, Modulation of hyperglycemia and TNF α -mediated inflammation by *Helichrysum* and grapefruit extracts in diabetic db/db mice, *Food Funct.* **5** (2014) 2120–2128, doi: <https://doi.org/10.1039/c4fo00154k>.
 23. D. Rigano, C. Formisano, F. Senatore, S. Piacente, E. Pagano, R. Capasso, F. Borrelli, A. A. Izzo, Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients, *J. Ethnopharmacol.* **150** (2013) 901–906, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.034>.
 24. L. Xu, X. Zhan, Z. Zeng, R. Chen, H. Li, T. Xie, S. Wang, Recent advances on supercritical fluid extraction of essential oils, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **5** (9) (2011) 1196–1211, doi: <https://doi.org/10.5897/AJPP11.228>.
 25. J. Ivanovic, M. Ristic, D. Skala, Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plant material, *J. Supercrit. Fluid.* **57** (2) (2011) 129–136, doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.02.013>.
 26. N. Blažeković, J. Petričić, G. Stanić, Ž. Maleš, Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along Adriatic coast, *Acta Pharm.* **45** (1995) 517–522.
 27. J. Mastelic, O. Politeo, I. Jerkovic, Contribution to the analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. – Determination of ester bonded acids and phenols, *Molecules.* **13** (4) (2008) 795–803, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules13040795>.
 28. M. Malenica Staver, I. Gobin, I. Ratkaj, M. Petrovic, A. Vulinovic, M. Dinarina-Sablic, D. Broznic, *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* **21** (1) (2018) 77–91, doi: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1433071>.
 29. I. B. Chinou, V. Roussis, D. Perdetzoglou, A. Loukis, Chemical and Biological Studies on Two *Helichrysum* Species of Greek Origin, *Planta Med.* **62** (1996) 377–379, doi: <https://doi.org/10.1055/s-2006-957914>.
 30. A. Bianchini, P. Tomi, A. F. Bernardini, I. Morelli, G. Flamini, P. L. Cioni, M. Usai, M. Marchetti, A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy), *Flavour Fragr. J.* **18** (2003) 487–491, doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.1231>.
 31. J. Mastelic, O. Politeo, I. Jerkovic, N. Radosevic, Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions, *Chem. Nat. Compd.* **41** (1) (2005) 35–40, doi: <https://doi.org/10.1007/s10600-005-0069-z>.
 32. J. Paolini, J. M. Desjobert, J. Costa, A. F. Bernardini, C. Buti Castellini, P. L. Cioni, G. Flamini, I. Morelli, Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands, *Flavour Fragr. J.* **21** (2006) 805–808, doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.1726>.
 33. B. Conti, A. Canale, A. Bertoli, F. Gozzini, L. Pistelli, Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), *Parasitol Res.* **107** (2010) 1455–1461, doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2018-4>.
 34. E. Mancini, L. De Martino, A. Marandino, M. R. Scognamiglio, V. De Feo, Chemical Composition and Possible *in Vitro* Phytotoxic Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*, *Molecules* **16** (2011) 7725–7735, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules16097725>.

35. M. Leonardi, K. E. Ambryszewskaa, B. Melai, G. Flamini, P. L. Cioni, F. Parri, L. Pistelli, Essential-Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy), Chem. Biodivers. **10** (2013) 343–345, doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200222>.
36. S. Čavar Zeljković, M. E. Šolić, M. Maksimović, Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia, Nat. Prod. Res. **29** (19) (2015) 1874–1877, doi: <https://doi.org/10.1080/014786419.2015.1009458>.
37. S. Catty, Hydrosols: The Next Aromatherapy. Healing Arts Press, Rochester, 2001., str. 81.
38. K. Kramberger, D. Barlič-Maganja, D. Bandelj, A. Baruca Arbeiter, K. Peeters, A. Miklavčič Višnjevec, Z. Jenko Pražnikar, HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS Determination of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Comparison of the Hydroalcoholic and Water Extracts from Two *Helichrysum italicum* Species, Metabolites **10** (2020) 403, doi: <https://doi.org/10.3390/metabo10100403>.
39. E. Guinoiseau, V. Lorenzi, A. Luciani, A. Muselli, J. Costa, J. Casanova, L. Berti, Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, u A. Méndez-Vilas (ur.), Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Vol. 2, Formatex Research Center, Badajoz, 2013, str. 1073–1080.
40. Q. W. Zhang, L. G. Lin, W.C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, Chin. Med. **13** (20) (2018) 20, doi: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
41. Council of Europe, European pharmacopeia. Vol. 1, Council of Europe, Strasbourg, 2013, str. 21–26, 155.
42. D. Winterhalter, A. Šliepčević, A. Kuntarić, K. Kempni, Vježbe iz fizike za studente medicinskog, veterinarskog i farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Školska knjiga, Zagreb, 1990., str. 31–32, 102–105.
43. URL: https://www.nhrorganicoils.com/uploads/20160419140128e_Helichrysum_CofA_180416-7.pdf (20. 3. 2022.).
44. K. Xhaxhiu, R. Terziu, A. Mele, E. Troja, T. Kota, Characterisation of steam-extraction progress of some medicinal plants based on the evolution of physical-chemical parameters of their hydrolates, Fresenius Environ. Bull. **21** (10a) (2012) 3108–3113.
45. I. Arsić, Preparation and Characterization of St. John's Wort Herb Extracts Using Olive, Sunflower and Palm Oils, Acta Fac. Med. Naissensis. **33** (2) (2016) 119–126, doi: <https://doi.org/10.1515/afmnai-2016-0013>.
46. URL: <https://wiki.anton-paar.com/hr-hr/osnove-refraktometrije> (4. 6. 2022.).
47. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Potencijometrijske metode, u D. Bešenić (ur.), Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb, 1999., str. 381, 388.
48. N. Bolf, Mjerenje mutnoće – turbidimetrija i nefelometrija, Kem. Ind. **69** (2020) 711–714.
49. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254631/WHO-FWC-WSH-17.01-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (4. 5. 2022.).
50. I. Pohajda, G. Dragun, L. Puharić Visković, Smilje. Savjetodavna služba, Zagreb, 2015., str. 1–15.

SUMMARY

Methods for Obtaining Immortelle Essential Oil, Hydrolate, and Macerate, and Parameters for their Quality Assessment

Barbara Bilandžija,^a Lucija Bilandžija,^a Lea Pollak,^b and Suzana Inić^{a*}

Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don), belonging to the family of Asteraceae, is typically a Mediterranean plant that has a long-lasting medicinal and pharmaceutical use. The aim of this paper was to emphasise the importance of standardising procedures, as well as defining the value range within which the parameters for assessing the quality and purity of essential oils, hydrolates, and macerates should be, considering the growing commercial interest in these preparations. Quality testing is important to determine the safety, but also the effectiveness of the application of immortelle essential oil, hydrolate, and macerate, which also opens the possibility of their wider use in the pharmaceutical, food, and cosmetics industries.

Determination of relative density, refractive index, acid value, pH value, turbidity, and essential oil content has already been used as a standard for determining the quality of officinal essential oils in European Pharmacopoeia. The introduction of standardised procedures for testing the quality and purity of immortelle essential oil, hydrolate, and macerate would help better analytical control of these preparations on the market.

Keywords

Immortelle essential oil, hydrolate, macerate, quality testing, physical and chemical parameters

^a University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia

^b Croatian National Institute of Public Health, Rockefellerova 7, 10 000 Zagreb, Croatia

Review

Received April 10, 2022

Accepted June 22, 2022