Optimizacija ekstrakcije cvijeta smilja (Helichrysum italicum (Roth) G. Don.) i ploda konopljike (Vitex agnus castus L.) s \(CO_{2}\) u superkritičnom stanju

Zorić, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:050775

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marina Zorić, mag. ing. proc.

OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE CVIJETA SMILJA (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) I PLODA KONOPLJIKE (*Vitex agnus castus* L.) S CO_2 U SUPERKRITIČNOM STANJU

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, srpanj, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam
Smjer: Prehrambena tehnologija

Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 66.011 : 66.061.34 (043.3)
66.061.34 : 633.88 (043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana: Inženjerstvo
Tema rada prihvaćena je na IV. sjednici Fakultetskoga vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, održanoj 27. siječnja 2017.
Voditelj: *prof. dr. sc. Stela Jokić*

OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE CVIJETA SMILJA (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) I PLODA KONOPLJIKE (*Vitex agnus castus* L.) S CO_2 U SUPERKRITIČNOM STANJU

Marina Zorić, 0113134066

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj dviju ekstrakcijskih metoda: ekstrakcije s CO_2 u superkritičnom stanju ($ESCO_2$) i hidrodestilacije na prinos i kemijski sastav ekstrakata / eteričnog ulja iz cvijeta smilja i ploda konopljike s područja Hercegovine. Sastav isparljivih spojeva određen je primjenom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS). Prinos eteričnog ulja iz cvijeta smilja postupkom hidrodestilacije iznosio je 0,3 %**,** dok je prinos tijekom $ESCO_2$ iznosio od 0,6 % do 4,8 % (u ovisnosti o primijenjenom tlaku i temperaturi ekstrakcije). Glavni spojevi eteričnog ulja smilja dobivenog hidrodestilacijom bili su terpeni sa sljedećim udjelima: *γ*-kurkumen (23,2 %), *α*-pinen (13,7 %), *β*-selinen (9,9 %), *α*-selinen (6,7 %), neril-acetat (5,4 %), *trans*-kariofilen (4,7 %), italicen (4,5 %) i limonen (3,1 %). U ekstraktima dobivenim $ESCO_2$ dominirali su derivati tremetona u udjelima 0,4 − 23,0 %. U CO_2 ekstraktu smilja dobivenom pri nižem tlaku (7,9 MPa) pojavio se i skvalen (35,6 %). Ovaj spoj značajan je u kozmetičkoj industriji zbog svoje antioksidativne, eksfolijantne i hidratizirajuće uloge. Dodatno, u CO_2 ekstraktima cvijeta smilja reverzno-faznom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (RP-HPLC) uz UV detekciju određen je bioaktivni spoj skopoletin u omjeru 0,1 − 1,9 mg/100 g cvjetova smilja, koji je odgovoran za ublažavanje znakova starenja kože i značajan u proizvodnji kozmetike. Prinos eteričnog ulja iz ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom iznosio je 0,4 %, dok je prinos tijekom $ESCO_2$ iznosio od 0,1 do 19,3 % (u ovisnosti o primijenjenim procesnim uvjetima ekstrakcije i sadržaju vlage u uzorku). Glavni spojevi eteričnog ulja ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom bili su viridiflorol (16,7 %), *α*-humulen (15,6 %), *trans*-kariofilen (10,7 %), *trans*-*β*-farnezen (7,6 %), kariofilen oksid (7,3 %), 1,8-cineol (4,9 %) i *α*-terpinil-acetat (4,9 %). U CO_2 ekstraktima ploda konopljike dominantni su bili sljedeći spojevi: *trans*-*β*-farnezen (14,8 − 23,4 %), *trans*-kariofilen (13,6 − 18,6 %), *α*-terpinil-acetat (7,1 − 13,5 %), 1,8-cineol (4,2 − 12,2 %), biciklogermakren (8,5 − 11,6 %), *α*-kadinol (2,5 − 6,7 %), sabinen (0,3 − 6,5 %), aromadendren (3,7 − 4,6 %), kariofilen oksid (3,2 − 4,5 %) i viridiflorol (2,1 − 3,8 %). Provedena je i optimizacija procesa $ESCO_2$ primjenom metode odzivnih površina. U slučaju cvijeta smilja, optimalni uvjeti $ESCO_2$ u odnosu na prinos ekstrakcije bili su tlak od 22,1 MPa i temperatura od 50,0 °C, dok su kod ploda konopljike optimalne vrijednosti tlaka od 32,5 MPa i temperatura od 60,0 °C.

Ključne riječi: *cvijet smilja, plod konopljike, eterično ulje, ekstrakcija s CO_2 u superkritičnom stanju, optimizacija*

Rad sadrži: 118 stranica
23 slike
33 tablice
233 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. *Drago Šubarić*	predsjednik
2.	prof. dr. sc. *Igor Jerković*	član
3.	izv. prof. dr. sc. *Senka Vidović*	član
4.	izv. prof. dr. sc. *Maja Molnar*	zamjena člana

Datum obrane: 13. srpnja 2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkoga fakulteta Osijek, Rektoratu Sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study − Food Technology and Nutrition

Department of Process Engineering
Subdepartment of Process Design and Pharmaceutical Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC: 643-02/21-01/01
2158-82-82-01-21-41

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Scientific branch: Engineering

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. IV. held on January 27, 2017.
Mentor: *Stela Jokić, PhD, full prof.*

OPTIMIZATION OF SUPERCRITICAL CO_2 EXTRACTION OF IMMORTELLE FLOWER (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don.) AND CHASTE TREE FRUIT (*Vitex agnus castus* L.)

Marina Zorić, 0113134066

Summary: The aim of this study was to examine the influence of two extraction methods: supercritical CO_2 extraction (SC-CO_2) and hydrodistillation on the extraction yield and chemical composition of extracts / essential oil from immortelle flower and chaste tree fruit from Herzegovina area. The composition of the volatile compounds was determined by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). The yield of essential oil from immortelle flower by hydrodistillation was 0.3 %, while the yield during SC-CO_2 was from 0.6 % to 4.8 % (depending on the applied pressure and extraction temperature). The main compounds of immortelle essential oil obtained by hydrodistillation were terpenes: *γ*-curcumene (23.2 %), *α*-pinene (13.7 %), *β*-selinene (9.9 %), *α*-selinene (6.7 %), neryl acetate (5.4 %), *trans*-caryophyllene (4.7 %), italicene (4.5 %) and limonene (3.1 %). The SC-CO_2 extracts were dominated by tremetone derivatives in the range of 0.4 − 23.0 %. Squalene in concentration of 35.6 % was detected in SC-CO_2 extract obtained at low pressure (7.9 MPa). This compound has been important in cosmetics industry due to its antioxidant, exfoliant and hydrating role. In addition, scopoletin was determined in SC-CO_2 extracts of immortelle flower by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detection in the proportion of 0.1 − 1.9 mg/100 g of immortelle flowers. This is the bioactive compound responsible for anti-aging activities with important aspect in the production of cosmetics. The yield of essential oil from chaste tree fruit obtained by hydrodistillation was 0.4 %, while the yield of SC-CO_2 varied from 0.1 to 19.3 % (depending on the applied extraction process conditions and moisture content in material). The main compounds of chaste fruit tree essential oil obtained by hydrodistillation were viridiflorol (16.7 %), *α*-humulene (15.6 %), *trans*-caryophyllene (10.7 %), *trans*-*β*-farnesene (7.6 %), caryophyllene oxide (7.3 %), 1,8-cineole (4.9 %) and *α*-terpinyl acetate (4.9 %). In the SC-CO_2 extracts chaste fruit tree the following compounds were dominant: *trans*-β-farnesene (14.8 − 23.4 %), *trans*-caryophyllene (13.6 − 18.6 %), *α*-terpinyl acetate (7.1 − 13, 5 %), 1,8-cineole (4.2 − 12.2 %), bicyclogermacrene (8.5 − 11.6 %), *α*-cadinol (2.5 − 6.7 %), sabinene (0.3 − 6.5 %), aromadendrene (3.7 − 4.6 %), caryophyllene oxide (3.2 − 4.5 %) and viridiflorol (2.1 − 3.8 %). The SC-CO_2 process was optimized by using the response surface methodology. In the case of immortelle flower, the optimal SC-CO_2 conditions in relation to the extraction yield were the pressure of 22.1 MPa and temperature of 50 °C and in the case of chaste tree fruit the pressure of 32.5 MPa and temperature of 60 °C.

Key words: *immortelle flower, chaste tree fruit, essential oil, supercritical CO_2 extraction, optimization*

Thesis contains: 118 pages

23 figures
33 tables
233 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Drago Šubarić*, PhD, full prof.	chair person
2.	*Igor Jerković*, PhD, full prof.	member
3.	*Senka Vidović*, PhD, associate prof.	member
4.	*Maja Molnar*, PhD, associate prof.	stand-in

Defense date: July 13, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek.

Svijet ljekovitih biljaka impresionirao me još u ranom djetinjstvu kao radoznalu djevojčicu pri čemu sam ga ulaskom u svijet znanosti spoznala na poseban način i zavoljela kročiti istim. Na tom putu sam susrela predivne ljude koji su me oblikovali i profesionalno usmjeravali te im dugujem veliku zahvalost.

Neizmjerno sam zahvalna svojoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na iskrenoj podršci tijekom moga diplomskog i doktorskog studija, te na brojnim zajedničkim znanstvenim projektima. Njezina su mi ohrabrenja, znanje i iskustvo bili stalni podsjetnik i poticaj da uvijek idem naprijed prema novim izazovima.

Posebnu zahvalnost dugujem i prof. dr. sc. Mati Biliću, sada umirovljenom profesoru, od kojega sam imala priliku učiti i s kojim sam surađivala na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Mostaru, a čiji su otvoreni životni pogledi, savjeti i podrška uvelike oblikovali moje profesionalno usmjerenje.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću s Kemijsko-tehnološkoga fakulteta u Splitu na pomoći pri identifikaciji bioaktivnih spojeva ispitanih biljnih vrsta, te primjedbama i stručnim savjetima koji su doprinijeli kvaliteti ove doktorske disertacije i objavi zajedničkih znanstvenih radova.

Želim se zahvaliti i izv. prof. dr. sc. Maji Molnar i dr. sc. Blanki Bilić Rajs na pomoći pri identifikaciji skopoletina te na pomoći prilikom objave znanstvenih radova. Zahvalnost dugujem i doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću te doc. dr. sc. Krunoslavu Aladiću na pomoći u provedbi GC-MS analiza.

Neizmjernu zahvalnost dugujem dragoj kolegici mag. ing. preh. Mariji Banožić na nesebičnoj podršci i pomoći prilikom pisanja disertacije.

Zahvaljujem se i vlasnicima tvrtke Roing na poklonjenom cvijetu smilja za potrebe mog istraživanja.

Hvala mom suprugu Mati i mojoj Marii te sestri Martini, čija su mi bezuvjetna ljubav i razumijevanje bili snažan oslonac i snaga da vjerujem u sebe i u ostvarenje svoga sna.

Najiskrenije se zahvaljujem i članovima suprugove obitelji na pomoći i svima koji su dali svoj doprinos na mome putu kroz doktorski studij.

S mnogo ljubavi i zahvalnosti, ovaj rad posvećujem svojim roditeljima Ljubici i Zdravku, koji su mi kroz obiteljski posao utisnuli trajnu ljubav prema ljekovitim biljkama i zbog čije sam vjere u moj uspjeh danas tu.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 5

2.1. FITOKEMIKALIJE: TERPENI I KUMARINI 6
2.1.1. Terpeni 8
2.1.1.1. Monoterpeni 9
2.1.1.2. Seskviterpeni 9
2.1.2. Kumarini 9
2.1.3. Bioaktivno djelovanje fitokemikalija 11

2.2. SMILJE 12
2.2.1. Morfološke i fiziološke karakteristike smilja 13
2.2.2. Kemijski profili eteričnog ulja smilja 15
2.2.3. Kemijski profili CO_2 ekstrakata smilja 17
2.2.4. Potencijalna primjena ekstrakata smilja 23

2.3. KONOPLJIKA 27
2.3.1. Morfološke i fiziološke karakteristike konopljike 27
2.3.2. Kemijski profili eteričnog ulja konopljike 28
2.3.3. Kemijski profili CO_2 ekstrakata konopljike 28
2.3.4. Potencijalna primjena ekstrakata konopljike 32

2.4. DESTILACIJA I SUPERKRITIČNA FLUIDNA EKSTRAKCIJA 33
2.4.1. Izolacija eteričnih ulja destilacijom 34
2.4.2. Superkritična fluidna ekstrakcija 35
2.4.2.1. Mehanizam procesa superkritične ekstrakcije 36
2.4.2.2. Superkritični fluidi i njihove osobine 39
2.4.2.3. Ekstrakcija s CO_2 u superkritičnom stanju ($ESCO_2$) 40

2.5. METODA ODZIVNIH POVRŠINA KAO ALAT ZA OPTIMIZACIJU 41
3. EKSPERIMENTALNI DIO 45

3.1. ZADATAK 46

3.2. MATERIJALI 47
3.2.1. Cvijet smilja 47
2.2.2. Plod konopljike 47
3.2.3. Kemikalije i standardi 48

3.3. METODE 48
3.3.1. Određivanje udjela vlage u uzorku cvijeta smilja i ploda konopljike 48
3.3.2. Priprema uzorka za ekstrakciju 49
3.3.3. Izolacija eteričnog ulja cvijeta smilja i ploda konopljike hidrodestilacijom 49
3.3.4. $ESCO_2$ cvijeta smilja i ploda konopljike 50
3.3.5. Procesni uvjeti za $ESCO_2$ cvijeta smilja prema CCRD-u 51
3.3.6. Procesni uvjeti za $ESCO_2$ ploda konopljike prema CCRD-u 52
3.3.7. Identifikacija kemijskoga profila dobivenih hidrodestilata i CO_2 ekstrakata cvijeta smilja i ploda konopljike primjenom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS) 53

3.3.8. Ekstrakcija i kvantifikacija skopoletina u CO_2 ekstraktima cvijeta smilja reverzno-faznom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (RP-HPLC) uz UV detekciju 54
3.3.9. Statistička obrada podataka 56
4. REZULTATI 57

4.1. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA CVIJETU SMILJA 58
4.1.1. Određivanje veličine čestica 58
4.1.2. Određivanje udjela vlage u cvijetu smilja 58
4.1.3. Prinos eteričnog ulja cvijeta smilja dobivenog hidrodestilacijom 58
4.1.4. Kemijski profil eteričnog ulja cvijeta smilja dobivenog hidrodestilacijom 59
4.1.5. Utjecaj tlaka i temperature $ESCO_2$ cvijeta smilja na prinos ekstrakcije i udio skopoletina 60
4.1.6. Kemijski profili isparljivih spojeva CO_2 ekstrakata cvijeta smilja 60
4.1.7. Statistička analiza parametara $ESCO_2$ cvijeta smilja 62
4.1.8. Optimalni procesni uvjeti $ESCO_2$ cvijeta smilja 64

4.2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA PLODU KONOPLJIKE 64
4.2.1. Određivanje veličine čestica 64
4.2.2. Određivanje udjela vlage u plodu konopljike 65
4.2.3. Prinos eteričnog ulja ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom 65
4.2.4. Kemijski profil eteričnog ulja ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom 65
4.2.5. Utjecaj tlaka i temperature $ESCO_2$ ploda konopljike na prinos ekstrakcije i udio najznačajnijih isparljivih spojeva 66
4.2.6. Kemijski profili isparljivih spojeva CO_2 ekstrakata ploda konopljike 67
4.2.7. Statistička analiza parametara $ESCO_2$ ploda konopljike 69
4.2.8. Utjecaj promjene udjela vlage na kemijski profil CO_2 ekstrakata ploda konopljike 74
4.2.9. Optimalni procesni uvjeti $ESCO_2$ ploda konopljike 75
5. RASPRAVA 76

5.1. HIDRODESTILACIJA I SUPERKRITIČNA FLUIDNA EKSTRAKCIJA CVIJETA SMILJA 77
5.1.1. Kemijski profil eteričnog ulja cvijeta smilja dobivenoga hidrodestilacijom 77
5.1.2. Kemijski profili CO_2 ekstrakata cvijeta smilja 81
5.1.4. Utjecaj procesnih uvjeta $ESCO_2$ na udio skopoletina 84

5.2. HIDRODESTILACIJA I SUPERKRITIČNA FLUIDNA EKSTRAKCIJA PLODA KONOPLJIKE 86
5.2.1. Kemijski profil eteričnog ulja ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom 86
5.2.2. Kemijski profili CO_2 ekstrakata ploda konopljike 88
5.2.3. Utjecaj povećanja udjela vlage na prinos i kemijski profil CO_2 ekstrakata ploda konopljike 93
6. ZAKLJUČCI 94
7. LITERATURA 97

Popis oznaka, kratica i simbola

ANOVA	analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)
AOAC	Udruženje službenih analitičkih kemičara (engl. *Association of Official Analytical Chemists)*
BiH	Bosna i Hercegovina
BBD	Box-Behnkenov plan pokusa (engl. *Box-Behnken Design*)
β_0	konstanta jednadžbe odzivnog polinoma
β_j	koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
β_{jj}	koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
β_{ij}	koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma
CO_2	ugljikov dioksid (engl. *Carbon Dioxide*)
CCRD	centralno kompozitni plan pokusa (engl. *Central Composite Rotable Design)*
D	željena funkcija (engl. *Desirability Function)*
$CaCO_3$	kalcijev karbonat
df	stupnjevi slobode (engl. *Degrees of Freedom*)
DMAPP	dimetilalil-pirofosfat
DD	Doehlertov plan pokusa (engl. *Doehlert Design*)
E	istok (engl. *East*)
$ESCO_2$	ekstrakcija s CO_2 u superkritičnom stanju (engl. *Supercritical CO_2 extraction*)
FFD	faktorijalni plan pokusa (engl. *Full Factorial Design*)
FPP	farnezil-pirofosfat
FSH	folikulostimulirajući hormon (engl. *Follicle-Stimulating Hormone*)
GC-MS	plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)
GC-FID	plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*)
GC-O	plinska kromatografija-olfaktometrija (engl. *Gas Chromatography-Olfactometry*)
GPP	geranil-pirofosfat
GGPP	granil-geranil-pirofosfat
GFPP	geranil-farnezil-pirofosfat
GPS	globalni sustav pozicioniranja (engl. *Global Positioning System*)
h	vrijeme (engl. *Hour*)
H.	*Helichrysum*
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
IPP	izopentenil-pirofosfat
KME	klasične metode ekstrakcije
L.	Linnéov sustav imenovanja biljaka
LH	luteinizirajući hormon
LOD	granica detekcije (engl. *Limit of Detection)*
LOQ	granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantitation)*
MgSO4	magnezijev sulfat
MEP	metileritrol-fosfatni put (engl. *Methylerythritol Phosphate*)
MS	varijanca (engl. *Mean Square*)
NP	nepoznata podvrsta

^{13}C NMR	^{13}C nuklearna magnetska rezonancija (engl. ^{13}C *Nuclear Magnetic Resonance*)
PMS	predmenstrualni sindrom (engl. *Premenstrual Syndrome*)
PTFE	politetrafluoroetilen
R^2	koeficijent determinacije (engl. *Predicted* R^2)
RI	indeksi zadržavanja (engl. *Retention Index*)
RP-HPLC	reverzno-fazna visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (engl. *Reverse-Phase high Performance Liquid Chromatography*)
ROS	reaktivne vrste kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*)
RSM	metoda odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology*)
SFE	superkritična fluidna ekstrakcija (engl. *Supercritical Fluid Extraction*)
SC-CO_2	superkritični CO_2 (*engl. Supercritical* CO_2)
SS	suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti (engl. *Sum of Squares*)
s. t.	suha tvar (engl. *Dry Weight*)
t	tragovi (*engl. Trace*)
TCA	ciklus trikarboksilne kiseline (engl. *Tricarboxylic Acid Cycle*)
TIC	kromatogram ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Chromatogram*)
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*)
UV / VIS	ultraljubičasto/vidljivo (engl. *UltraViolet-Visible*)
V.	*Vitex*
v/v	volumni udio (engl. *Volume per Volume*)
X_i i X_j	kodirane nezavisne varijable (tlak i temperatura)
Y	modelom predviđena odzivna funkcija

1. UVOD

Ljekovite biljke i začini su se kroz povijest na području Mediterana tradicionalno upotrebljavali kao dio kulturne baštine, prvenstveno kao dodatci prilikom kuhanja ili pripreme hrane, a kasnije i kao topli napitci zbog blagotvornoga djelovanja na zdravlje. S obzirom na to da su nadzemni dijelovi biljaka prirodni izvor bioaktivnih spojeva, posljednjih su godina istraživački laboratoriji kozmetičke i farmaceutske industrije posebno orijentirani na ispitivanja ljekovitih biljaka čiji ekstrakti, inkorporirani u sastav proizvoda, daju dodatnu vrijednost novim proizvodima na tržištu (Melander, 2020; Lourenço i sur., 2019; Zorić i sur., 2017; Atanasov i sur., 2015).

Prisutni bioaktivni spojevi u ljekovitim biljkama mogu se ekstrahirati iz različitih dijelova biljke kao što su lišće, stabljika, cvijet i plodovi s ciljem daljnje uporabe u različitim područjima farmaceutske, prehrambene i/ili kemijske industrije. Intenzivnim razvojem suvremenih kromatografskih i spektroskopskih tehnika uvelike je olakšana analiza spojeva dobivenih različitim ekstrakcijskim tehnikama, ali uspjeh istih prvenstveno ovisi o izboru metode ekstrakcije i ulaznim procesnim parametrima, kao i o zemljopisnom porijeklu te o dijelu biljke iz kojega se provodi ekstrakcija (Azmir i sur., 2013).

Prilikom ekstrakcije bioaktivnih spojeva i proizvodnje biljnih ekstrakata danas se i dalje najčešće primjenjuju klasične metode ekstrakcije (KME). KME su obično dugotrajne i zahtijevaju veliki utrošak energije. Visoka temperatura ekstrakcije može dovesti do degradacije termolabilnih spojeva što utječe na kvalitetu i biološku aktivnost konačnoga proizvoda. Pored toga, u KME vrlo se često kao sredstva za ekstrakciju primjenjuju toksična organska otapala. Primjena ovih otapala dodatno poskupljuje proces ekstrakcije i ima negativan utjecaj na sigurnost konačnoga proizvoda. Gotovo sve nedostatke KME u potpunosti kompenzira ekstrakcija s CO_2 u superkritičnom stanju ($ESCO_2$). $ESCO_2$ spada u "čiste tehnologije" jer nema sekundarnih proizvoda štetnih za životnu sredinu. $ESCO_2$ temelji se na činjenici da pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste spojeva u blizini svoje kritične točke, ili u superkritičnom području (Bubalo i sur., 2015; Jokić i sur., 2014; Azmir i sur., 2013; Huang i sur., 2012; Jokić, 2011). Podešavanjem procesnih parametara tlaka i temperature tijekom $ESCO_2$ moguće je utjecati na selektivnost fluida prema ciljanim spojevima (Maksimovic i sur., 2013; Cossuta i sur., 2008).

Izbor odgovarajuće ekstrakcijske metode ključan je za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava ekstrakata. No pored izbora ekstrakcijske metode izuzetno važnu ulogu ima i prirodno stanište biljke. Područje Bosne i Hercegovine (BiH) bogato je samoniklim i plantažno uzgojenim biljkama (Redzic, 2010). Dugogodišnja tradicija uzgoja i sakupljanja ljekovitih biljaka u Hercegovini razlog je njegove upotrebe i u narodnoj medicini, prvenstveno zahvaljujući visokim antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima. Hercegovina je još u bivšoj Jugoslaviji definirana kao područje bogato ljekovitim i aromatičnim biljkama, s procjenom na

više od 1 300 različitih ljekovitih biljnih vrsta, među kojima se nalaze i smilje (*Helichrysum italicum*) i konopljika (*Vitex agnus castus*) (Kosović i Dunjić, 2000). Trenutno je dostupno samo nekoliko znanstvenih radova koji su se bavili istraživanjem eteričnog ulja smilja i konopljike s područja Hercegovine dobivenog procesom hidrodestilacije (Talic i sur., 2021; Tanović i sur., 2020; Karalija i sur., 2020; Talic i sur., 2019; Odak i sur., 2019) dok nije provedeno niti jedno istraživanje na CO_2 ekstraktima spomenutih biljaka.

Upravo će se ovim istraživanjem dati znanstveni doprinos (prvi put) na području ispitivanja utjecaja relativno nove ekstrakcijske metode $ESCO_2$ na prinos ekstrakata te u određivanju kemijskog profila ekstrakata cvijeta smilja i ploda konopljike s područja Hercegovine (Jokić i sur., 2017; Jerković i sur., 2016; Jokić i sur., 2016).

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je aromatični polugrm mediteranskoga područja s vrlo karakterističnim zlatnožutim cvatovima i opojnim mirisom. Na mediteranskom području zastupljeno je oko 25 autohtonih vrsta roda *Helichrysum* od kojih je *Helichrysum italicum* (u daljnjem tekstu *H. italicum*) jedna od najrasprostranjenijih i najviše istraživanih (Kazazic i sur., 2016; Mastelic i sur., 2005). Brojna znanstvena istraživanja spomenuta u detaljnim preglednim radovima autora Ninčević i sur., 2019; Zeljković i sur., 2015; Viegas i sur., 2014; Morone-Fortunato i sur., 2010; Politeo, 2003 ukazuju na to da je na eteričnom ulju smilja dobivenom hidrodestilacijom proveden značajan broj istraživanja, za razliku od CO_2 ekstrakta smilja čiji je kemijski sastav još uvijek nedovoljno istražen. Prema rezultatima istraživanja skupine autora Maksimovic i sur. (2013), Mastelic i sur. (2005) te Ivanovic i sur. (2011), najčešće skupine spojeva u ekstraktu smilja dobivenim $ESCO_2$ su seskviterpeni i parafinski ugljikovodici, dok su monoterpeni i seskviterpeni glavni spojevi eteričnog ulja dobivenog destilacijom vodenom parom. Ekstrakt cvijeta smilja, između ostalog, sadrži i nekoliko derivata kumarina, od kojih je jedan identificiran kao skopoletin (Karasartov i sur., 1992). Skopoletin je spoj sa značajnim bioaktivnim djelovanjem, a $ESCO_2$ kao relativno nova tehnologija pruža novi i ekološki prihvatljiv način dobivanja biljnih ekstrakata sa željenom koncentracijom skopoletina (Nam i Kim, 2015). Stoga se u ovom doktorskom radu provela identifikacija i kvantifikacija skopoletina u dobivenom CO_2 ekstraktu cvijeta smilja (Jokić i sur., 2016). Zahvaljujući kompleksnom kemijskom sastavu i dokazanom protuupalnom, antialergijskom, antimikrobnom, antioksidativnom i antivirusnom djelovanju, CO_2 ekstrakt i eterično ulje smilja imaju potencijalnu primjenu u biljnoj kozmetici gdje služe za formuliranje biljnih preparata namijenjenih zaštiti osjetljive i nadražene kože te za ublažavanju znakova starenja kože (Rigano i sur., 2013; Poli i sur., 2003). Stoga rezultati ispitivanja ekstrakata cvijeta smilja, dobiveni suvremenom ekstrakcijskom tehnikom, mogu poslužiti kao temelj za primjenu dobivenih ekstrakata u razvoju linije biljne kozmetike obogaćene ekstraktom cvijeta smilja.

Konopljika (*Vitex agnus castus* L.) je listopadni aromatični grm porijeklom iz mediteranske Europe i središnje Azije. *Vitex* je najveći rod u porodici Verbenaceae koji se sastoji od 250 vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu (Rani i Sharma, 2013; Meena i sur., 2010; Ganapaty i Vidyadhar, 2005). Objavljena istraživanja provedena na eteričnom ulju ploda konopljike dobivenom postupkom destilacije vodenom parom (Asdadi i sur., 2015; Katiraee i sur., 2015; Latoui i sur., 2012; Stojković i sur., 2011) ukazuju na to da je ovo područje bilo od većeg interesa znanstvenicima u proteklom periodu u odnosu na istraživanja kemijskog profila CO_2 ekstrakta ploda konopljike objavljenim tek u nekoliko dosadašnjih radova. Cossuta i sur. (2008) fokusirali su se na definiranje optimalnih uvjeta $ESCO_2$ ploda konopljike s mađarskoga podneblja te na ispitivanje utjecaja različitih parametara ekstrakcije na prinos i izolaciju pojedinih spojeva: rotundifuran, *β*-amirin i *β*-sitosterol te kasticin. Marongiu i sur. (2010) izolirali su isparljive spojeve iz ploda, lista i cvijeta talijanske konopljike koristeći $ESCO_2$, ali samo pri tlaku od 90 bara i temperaturi od 40 °C. Mele i sur. (2013) ispitali su utjecaj procesnih parametara $ESCO_2$ samo na izolaciju rotundifurana i kasticina. Za razliku od dosadašnjih provedenih istraživanja drugih autora, cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji bio je utvrditi optimalne uvjete $ESCO_2$, pri čemu se promjenama procesnih parametara utjecalo na ostvarenje maksimalnog prinosa ekstrakcije i dobivanje ekstrakata bogatih određenim spojevima. Prema autorima Ivanovic i sur. (2011a), promjena udjela vlage u materijalu prije postupka $ESCO_2$ može značajno utjecati na prinos i kvalitetu ekstrakta te se spomenuto ispitivanje provelo i u ovom radu. Prirodno uzgojen plod konopljike može biti izvrstan izvor polifenolnih spojeva i njihovih derivata s izraženim antioksidativnim djelovanjem (Katiraee i sur., 2015). Zamjena sintetskih dodataka s prirodnim rastući je trend koji se temelji na korištenju biljnih ekstrakata inkorporiranih u proizvode. Stoga rezultati $ESCO_2$ fitokemikalija iz ploda konopljike mogu biti usmjereni na razvoj novih formulacija biljnih tableta.

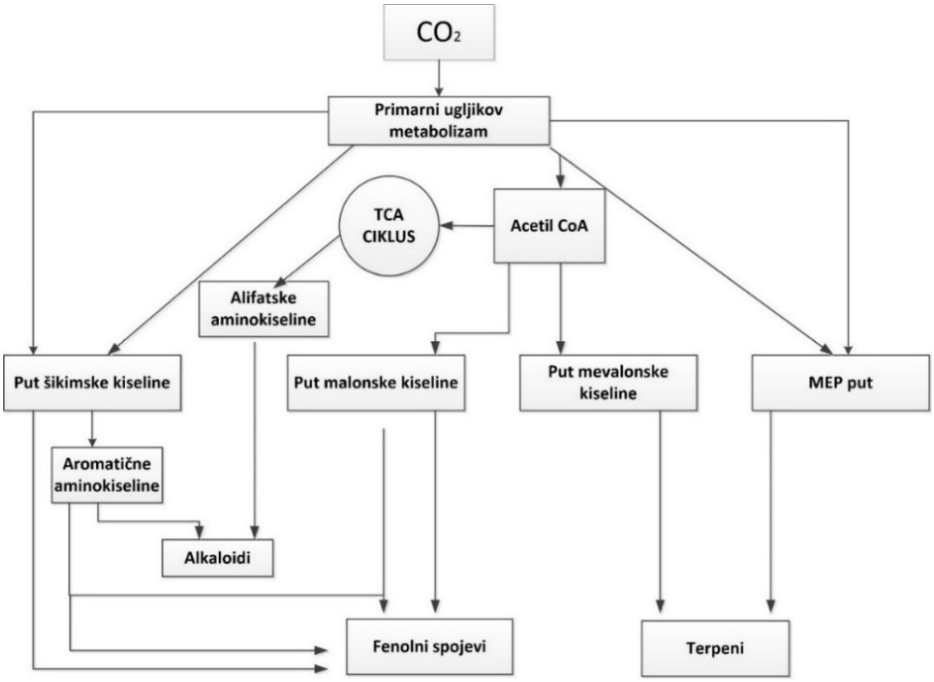
Upravo je sve navedeno bilo razlog da se pažnja i istraživački interes ovoga doktorskog rada usmjere na definiranje optimalnih uvjeta postupka ekstrakcije željenih spojeva iz cvijeta smilja i ploda konopljike s područja Hercegovine primjenom superkritičnog CO_2. S obzirom na to da brojni čimbenici utječu na konačnu učinkovitost ekstrakcijskih metoda, još uvijek ne postoji standardizirana metoda kojom bi se ekstrahirali pojedini spojevi u biljnom materijalu. U disertaciji je ispitan utjecaj procesnih parametara $ESCO_2$ na ekstraktibilnost ciljanih spojeva iz navedenih biljnih sirovina što je od iznimne važnosti za optimizaciju i upravljanje $ESCO_2$ te za potencijalni „*scale-up*“ i projektiranje budućih industrijskih postrojenja. Kemijska karakterizacija ciljanih skupina spojeva iz dobivenih ekstrakata provela se primjenom visokosofisticiranih kromatografskih metoda, a ovo istraživanje donosi detaljan uvid u identifikaciju ciljanih fitokemikalija na ispitanim biljnim sirovinama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FITOKEMIKALIJE: TERPENI I KUMARINI

Zahvaljujući širokom spektru svojstava fitokemikalija, osobito bioaktivnih spojeva prisutnih u biljkama, interesi prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije intenzivno rastu, posebno potaknuti rastom novih zdravih trendova i sveukupne veće brige pojedinaca o izboru prehrambenih i kozmetičkih proizvoda (Odak i sur., 2019). S obzirom na to da su fitokemikalije spojevi koji se u organizam unose u malim količinama, količinska zastupljenost ovih spojeva ne predstavlja mjerilo njihove kvalitete. Njihova je funkcionalna sposobnost da kroz svoju biološku aktivnost mogu neutralizirati utjecaje štetnih tvari u ljudskom organizmu te da uneseni i u malim količinama mogu ostvariti ciljano djelovanje. Molekule metabolizma svih živih organizama na Zemlji mogu se podijeliti u dvije velike skupine. Prvoj skupini pripadaju životno važne molekule koje nazivamo primarni metaboliti. Osnovna uloga ovih kemijskih spojeva usmjerena je na rast i razvoj biljke, i u tu se skupinu ubrajaju ugljikohidrati, aminokiseline, proteini i lipidi. Druga su skupina sekundarni metaboliti koji predstavljaju skupinu spojeva za koje se vjeruje da pomažu biljci u preživljavanju i prevladavanju utjecaja iz okoline, a među kojima se nalaze i biološki aktivni spojevi. Postoji više putova za biosintezu sekundarnih metabolita, npr.: (1) put šikimske kiseline, (2) put malonske kiseline, (3) put mevalonske kiseline i (4) metileritrol-fosfatni put − MEP (engl. *Methylerythritol Phosphate*) (Tiaz i Zeiger, 2006).

Pojednostavljena ilustracija različitih putova nastanka tri glavne skupine (alkaloidi, fenolni spojevi i terpeni) biljnih bioaktivnih spojeva prikazana je na **Slici 1** (Azmir i sur., 2013).



Slika 1 Različiti putovi nastanka alkaloida, fenolnih spojeva i terpena preko šikimske kiseline, malonske kiseline, mevalonske kiseline te MEP putom (prevedeno prema originalu autora Azmir i sur., 2013)

Sekundarni metaboliti su oni metaboliti koji često nastaju u fazi nakon rasta, proizvode se u određenim ograničenim taksonomskim skupinama, imaju specifične kemijske strukture i često se formiraju kao mješavine blisko povezanih članova kemijskih skupina prirodnih organskih spojeva (Bernhoft, 2010). Sekundarni metaboliti biljaka uglavnom se mogu svrstati u četrnaest osnovnih kategorija spojeva (**Tablica 1**) te se procjenjuje da u njima postoji preko 200 000 kemijskih struktura (Radojković, 2012).

Većina bioaktivnih spojeva pripada jednoj od navedenih kategorija, od kojih svaka ima posebne strukturne karakteristike koje proizlaze iz načina na koji su biosintetizirane. Svih četrnaest spomenutih kategorija prirodnih spojeva (**Tablica 1**) sintetizira se u vidu sekundarnih metabolita biljaka, a svojim bioaktivnim djelovanjem imaju potencijal unaprijediti ljudsko zdravlje (Wink, 2003). Stoga bi jednostavna definicija fitokemikalija kao biološki aktivnih spojeva bila ta da su to sekundarni biljni metaboliti koji izazivaju farmakološke ili toksikološke učinke kod ljudi i životinja (Bernhoft, 2010).

Tablica 1 Kategorije čestih biljnih sekundarnih metabolita (Radojković, 2012)

Kategorija	
1.	Alkaloidi
2.	Amini
3.	Cijanogeni glikozidi
4.	Diterpeni
5.	Flavonoidi
6.	Glukozinolati
7.	Monoterpeni
8.	Neproteinske aminokiseline
9.	Fenilpropani
10.	Poliacetileni
11.	Poliketoni
12.	Seskviterpeni
13.	Tertraterpeni
14.	Triterpeni, saponini, steroli

Alkaloidi nastaju iz aromatskih (koji potječu iz šikimske kiseline) i alifatskih aminokiselina (nastalih iz ciklusa trikarboksilne kiseline − TCA). Fenolni se spojevi sintetiziraju putem šikimske kiseline i malonske kiseline. Kroz put mevalonske kiseline i puteve MEP-a nastaju terpeni koji su ujedno i najbrojnija skupina sekundarnih metabolita biljaka.

2.1.1. Terpeni

Prvu polovinu 19. stoljeća obilježio je početak istraživanja terpena. Otežavajuću okolnost predstavljalo je odvajanje čistih sastojaka iz kompleksnih smjesa te određivanje njihove strukture. Prije kromatografskih i spektroskopskih metoda nije bilo učinkovitih metoda za razdvajanje spojeva sličnih fizikalno-kemijskih karakteristika i određivanje njihove strukture. Unatoč svim preprekama, krajem 19. stoljeća otkriveno je mnogo važnih terpena poput kamfora, *α*-pinena i citrala, a danas ih je poznato oko 30 000 (Kovačević, 2004).

Eterična su ulja uglavnom tekući produkti viših biljaka, raspoređeni u preko 50 porodica, a najrasprostranjeniji su u aromatičnim biljkama porodica Asteraceae, Laminaceae, Apiaceae, Rutaceae, Myrtaceae i Lauraceae. Brojni članovi navedenih biljnih porodica važne su vrste rezanog cvijeća te ukrasnih, ljekovitih i aromatičnih biljaka, od kojih se mnoge koriste za proizvodnju eteričnih ulja u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Eterična ulja nastaju aktivnošću egzogenih i endogenih sekrecijskih tkiva koja se mogu javiti u obliku pojedinačnih stanica, žljezdastih epitelnih šupljina ili pak mogu biti organizirana u specijalizirane strukture, žlijezde i žljezdane dlake koje se nalaze na površini dijelova biljaka (Kovačević, 2004). Eterična su ulja složene smjese koje mogu sadržavati preko 100 polarnih i nepolarnih spojeva u različitim koncentracijama. Međutim, obično ih karakterizira prisutnost dvije ili tri glavne komponente u relativno visokim koncentracijama (20 – 70 %) u usporedbi s ostalim spojevima eteričnog ulja prisutnih u tragovima. Spojevi sadržani u tipičnim eteričnim uljima mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: terpeni (monoterpeni i seskviterpeni) i fenilpropanski derivati (Gutiérrez-del-Río i sur., 2018).

U prirodi postoji velika kemijska raznolikost terpena, i upravo su zahvaljujući njima biljke ili dijelovi ljekovitih biljaka (korijen, stabljika, lišće, cvijeće, plod, sjemenka) ugodnoga mirisa i specifičnog okusa sa specifičnim farmakološkim djelovanjem (Gutiérrez-del-Río i sur., 2018). Terpenski ugljikovodici mogu biti monoterpenski (10 ugljikovih atoma), seskviterpenski (15 ugljikovih atoma) i diterpenski (20 ugljikovih atoma). Monoterpenski i seskviterpenski ugljikovodici tijekom intenzivnoga metabolizma prelaze u derivate s kisikom, stoga su upravo ti derivati biološki aktivni. Prema funkcijskim skupinama u strukturi, terpeni često mogu biti alkoholi, eteri, fenoli, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, esteri i dr. (Pine, 1994).

U formiranju prekursora različitih klasa terpena samo teorijski sudjeluje molekula izoprena koja karakterizira terpensku strukturu (izoprensko pravilo). Iz aktivirane mevalonske kiseline nastaje izopentenil-pirofosfat (IPP) i njegov izomer dimetilalil-pirofosfat (DMAPP). DMAPP predstavlja početnu jedinicu koja se adira na IPP. Osnovni prekursori u biosintezi terpena su:

- geranil-pirofosfat (GPP) – prekursor monoterpena,

- farnezil-pirofosfat (FPP) – prekursor seskviterpena,
- granil-geranil-pirofosfat (GGPP) – prekursor diterpena,
- geranil-farnezil-pirofosfat (GFPP) – prekursor sesterterpena (Kovačević, 2004).

U sastav eteričnih ulja uglavnom ulaze terpeni manje molekulske mase. Primjer takvih terpena prisutnih najvećim udjelom u eteričnom ulju i CO_2 ekstraktima cvijeta smilja i ploda konopljike su monoterpeni i seskviterpeni.

2.1.1.1. Monoterpeni

Monoterpeni su izgrađeni od 10 ugljikovih atoma i glavni su sastojci eteričnih ulja aromatičnih biljaka. Najveći broj monoterpena nastaje iz GPP-a i ima osnovni kostur sastavljen od 10 ugljikovih atoma. Dijele se na pravilne i nepravilne. Pravilni monoterpeni su česti isparljivi spojevi tipičnih eteričnih ulja. Monoterpeni su odgovorni za bioaktivno djelovanje i miris pa se često koriste u medicinske i kozmetičke svrhe.

Najznačajniji predstavnici acikličkih monoterpena su mircen, ocimen, citral (smjesa izomera geraniala i nerala), citronelol i geraniol. Nezasićeni monoterpenski alkoholi i aldehidi imaju važnu ulogu u parfemskoj industriji, prvenstveno linalool, nerol i citral.

Osnovni predstavnici monocikličkih monoterpena su limonen, mentol, menton, karvon i terpineol. Biciklički monoterpeni mogu se podijeliti u tri grupe prema veličini sekundarnog prstena (Filip, 2014; Politeo, 2003).

2.1.1.2. Seskviterpeni

Seskviterpeni dolaze u višim frakcijama eteričnih ulja. Oni doprinose njegovom farmakološkom djelovanju. Svi nastaju iz zajedničkoga prekursora, farnezil-pirofosfata, te u osnovi sadrže kostur od 15 ugljikovih atoma. Međutim, intramolekulske ciklizacije, pregradnje i oksidacije stvaraju veliki broj raznovrsnih spojeva (Mastelic i sur., 2005; Politeo, 2003).

2.1.2. Kumarini

Biljke također sadrže različite skupine fenolnih spojeva, među kojima su fenolne kiseline, kumarini, flavonoidi, stilbeni, tanini, lignani i lignin fenoli, fenolne kiseline, antocijani i hidroksicinamički derivati kiselina. Flavonoidi su najveća grupa fenolnih spojeva i smatra se da oko polovice fenolnih biljnih spojeva pripada flavonoidima. Nastaju biosintetskim putem šikimske kiseline ili miješanim acetatno-šikimatskim putem (Naczk i Shahidi, 2006; Harborne i sur.,1999). Zbog svoje strukture flavonoidi su snažni prirodni antioksidansi i svoju aktivnost iskazuju na više načina. Flavonoidi imaju sposobnost kelirati metalne ione što izgleda pridonosi

njihovoj antioksidativnoj aktivnosti *in vitro*, no nije poznato služe li kao učinkoviti kelatori metala i *in vivo* (Buhler i Miranda, 2000).

Polifenolni flavonoidi imaju kostur difenilpropana i uključuju flavanole, flavanone, antocijanidine, flavone i flavonole. Uz fenilpropanoide ili derivate hidroksicinamičke kiseline, flavonoli i u manjoj mjeri flavoni nalaze se u gotovo svakoj biljci (Rice-Evans i sur.,1996).

Značajna skupina spojeva prisutna u obliku polifenola su i kumarini. Ova vrsta spojeva prirodno je široko raspoređena unutar biljnoga carstva (Harborne,1982), uključujući i cvijet smilja. Različitim ekstrakcijskim postupcima, uključujući i $ESCO_2$ iz ove biljke, moguće je izolirati kumarine, posebno skopoletin što je potvrđeno u radu autora Jokić i sur. (2016).

Kumarini, vrlo opsežno istraživani spojevi sastoje se od pironskog prstena kondenziranog s benzenom, s pirokarbonilnom skupinom na položaju 2. Ovaj strukturni oblik također je poznat kao 2*H*-kromen-2-on prema nomenklaturi po IUPAC-u (Cao i sur., 2019). S obzirom na to da na kumarinskom prstenu postoji šest položaja na kojima se može vršiti supstitucija, poznato je mnoštvo različitih derivata kumarina, bilo sintetskih ili prirodnih, te je takva strukturna raznolikost uzrok širokog spektra njihove bioaktivnosti (Molnar i Čačić, 2011).

Kumarini su biosintetizirani iz prekursora fenilpropana, koji potiče od šikimske kiseline. Ovi spojevi široko su rasprostranjeni u različitim biljnim porodicama poput Apiaceae, Asteraceae, Fabiaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Solanaceae, posebno Rutaceae i Umbelliferae. Mogu se pronaći u svim dijelovima biljke, ovisno o uvjetima uzgoja. Neki derivati kumarina koji se javljaju u prirodi su umbeliferon (7-hidroksikumarin); eskuletin (6,7-dihidroksikumarin); herniarin (7-metoksikumarin), psoralen i imperatorin. Važna značajka kumarina je njihova sposobnost da se ponašaju kao fitoaleksini, spojevi koji se biosintetiziraju kada je biljka izložena nepovoljnim uvjetima poput bolesti ili suše (Molnar i sur., 2017).

Dobiveni različitim ekstrakcijskim tehnikama, kumarini su pronašli širok spektar primjene u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Stiefel i sur., 2017; Nam i Kim, 2015). Kumarin se primjerice koristi kao sredstvo za fiksiranje i pojačavanje mirisa u parfemima (Floc'h, 2002). Također, primjenu je pronašao kao aditiv u sapunima i deterdžentima, pastama za zube, duhanskim proizvodima te nekim alkoholnim pićima (Lake, 1999). Svoju primjenu pronalaze i kao zaslađivači te dodatci hrani u kombinaciji s vanilijom (Tyagi i sur., 2005).

Ekstrakcija superkritičnim fludima (engl. *Supercritical fluid extraction* − SFE) korištena je za ekstrakciju kumarina iz različitih biljnih materijala (Oliveira i sur., 2013; Wang i sur., 2011; Mitra i sur. al., 2011; Chen i sur., 2009; Rodrigues i sur., 2008), no do danas su se samo Karasartov i sur. (1992) te Jokić i sur. (2016) bavili ekstrakcijom kumarina iz cvijeta *H. italicum*, među kojima je identificiran skopoletin.

Skopoletin, 7-hidroksi-6-metoksikumarin fenolni je kumarin te važan član skupine fitoaleksina (Molnar i Čačić, 2011; Molnar i sur., 2017). , Rasprostranjen je u brojnim ljekovitim biljkama. Akumulacija skopoletina povezana je s otpornošću na mikroorganizmea i druge stresove poput mehaničkih ozljeda i dehidracije (Gnonlonfin i sur., 2012). Bioaktivno djelovanje ekstrakata koji sadrže skopoletin uključuje antibakterijsko; antifungalno (Gnonlonfin i sur., 2012; Garcia i sur., 1995); protuupalno (Jamuna i sur., 2015); antioksidativno (Jamuna i sur., 2015; Shaw i sur., 2003) djelovanje, a skopoletin posjeduje i mogućnost ublažavanja znakova starenja (Stiefel i sur., 2017; Nam i Kim, 2015).

2.1.3. Bioaktivno djelovanje fitokemikalija

Kao rezultat različitih fizioloških i biokemijskih procesa, žive stanice stvaraju slobodne radikale i ostale reaktivne nusprodukte kisika (Sarikurkcu i sur., 2009). Reaktivne vrste kisika (ROS) uzrokuju oštećenje biomolekula proteina, nukleinskih kiselina, lipida i ugljikohidrata koji grade glavne strukture ljudskih stanica. Oštećenje ovih biomolekula vodi do brojnih kroničnih bolesti kao što su kancerogena oboljenja, dijabetes, starenje i druge degenerativne bolesti (Morone-Fortunato i sur., 2010). Biljno carstvo proizvodi širok spektar prirodnih antioksidansa koji povoljno djeluju na ljudsko tijelo tako što ne dopuštaju stvaranje ROS-a i koji pored toga imaju važnu ulogu u njihovoj inaktivaciji. Iako su stanice ljudskoga tijela antioksidansima zaštićene od oksidativnog oštećenja, to ponekad nije dovoljno za sprječavanje staničnog oštećenja izazvanog ROS-om (Bojilov i sur., 2019). S obzirom na to da su ljekovite biljke bogate spojevima vitamina, terpena, fenolnih kiselina, lignina, stilbena, tanina, flavonoida, kinona, kumarina, alkaloida, amina, betalaina i drugih metabolita odgovornih za antioksidativno djelovanje, one imaju nezamjenjivu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala. Brojna istraživanja potvrdila su da mnogi od ovih antioksidansa posjeduju protuupalno; antibakterijsko; antivirusno; antikancerogeno; antiproliferativno i anti-HIV djelovanje. Stoga je unos prirodnih antioksidansa povezan sa smanjenim rizikom od karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i drugih bolesti povezanih sa starenjem, a posljednjih godina širom svijeta povećan je trend unosa tih spojeva prisutnih u bobicama, čajevima, biljkama, uljanim sjemenkama, voću i povrću (Zorić i sur., 2018; Katiraee i sur., 2015; Aiyegoro i Okon, 2010; Morone-Fortunato i sur., 2010; Rosa i sur., 2007; Appendino i sur., 2007; Angioni i sur., 2003; Sala i sur., 2001; Nostro i sur., 2004; 2002; 2001). Istraživanja provedena u proteklom periodu pokazala su da unatoč velikom napretku u medicini, biljke i dalje imaju važnu ulogu u liječenju i uklanjanju tegoba, prvenstveno zahvaljujući visokovrijednim spojevima poput antioksidansa.

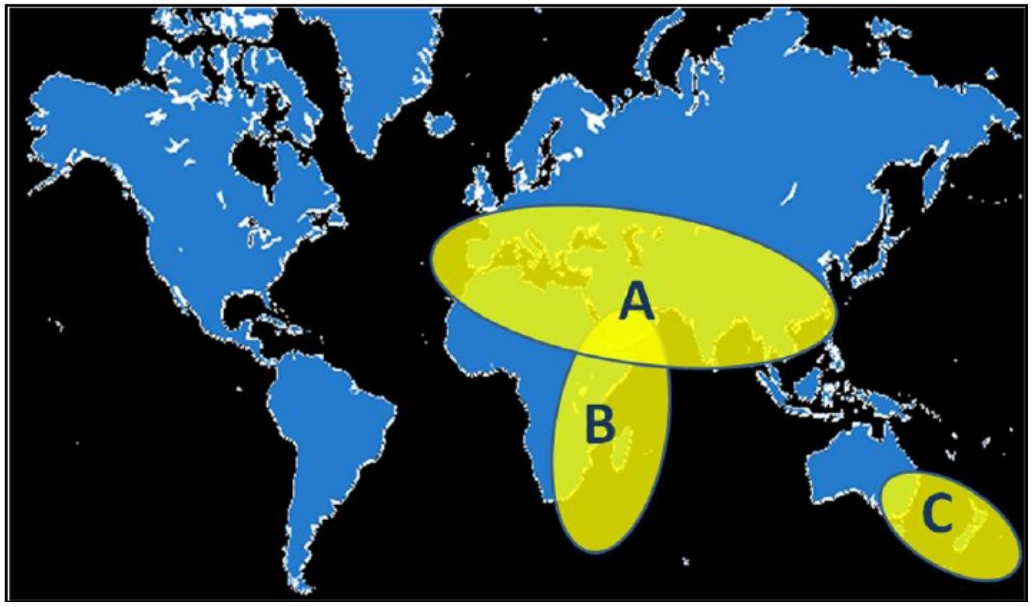
2.2. SMILJE

Smilje (*H. italicum*) je višegodišnja biljka koja pripada porodici glavočika Asteraceae, potporodici Asteroideae, plemenu Gnaphalieae i rodu *Helichrysum* (Ninčević, 2020). Primjer je široko rasprostranjene mediteranske biljke i obuhvaća preko 600 vrsta koje su u svijetu rasprostranjene u tri zone (**Slika 2**) (Bigović, 2013).

Klasifikacija unutar vrste *H. italicum* razlikuje se od autora do autora. Zbog jakoga polimorfizma u morfologiji *H. italicum*, podvrste se ponekad preklapaju i teško ih je razlikovati (Ninčević, 2020).

Prema posljednjoj objavljenoj podjeli (Herrando-Moraira i sur., 2016) na osnovi detaljne multivarijatne analize morfoloških oznaka, predložena je nova podjela podvrste *H. italicum*:

1) *H. italicum* ssp. *italicum* (rasprostranjena u Italiji, Hrvatskoj, na istočnoj mediteranskoj obali Francuske i Korzike, Bosni i Hercegovini, Grčkoj − uglavnom Egejski otoci i Cipar);
2) *H. italicum* ssp. *microphyllum* (endem Krete);
3) *H. italicum* ssp. *siculum* (endem Sicilije);
4) *H. italicum* ssp. *tyrrhenicum* (disjunktna raspodjela na područja između otoka Korzike, Sardinije, Mallorce i Dragonera otočića).



Slika 2 Prikaz rasprostranjenosti roda *Helichrysum* u svijetu:

Mediteran, Srednja i Južna Europa, Zapadna i Centralna Azija;

Južna Afrika, Madagaskar, Istočna tropska Afrika i Sjeveroistočna tropska Afrika;

Istočna i Jugoistočna Australija i Novi Zeland (Bigović, 2013).

2.2.1. Morfološke i fiziološke karakteristike smilja

Smilje je patuljasti aromatični grm sa žutim cvjetovima, visine 50 − 70 cm. Raste samoniklo na suhom, krševitom i pjeskovitom tlu. Upravo ta karakteristika omogućuje ovoj biljci rast na širokom rasponu nadmorskih visina, između razine mora i 2 200 m (Nostro i sur., 2001). Podzemni izdanak smilja razgranat je i duboko prodire u tlo. Iz drvenastog vretenastog rizoma svake se sezone razvije više desetaka stabljika koje nose cvijet (Pohajda i sur., 2015).

Tisuće zlatnožutih cvjetova pravi su ukras gologa mediteranskog kamenjara, gdje cvjetovi i nakon sušenja zadržavaju svoju boju. Biljka je relativno otporna na niske temperature i dobro podnosi dugotrajna sušna razdoblja (Stepanović i sur., 2009). Latinski naziv smilja potječe od grčkih riječi „*helis*“ što znači sunce i „*chrisos*“ što znači zlato. Narodni nazivi su još: smilj, cmilj, cmilje, sredozemno smilje, bilobrada, bela brada, margiž (Bojanić-Rebac i Rebac, 2014; Politeo, 2003). Morfološki i anatomski gledano, građa vegetativnih organa biljke smilja prilagođena je životu u staništima koja obiluju velikim brojem sunčanih dana, a čije je tlo siromašno vodom i biljnim hranjivim tvarima (Politeo, 2003). Na razgranatim stabljikama smilja naizmjenično su raspoređeni uski šiljasti listići koji su s lica zeleni, a s naličja sivozeleni, prekriveni sitnim dlačicama. Donji listići skupljeni su u rozetu. Deblja kutikula listova i guste dlačice na naličju, koje štite puči od transpiracije, osiguravaju ovoj biljci dobru prilagodbu na sušne uvjete staništa, što je svrstava u skupinu kserofitnih biljaka (Pohajda i sur., 2015; Mancini i sur., 2011).

Berba smilja za proizvodnju eteričnog ulja vrši se dva puta godišnje i to kada je smilje u punoj zrelosti, odnosno kada je otvoreno 50 % cvatova karakteristične zlatnožute boje. Prvi period branja smilja je ljeti između 15. lipnja i 15. kolovoza, a drugi period branja je u jesen od 15. listopada do 1. prosinca, ovisno o nadmorskoj visini (Houdret, 2002; Andreani i sur., 2019). Cvijet se bere u ranim jutarnjim satima kada je koncentracija eteričnog ulja najviša. Ubrani cvjetovi moraju se destilirati u roku od 24 sata jer koncentracija eteričnog ulja ubrzano opada nakon branja. Cvijet sadrži vrlo malo eteričnog ulja (manje od 0,05 %), što znači da je za proizvodnju kilograma eteričnog ulja smilja potrebno ubrati više od tone cvjetova (Pohajda i sur., 2015; Houdret, 2002). Biljke uzgojene u kontinentalnim područjima u fazi cvjetanja sadrže 50 % vlage i 0,15 % ulja, a nakon cvjetanja 30 % vlage i 0,13 % eteričnog ulja (Houdret, 2002).

Svježi materijal nakon berbe podložan je fizikalno-kemijskim i mikrobiološkim promjenama zbog djelovanja različitih unutarnjih i vanjskih čimbenika, što dovodi do smanjene kvalitete i gubitka bioaktivnih spojeva. Stoga se sušenje biljnoga materijala najčešće primjenjuje kao predtretman obrade prije procesa ekstrakcije (Nebrigić i sur., 2020).

Prema dostupnim literaturnim podatcima, hidrodestilacija nadzemnih dijelova smilja najčešći je postupak dobivanja eteričnog ulja. Udio eteričnog ulja u biljci izuzetno je mali pa je cijena

eteričnog ulja smilja iznimno visoka (Maksimovic i sur., 2017; Pohajda i sur., 2015). Upravo je naglo povećanje cijena eteričnog ulja *H. italicum* koje se dogodilo 2005. godine potaknulo intenzivno podizanje nasada i povećanje proizvodnje u nekoliko dijelova južne Europe: u Francuskoj, Španjolskoj, Hrvatskoj, BiH, Italiji, Bugarskoj i Srbiji. U istočnoeuropskim mediteranskim zemljama, posebno u BiH i Hrvatskoj, došlo je i do značajnoga povećanja komercijalne eksploatacije populacije samoniklih vrsta *H. italicum*. Zbog svega navedenoga, *H. italicum* postala je najpoznatija biljka mediteranske regije (Ninčević i sur., 2019). U početku se skupljala samonikla biljna sirovina, a sada se uglavnom dobiva plantažnim uzgojem kako bi se odgovorilo na veliku potražnju kozmetičke industrije.

Istraživanje novijeg datuma koje se detaljno osvrnulo na uzgoj smilja s ekonomskog stajališta na području Hercegovine (Čagalj i sur., 2019) pojasnilo je razloge značajnog ekonomskog interesa za eteričnim uljem smilja na istočnoeuropskom mediteranskom tržištu. Povećanje potražnje za eteričnim uljem smilja i njegova visoka tržišna cijena na međunarodnom i domaćem tržištu potakli su povećano sakupljanje ove biljke u prirodi. Povećanje sakupljanja (neorganizirano, neodgovorno i nekvalificirano) prema porastu stope potražnje, vođeno samo profitom, gotovo je dovelo do istrebljenja i propadanja prirodnih staništa smilja u nekim dijelovima Hercegovine. S obzirom na to da te količine nisu bile dovoljne kako bi zadovoljile zahtjeve tržišta, proizvođači (poljoprivrednici) počeli su uzgajati plantaže smilja (**Slika 3**).

Slika 3 Plantaža cvijeta smilja tvrtke Roing, Ljubuški (Izvor: autor)

Poljoprivrednici koji su se odlučili uzgajati nasade smilja podizali su ih obično bez ikakvih planova, nisu bili educirani ni o uzgoju smilja (agrotehnika u uzgoju, nasadi, zaštita od štetnika

i bolesti) ni o poznavanju bilo kakvih ekonomskih pokazatelja proizvodnje smilja. Područja pod smiljem koja su se brzo podigla (na približno 1 500 ha) zbog potrebe zadovoljavanja potražnje doživjela su velike ekonomske probleme. Maloprodajne cijene bile su relativno visoke, trgovci su smilje plaćali izravno na terenu, ali još uvijek nema službenih podataka o sakupljanju ili proizvodnji smilja u BiH. Autori su naveli da se 2017. godine tržište blago stabiliziralo te su otkupne cijene i cijene eteričnog ulja naglo pale.

2.2.2. Kemijski profili eteričnog ulja smilja

H. italicum predstavlja vrijedan izvor bioaktivnih spojeva te je do danas veći broj znanstvenika nastojao odrediti kemijski sastav eteričnog ulja smilja. Unatoč tomu, ono je još uvijek nedovoljno istraženo zbog kompleksnog kemijskoga sastava. Činjenica je da se *Helichrysum* smatra vrlo složenim rodom, s velikim sličnostima između pojedinih vrsta (Sala i sur., 2001), čime se djelomično mogu opravdati povijesne i današnje teškoće u određivanju kemijskoga profila ove biljke. Naime, zbog velikoga broja spojeva, analiza eteričnog ulja poprilično je zahtjevna. Osim toga, riječ je o spojevima slične strukture i sličnih fizikalno-kemijskih svojstava, što dodatno otežava odjeljivanje i identifikaciju (Guinoiseau i sur., 2013; Politeo, 2003).

Genetske razlike značajno utječu na metabolizam biljaka što opravdava razlike u kemijskom sastavu analiziranih eteričnih ulja (Satta i sur., 1999). Također, potrebno je poznavati i dodatne čimbenike koji uzrokuju intraspecifične i intraindividualne varijacije svake vrste koja naseljava određeni lokalitet. Dakle, vrlo važna uloga pripada klimatskim uvjetima (temperatura, oborine, broj sunčanih sati, duljina dana) i čimbenicima iz okoliša (vrsta i pH tla, nadmorska visina, stanište, insekti i mikroorganizmi). Nadalje, kemijski sastav izravno upućuje na biokemijska i fiziološka svojstva svake botaničke vrste. To se prije svega odnosi na to da svaka pojedinačna vrsta koja nastanjuje određeni zemljopisni lokalitet posjeduje specifične enzimske sustave koji su genetski kodirani kako bi proizveli određene kemijske spojeve (Staver i sur., 2018). Stoga gore navedeni čimbenici mogu objasniti varijabilnost u kemijskom sastavu eteričnog ulja smilja (Talic i sur., 2021; Oliva i sur., 2020; Talic i sur., 2019; Tzanova i sur., 2018; Mouahid i sur., 2017; Jerković i sur., 2016; Maggio i sur., 2016; Schipilliti i sur., 2016; Costa i sur., 2015; Kladar i sur., 2015; Zeljković i sur., 2015; Maksimovic i sur., 2013; Leonardi i sur., 2013; Mancini i sur., 2011; Morone-Fortunato i sur., 2010; Hellivan, 2009; Bianchini i sur., 2009, 2003, 2001; Mastelić i sur., 2008; Paolini i sur., 2006; Angioni i sur., 2003; Charles i Simon, 1991; Weyerstahl i sur., 1986; i Peyron i sur., 1980).

Upravo su brojni autori istakli utjecaj nadmorske visine na sastav eteričnog ulja. Usai i sur. (2010) predložili su sakupljanje biljaka između 500 – 700 m nadmorske visine kako bi se dobio visok prinos ulja i ulje bogato neril-acetatom odgovornim za poželjnu aromu biljke. Tundis i sur.

(2005) otkrili su da visina utječe na sadržaj *trans*-kariofilena u eteričnom ulju *H. italicum*, pri čemu su uzorci prikupljeni na 490 m nadmorske visine sadržavali značajnu količinu *trans*-kariofilena, dok su oni prikupljeni na 800 m sadržavali niže količine. Melito i sur. (2016) također su dokazali utjecaj nadmorske visine i klime na sastav eteričnog ulja.

Glavni bioaktivni spojevi eteričnog ulja *H. italicum* su neril-acetat, *α*-pinen, *γ*-kurkumen, *β*-selinen, geraniol, *trans*-nerolidol, *β*-kariofilen, linalool, limonen i 2-metil-cikloheksil-pentanoat (Tucker i DeBaggio, 2009; Mastelić i sur., 2008). Njihovo je biološko djelovanje potvrđeno kroz snažno protuupalno (Sala i sur., 2001), antioksidativno (Kladar i sur., 2015; Mekinić i sur., 2016; Rosa i sur., 2007; Sala i sur., 2003), antimikrobno (Staver i sur., 2018; Djihane i sur., 2017; Stupar i sur., 2014; Mekinić i sur., 2016; Chao i sur., 2008; Rossi i sur., 2007; Mastelic i sur., 2005; Nostro i sur., 2002; 2001) antivirusno (Appendino i sur., 2007), antiproliferativno (Staver i sur., 2018; Han i sur., 2017) i antineoplastično (Gismondi i sur., 2020) djelovanje.

Već su Peyron i sur. (1980) u eteričnim uljima smilja prikupljenim u Francuskoj (Esterel i Korzika) i u tadašnjoj Jugoslaviji pronašli iste spojeve *α*-pinena, limonena, *β*-diketona, nerola, neril-propionata i butirata, ali u različitim koncentracijama. Usporedba kemijskih profila eteričnih ulja smilja iz Grčke i Hrvatske pokazala je da su prilično različita (Chinou i sur., 1997), dok je eterično ulje iz Hrvatske prema kemijskom sastavu sličnije eteričnom ulju s talijanskoga područja (Bianchini i sur., 2003).

Rezultati nedavnog istraživanja provedenog na eteričnom ulju smilja iz uzoraka prikupljenih na deset različitih lokacija u Hercegovini autora Talic i sur. (2021), pokazali su najveći udio monoterpenskih ugljikovodika *α*-pinena (4,1 − 19,3 %) i limonena (1,3 − 6,2 %), dok su neril-acetat (3,6 − 21,1 %) i linalool (2,3 − 5,7 %) bili najzastupljeniji oksidirani monoterpeni. Najzastupljeniji seskviterpenski ugljikovodici bili su *γ*-kurkumen (8,4 − 18,6 %), *trans*-kariofilen (3,1 − 8,5 %) i *β*-selinen (2,8 − 6,7 %) dok je 4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion (5,1 − 14,5 %) bio najzastupljeniji diketon. Istraživanje je obuhvatilo sva područja gdje se smilje pojavljuje od razine mora (7 m) do gorja (761 m). Mladi nadzemni dijelovi biljke (lišće, stabljike i cvjetovi) podvrgnuti su hidrodestilaciji i time je identificiran ukupno 61 spoj. Prinosi eteričnog ulja pokazivali su raspon od 0,15 − 0,32 %. Relativno nizak prinos eteričnog ulja ove mediteranske vrste zabilježen je i u prethodnim sličnim studijama (Mastelic i sur., 2005; Staver i sur; 2018; Blažević i sur., 1995). Prema udjelu pojedinih spojeva u ispitanom eteričnom ulju s područja Hercegovine autori su ga okarakterizirali kao kemotip sa četiri glavne komponente: α-pinen, neril-acetat, γ-kurkumen i β-diketon.

U ispitanom eteričnom ulju s područja BiH, gdje se navodi samo ime dobavljača, no ne i lokacija prikupljanja uzorka, kao glavne komponente eteričnog ulja smilja pojavljuju se *α*-pinen (13,9 %), germakren D (9,0 %) i *ar*-kurkumen (8,7 %) (Karalija i sur., 2020).

Ninčević i sur. (2019) te Viegas i sur. (2014) u svojim izuzetno detaljnim preglednim radovima objavili su istraživanja o tradicionalnoj uporabi i kemijskom sastavu eteričnog ulja i ekstrakata cvijeta smilja, dobivenih različitim ekstrakcijskim metodama u Italiji, Španjolskoj, Portugalu te BiH.

Identifikacija bioaktivnih spojeva eteričnog ulja roda *Helichrysum* predmet je brojnih istraživanja već nekoliko desetljeća te su značajnija istraživanja kemijskog sastava bioaktivnih spojeva vrste *H. italicum* subsp. *italicum* dobivenih postupkom hidrodestilacije objavljena u znanstvenoj literaturi prikazanoj u **Tablici 2.**

2.2.3. Kemijski profili CO_2 ekstrakata smilja

Iako je smilje predmet brojnih istraživanja, u literaturi se nalazi relativno malo podataka o $ESCO_2$ u usporedbi s hidrodestilacijom.

Primijenjene kromatografske metode (uglavnom GC-FID i GC-MS) pokazale su kako su najčešći spojevi prisutni u CO_2 ekstraktima *H. italicum* slični onima dobivenim hidrodestilacijom i destilacijom vodenom parom i to *α*-pinen, neril-acetat i *γ*-kurkumen, pri čemu su ekstrakti sadržavali i značajan sadržaj parafinskih ugljikovodika. Također je zapažena mogućnost ekstrahiranja teže isparljivih seskviterpena i diterpena pomoću $ESCO_2$. U kemijskom profilu ekstrahiranih spojeva nalazili su se izomeri nerola, neril-propanoata, selinena i kariofilena (Maksimovic i sur., 2013; Ivanovic i sur., 2011a).

U nekoliko provedenih istraživanja gdje je prikazana usporedba postupaka $ESCO_2$ i hidrodestilacije rezultati su jasno pokazali da $ESCO_2$ omogućuje veći prinos te veću selektivnost ekstrahiranih spojeva (Mouahid i sur., 2017; Costa i sur., 2015; Ivanovic i sur., 2011a; Maksimovic i sur., 2013; Mićić i sur., 2009; Marongiu i sur., 2003).

Najznačajniji radovi na istraživanju CO_2 ekstrakta *H. italicum* subsp. *italicum* prikazani su u **Tablici 3**. U spomenutim istraživanjima, ekstrakcijski tlak i temperatura varirali su u rasponu 10 – 35 MPa, odnosno 39,85 – 60 °C u periodu od 1,5 do 7,5 sati. Dobiveni prinos ekstrakcije kretao se 1,37 – 5,7 %.

Tablica 2 Kronološki prikaz objavljenih znanstvenih radova o eteričnom ulju smilja *H. italicum* subsp. *italicum* ili drugim vrstama dobivenim procesom hidrodestilacije

Zemljopisno područje	Vrsta destilacije	Vrijeme destilacije (h)	Ukupni postotak identificiranih spojeva (%)	Glavni spojevi	Identifikacijska metoda	Literaturna referenca
Mostar, Blatnica, Crnač, Britvica, Neum, Hutovo, Crnići, Ljubinje, Žakovo, Trebinje; BiH	Clevenger	2	98,8	*γ*-kurkumen (12,6 %); neril-acetat (11,5 %); *α*-pinen (10,7 %); 4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion (7,9 %)	GC-MS	Talic i sur., 2021.
Dubrave, Čapljina; BiH	Destilacija vodenom parom	-	-	*α*-pinen (21,3 %); neril-acetat (10,6 %); izoitalicen (6,3 %); *β*-kariofilen (4,5 %); *α*-kopaen (4,2 %); limonen (3,9 %)	GC-MS	Tanović i sur., 2020
Sarajevo; BiH	Hidrodestilacija	-	75,0	*α*-pinen (13,9 %); germakren D (9,0 %); *ar*-kurkumen (8,7 %); *β*-kariofilen (7,1 %); neril-acetat (5,3 %)	GC-MS	Karalija i sur., 2020.
Botanički vrt Sveučilišta u Rimu; Italija	Hidrodestilacija	5	-	neril-acetat (33,9 %); *α*-pinen (28,5 %); nerol (7,9 %); neril-fenilacetat (7,1 %); *β*-kariofilen (5,7 %); bisabolen (4,8%); azulen (2,9 %)	GC-MS	Gismondi i sur., 2020.
Zapadna Hercegovina; BiH	Clevenger	1,5	96,1 – 98,8	*α*-pinen (15,7 %); *γ*-kurkumen (12,8 %); 4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion (8,7 %); neril-acetat (6,9 %); limonen (6,4 %); *β*-selinen (5,3 %); *trans*-kariofilen (3,9 %); *α*-selinen (3,6 %); *γ*-selinen (3,1 %); *β*-diketon	GC-MS	Talic i sur., 2019.
Ljubuški; BiH	Destilacija vodenom parom	-	-	*α*-pinen (28,5 %); *γ*-kurkumen (9,8 %); *β*-selinen (6,3 %); italicen (5,0 %)	GC-MS	Odak i sur., 2019.
Južni dio; NP Crna Gora	Destilacija vodenom parom	3	67,3	*γ*-kurkumen (14,1 %); *β*-selinen (11,3 %); *α*-kurkumen (10,4 %); *α*-selinen (6,1 %); neril-acetat (3,9 %); *α*-kopaen (3,7 %)	GC-MS	Šćepanović i sur., 2019.

Podgorica; NP Crna Gora	-	-	-	*β*-eudezmen (21,6 %); *β*-bisabolen (19,9 %); *α*-pinen (16,9 %); neril-acetat (10,6 %); kopaen (4,5 %); limonen (3,3 %)	GC-MS	Oliva i sur., 2020.
Lumiu; Sjeverni dio Korzike	Destilacija vodenom parom	5	-	neril-acetat (30,4 %); *γ*-kurkumen (10,1 %); neril-propionat (7,1 %); *ar*-kurkumen (5,8 %); italicen (3,9 %); 4,6,9-trimetildec-8-ene-3,5-dion (3,8 %); *α*-nerol (3,7 %); limonen (3,6 %); *α*-pinen (2,1 %)	GC-MS GC-FID GC-O	Andreani i sur., 2019.
Centralna Italija; Marche regija	Clevenger	2	98,7	neril-acetat (15,7 %); *α*-pinen (8,2 %); 4,6,9-trimetil-dec-8-en-3,5-dion (Italidion I) (7,4 %); *ar*-kurkumen (5,4 %); *β*-selinen (5,4 %); *γ*-kurkumen (4,8 %); nerol (4,7 %); *α*-selinen (4,7 %); limonen (4,5 %); linalool (4,4 %), 2,4,6,9-tetrametil-dec-8-en-3,5-dion (Italidion II) (4,3 %)	GC-MS	Fraternale i sur., 2019.
Stara Zagora; Bugarska	Clevenger	4	89,7	neril-acetat (20,6 %); citronelil-izobutanoat (12,5 %); *α*-pinen (8,7 %); *β*-eudezmen (5,6 %); *α*-kopaen (5,4 %); eudezm-5-en-11-ol (4,9 %); *cis*-*α*-bergamoten (4,8 %); nerol (2,1 %)	GC-FID	Tzanova i sur., 2018.
Zadar – Šibenik −Knin; Hrvatska NP	Destilacija vodenom parom	1,5	98,6	*α*-pinen (21,6 %); neril-acetat (7,9 %); *γ*-kurkumen (21,6 %); *β*-selinen (6,5 %); izoitalicen (5,4 %); *β*-kariofilen (4,9 %); *α*-kurkumen (4,5 %)	GC-MS	Staver i sur., 2018.
Béjaia; Sjeverni Alžir NP	Clevenger	3	99,2	*α*-cedren (13,6 %); *α*-kurkumen (11,4 %); geranil-acetat (10,1 %); limonen (6,1 %); nerol (5,1 %); neril-acetat (4,9 %); *α*-pinen (3,8 %)	GC-MS	Djihane i sur., 2017.

Otok Brač, Biokovo, Tijarica, Makarska; RH	Clevenger	-	47,3 – 66,7	Otok Brač (uzorak A): *α-trans*-bergamoten (10,2 %); *β*-akoradien (10,1 %); *ar*-kurkumen (8,7 %); Biokovo (uzorak B): *α*-humulen (7,3 %); *β*-akoradien (6,9 %); Tijarica (uzorak C): *β*-akoradien (6,7 %); Makarska (uzorak D): rozifoliol (8,5 %)	GC-MS	Zeljković i sur., 2015
Crna Gora	Clevenger	-	96,1	neril-acetat (28,2 %); neril-propionat (9,1 %); *γ*-kurkumen (17,8 %); *ar*-kurkumen (8,3 %); *α*-selinen (3,9 %); izoitalicen (3,2 %); timol (2,8 %); α-cedren (2,4 %)	GC-FID GC-MS	Kladar i sur., 2015.
Konavle; Hrvatska	Clevenger	4	-	*α*-pinen (5,0 %); neril-acetat (4,4 %); italicen (4,0 %); (*E*)-kariofilen (3,6 %)	GC-FID GC-MS	Maksimovic i sur., 2013.
Otok Elba; Italija	Clevenger	2	91,7 – 99,9	neril-acetat (5,6 – 45,9 %); *α*-pinen (0,8 – 32,9 %); 1,8-cineol (do 18,2 %); eudezm-5-en-11-ol (1,8 – 17,2 %); nerol (do 12,8 %); limonen (do 12,9 %)	GC-FID GC-MS	Leonardi i sur., 2013.
Otok Elba [NP]	Clevenger	-	97	*α*-pinen (14,4 %); limonen (12,3 %); linalool (4,2 %); nerol (5,2 %); neril-acetat (25,3 %); *γ*-kurkumen (8,7 %); neril-propionat (6,4 %)	GC-FID GC-MS	Bertoli i sur., 2012.
Konavle, Hrvatska [NP]	Clevenger	4	-	*γ*-kurkumen (12,4 %); *β*-selinen (9,9 %); *trans*-*β*-kariofilen (6,9 %); *α*-selinen (5,9 %); italicen (4,6 %); *ar*-kurkumen (4,01 %)	GC-FID GC-MS	Ivankovic i sur., 2011a.
Nacionalni park Cilento i Diano Valley, Italija	Clevenger	3	90	izoitalicen epoksid (16,8 %); heksadec-1-en (9,8 %); *β*-kostol (7,5 %)	GC GC-MS	Mancini i sur., 2011.
Elba otok [NP]	Clevenger	-	-	neril-acetat (25,3 %); *α*-pinen (14,5 %); limonen (12,3 %); *γ*-kurkumen (8,7 %); neril-propionat (6,4 %)	GC-MS GC-FID	Conti i sur., 2010.
Elba otok, Italija Korzika; Francuska	-	2,5	-	*γ*-kurkumen (2,3 – 41,0 %); *β*-selinen (0 – 38,0 %); *α*-selinen (0 – 26,5 %); nerol (0,4 – 18,8 %);	GC-FID GC-MS	Morone-Fortunato i sur., 2010.

				karvakrol (1,6 – 14,8 %); *ar*-kurkumen (1,1 – 8,3 %); *β*-kariofilen (t–18,6 %); neril-acetat (0,4 − 15,1 %)		
48 lokacija Korzika; Francuska	Clevenger	5	67,8 – 94,9	*α*-pinen (1,8 %); neril-acetat (30,7 %); limonen (5,9 %); nerol (4,3 %); *γ*-kurkumen (4,4 %)	GC GC-MS	Bianchini i sur., 2009.
Split, Hrvatska [NP]	Clevenger	3	98	*α*-pinen (12,8 %); 2-metilcikloheksil-pentanoat (11,1 %); neril-acetat (10,4 %); 1,7-di-epi-*α*-cedren (6,8 %); timol (5,4 %); eremofilen (4,3 %); limonen (4,0 %); 2,3,4,7,8,8a-heksahidro-1*H*-3a,7-metanoazulen (3,1 %); *α*-bergamoten (2,6 %); *ar*-kurkurmen (2,3 %)	GC GC-MS	Mastelić i sur., 2008.
Split, Hrvatska [NP]	Clevenger	3	90,6	*α*-pinen (20,6 – 10,2 %); *α*-cedren (20,5 – 9,6 %); aromadendren (9,4 – 4,4 %); *β*-kariofilen (8,9 – 4,2 %); limonen (8,1 – 3,8 %); 2,3,4,7,8,8a-heksahidro-1H-3a,7-metanoazulen (6,3–3,0 %); *ar*-kurkumen (4,9 – 2,3 %); neril-acetat (23,2 – 11,5 %); 2-metilcikloheksil-pentanoat (12,9 – 8,3 %); geranil-acetat (9,7 – 4,7 %); 2-metilcikloheksil-oktanoat (7,9 – 4,8 %)	GC-MS	Mastelic i sur., 2005.
Toskana, Italija	Clevenger	4	84,5 – 94,2	*α*-pinen (4,1 − 53,5 %); neril-acetat (0,3 − 22,0 %); *β*-selinen (7,2 12,5 %); *β*-kariofilen (5,7 − 11,0 %)	GC-FID GC-MS ^{13}C NMR	Bianchini i sur., 2003.
Korzika; Francuska	Clevenger	4	82,9 – 93,6	neril-acetat (15,8 − 42,5 %); *γ*-kurkumen (0,8 − 13,6 %); limonen (1,9 − 7,3 %); neril-propionat (1,5 − 6,7 %); *β*-diketoni (4,5 – 9,4 %)	GC-FID GC-MS	Bianchini i sur., 2001.
Amorgos; Grčka	Destilacija vodenom parom	3	90,57	geraniol (35,6 %); geranil-acetat (14,7 %); nerolidol (11,9 %); nerol (1,5 %); neril-acetat (7,2 %)	GC GC-MS	Chinou i sur., 1997.

NP - Podvrsta *H. italicum* nije pozna

Tablica 3 Kronološki prikaz objavljenih znanstvenih radova o CO_2 ekstraktima *H. Italicum* subsp. *italicum*

Zemljopisno područje	Tlak MPa	Temperatura (°C)	Vrijeme ekstrakcije (h)	Prinos ekstrakcije (%)	Glavni spojevi	Identifikacijska metoda	Literaturna referenca
Konavle; Hrvatska	35	40	-	2,7	neril-acetat (1,5 %); *ar*-kurkumen (4,1 %); *β*-selinen (4,6 %); ksantorizol (2,1 %), metil-kaprilat (9,2 %), nonakosan (3,0 %); untriakontan (2,7 %); 3,4-dihidro-4,4,5,7,8-pentametil-kumarin-6-ol (5,9 %)	GC-FID	Maksimovic i sur., 2018.
Korzika; Francuska	30	39,85	7,5	-	neril-acetat (18,7 %); *γ*-kurkumen (3,9 %), gvajol (6,4 %); *β*-eudezmol (4,9 %); *α*-eudezmol (3,6 %)	GC-MS	Mouahid i sur., 2017.
Konavle, Hrvatska	15	40	1,7	5,7	kanelal (10,4 %); *α*-santonin (8,1 %); cembrenol (9,2 %); oktakosan (10,2 %)	GC-FID, GC-MS	Maksimovic i sur., 2013.
Konavle, Hrvatska [NP]	10 – 20	40 – 60	1,5	1,4 – 4,1	*α*-pinen (0,1 − 2,6 %); neril-acetat (0,9 − 1,0 %); *ar*-kurkumen (2,9 − 3,5 %), *α*-selinen (1,3 − 1,7 %); *β*-selinen (4,2 − 4,9 %); kariofilen oksid (0,7 − 1,4 %); eudezm-7(11)-en-4-ol (0,6 − 2,2 %); italicen (1,3 − 1,7 %); nonakosan (7,8 – 8,2 %); untriakontan (7,4 – 10,5 %)	GC-FID, GC-MS	Ivanovic i sur., 2011a.
Novi Grad; BiH	8 – 35	40	3	0,3 – 5,7	*γ*-kurkumen (7,28 – 23,35 %), *β*-selinen (3,37 – 5,04), *α*- selinen (2,37 – 5,21 %), *trans*-kariofilen (2,59 – 10,53 %), neril-acetat (2,19 – 3,98)	GC-MS	Mićić i sur., 2009.
Rosolina, Rovigo; Italija [NP]	26	50	3	3,9 – 4,9	-	-	Poli i sur., 2003.

NP - Podvrsta *H. italicum* nije poznata

2.2.4. Potencijalna primjena ekstrakata smilja

Vrste iz roda *Helichrysum* tradicionalno se koriste u narodnoj medicini Europe (posebno u Italiji, Španjolskoj, Portugalu te BiH) i Afrike kao biljni čajevi za otklanjanje tegoba kod kašlja i respiratornih problema, probavnih poremećaja, upalnih procesa kože, jetre i žučnoga mjehura, te za njegu rana (Redzic, 2010).

Upravo su skupine spojeva iz nadzemnih dijelova biljke: flavonoidi, *α*-pironi (s arzanolom kao glavnim protuupalnim i antivirusnim spojem), kumarini, triterpeni, seskviterpeni, derivati acetofenona i spojevi poliacetilena odgovorni za široki spektar primjene. Stoga je *H. italicum* biljka s obećavajućim farmakološkim djelovanjem (Guinoiseau i sur., 2013).

U aromaterapijskoj praksi koristi se samo eterično ulje izolirano iz vrste *H. italicum*. Voinchet i Giraud-Robert (2007) istraživali su terapijske učinke i potencijalne kliničke primjene eteričnog ulja *H. italicum* i maceriranog ulja mošusne ruže (*Rosa rubiginosa*) nakon estetskih i rekonstruktivnih kirurških zahvata, i pritom zaključili da je neril-acetat, glavni spoj eteričnog ulja, doprinio ublažavanju boli. Istraživanja su dodatno pokazala i dobre rezultate poput smanjenja upale, edema i modrica. Uočene učinke pripisali su prisutnosti italidiona. Također su poznati po regenerirajućim svojstvima zbog čega se koriste kod kuperozne kože (crvene vene), hematoma (čak i kod starih hematoma), tromboze i u prevenciji modrica. Italidioni su pokazali djelovanje i kod regeneracije kože i zacjeljivanja rana (Guinoiseau i sur., 2013).

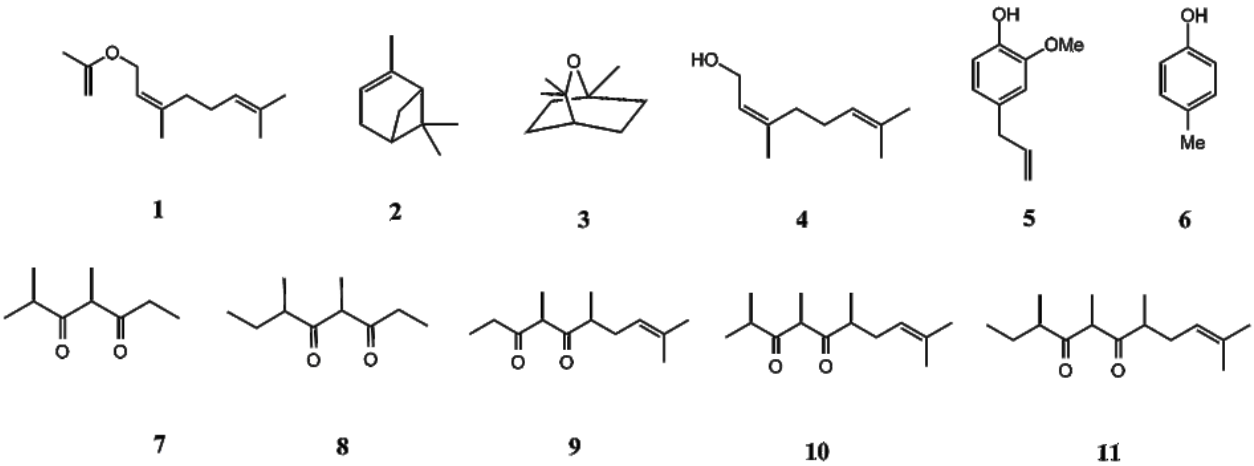
Jedan od najperspektivnijih potencijala eteričnog ulja smilja povezan je s njegovim svojstvom regeneriranja kolagena, što je dovelo do upotrebe u kremama za ublažavanje znakova starenja (Milou i sur., 2010).

Zahvaljujući visokom udjelu polifenola, posebno flavonoida, ima veliku primjenu u kozmetici, naročito u kremama za njegu zrele i nadražene kože (Mellou i sur., 2019; Joshi i Pawar, 2015; Ribeiro i sur., 2015; Barbulova i sur., 2015; Guinoiseau i sur., 2013; Mastelic i sur., 2005; Tundis i sur., 2005; Poli i sur., 2003).

Eterično ulje smilja važno je u kozmetičkoj i parfemskoj industriji zbog svoga složenog kemijskog sastava (Mastelic i sur., 2005). Najznačajniju uporabu u kozmetici i aromaterapiji ima eterično ulje smilja bogato nerolom i njegovim esterima, linaloolom i limonenom.

Snažan i postojan miris *H. italicum* podsjeća na miris kurkume (Mari i sur., 2014). Još su Tucker i sur. 1997. godine kroz istraživanja provedena u Delaveru (Sjeverna Amerika) zaključili da visoke razine *α*-kurkumena (1,08 %) i *γ*-kurkumena (15,98 %) doprinose mirisu sličnom kurkumi, čak i ako su prisutni u značajno nižoj koncentraciji (*α*-kurkumen 0,83 % i *γ*-kurkumen 0,02 %). Istraživanje novijega datuma, provedeno s ciljem identifikacije ključnih mirisnih spojeva biljke *H. italicum* s područja Korzike postupkom plinske kromatografije-olfaktometrije

(engl. *Gas chromatography-olfactometry* − GC-O), pokazalo je da karakterističan miris smilja koji podsjeća na kurkumu nastaje uglavnom zahvaljujući prisutnosti zasićenih diketona **7** i **8** prikazanih na **Slici 4**, zajedno s nekim drugim isparljivim sastojcima, koji su najčešći sastojci eteričnog ulja poput 1,8-cineola **3**, nerola **4**, eugenola **5**, *p*-krezola **6**, itd. Suprotno tome, doprinos oksida **1** i nezasićenih diketona **9**, **10** i **11** bio je mnogo manje značajan (Uehara i sur., 2018).



Slika 4 Glavni mirisni spojevi eteričnog ulja *H. italicum* (Uehara i sur., 2018)

U nastavku prethodnog istraživanja ključnih mirisnih spojeva eteričnog ulja smilja, Andreani i sur. (2019) proveli su novu GC-O analizu uzorka s područja Korzike dobivenog industrijskom destilacijom. Svoje istraživanje proširili su koristeći deset ispitanika prethodno treniranih za memoriranje što više mirisa, koji su suglasno ocijenili da je 4,6-dimetiloktan-3,5-dion spoj eteričnog ulja smilja zaslužan za specifični začinski „curry“ miris ove biljke. Drugi važni mirisni spojevi ispitivanog uzorka bili su monoterpenski, seskviterpenski i fenolni spojevi u niskim količinama ili u tragovima, dok je glavni spoj, neril-acetat imao mnogo manje značajan doprinos. U GC-MS frakcijama otkriveni su i drugi uobičajeni mirisni spojevi eteričnog ulja koji bi se mogli jednoznačno identificirati u olfaktogramu drugih referentnih uzoraka: *p*-krezol, eugenol, linalool i *α*-pinen. Unatoč opsežnoj analizi uzorka, mnogi mirisni spojevi i dalje su neidentificirani što ukazuje na mogućnosti daljnjih istraživanja.

Eterično ulje *H. italicum* djeluje kao:

- antispazmolitik – pomaže u uklanjanju glavobolja, migrena, astme, bronhitisa;
- antialergen – umanjuje i ublažava djelovanje alergija koje se javljaju na koži, ali i na plućima, jetri i slezeni;
- diuretik – olakšava mokrenje uklanjajući otrovne tvari iz urina.

Također, eterično ulje *H. italicum* pokazuje:

- antibakterijsko djelovanje – eterično ulje smilja štiti od bakterijskih infekcija i upala;
- antikoagulantno djelovanje – sprječava stvaranje krvnih ugrušaka;
- protuupalno djelovanje – efikasno je u reduciranju raznih upala koje se javljaju tijekom gripe;
- prirodno sredstvo za smirenje živaca – osigurava pravilno funkcioniranje živčanoga sustava, osnažuje ga i štiti od mogućih poremećaja;
- fungicidno djelovanje – učinkovito sprječava gljivične infekcije;
- aromaterapijsko djelovanje – poboljšava koncentraciju, osigurava lagan san, pozitivno djeluje na raspoloženje, djeluje umirujuće i efikasan je antidepresiv (Kozarić, 2002; Kremer, 2007; Grdinić i Kremer, 2009).

Do sada je u literaturi istraženo antikancerogeno i antiproliferativno djelovanje vrste *H. Italicum* (Gismondi i sur., 2020; Staver i sur., 2018). Premda je vidljiva razlika u kemijskim profilima ovih dvaju eteričnih ulja korištenih za *in vitro* ispitivanje (npr. odsutnost / prisutnost kurkumena), eterično ulje *H. italicum* pokazuje sposobnost zaustavljanja progresije karcinoma, inducirajući molekularne mehanizme koji mogu ovisiti o tipu stanice. Staver i sur. (2018) pokazali su da različiti biološki procesi (npr. apoptoza, zaustavljanje staničnog ciklusa) mogu biti inducirani eteričnim uljem smilja dobivenim kod nekoliko staničnih oblika karcinoma (npr. MCF-7; MIA PaCa-2), dok istraživanje autora Gismondi i sur. (2020) daje preliminarne dokaze antiproliferativne sposobnosti eteričnog ulja smilja protiv B16F10 stanica melanoma mišića. Oba su autora zaključila da se ovo eterično ulje može smatrati obećavajućim prirodnim izvorom novih spojeva u borbi protiv karcinoma.

U Europi se ova biljka godinama koristi i za osvježenje zraka i kao repelent, sredstvo za odbijanje insekata (Guinoiseau i sur., 2013). Istraživanje koje su proveli Drapeau i sur. (2009), gdje su autori ispitivali odbijajući učinakna komarce *Aedesa aegypti*, pokazalo je da je eterično ulje *H. italicum* nezavisno o ispitivanoj koncentraciji (0,1 – 10 %) uspjelo ukloniti oko 30 % komaraca. Autori su zaključili da ovo eterično ulje može biti sredstvo koje treba biti uključeno u pripravke za odbijanje komaraca u kombinaciji s drugim aktivnim spojevima.

Kao nusprodukt destilacije smilja vodenom parom nastaje cvjetna vodica ili hidrolat koji također ima visokovrijedna terapeutska svojstva. Djelovanje hidrolata je analgetično, antikoagulantno, antihematomatično, regenerirajuće, antiinfektivno, protuupalno, ekspektorirajuće, lipolitično, mukolitično i sedativno. Pomaže ublažiti izražajnost svježih ožiljaka, brže zacjeljivanje rana, masnica i upalnih stanja kože. Hidrolat smilja djelotvoran je u tretmanu gingivitisa i parodontoze te grlobolje. U njezi kože lica pogodan je kao tonik za čišćenje (Gulin, 2014).

CO_2 ekstrakt smilja našao je primjenu u biljnoj kozmetici zahvaljujući svom kompleksnom kemijskom sastavu i dokazanoj bioaktivnosti. U prilog toj tvrdnji ide podatak da su u komercijalno dostupnoj bazi podataka o kozmetičkim sastojcima (SpecialChem) dostupna 63 proizvoda podudarna s pretraživanjem po ključnim riječima „*superkritični*“, „*ekstrakt* SCO_2“ i „*superkritični ekstrakt* CO_2“, od kojih je je većina biljnoga podrijetla, dok su drugi alge ili fermentirani proizvodi. Također, postoji nekoliko studija u kojima je CO_2 ekstrakt uveden u kozmetičke formulacije (**Tablica 4**), sugerirajući da je $ESCO_2$ pouzdana tehnika za moguću primjenu u kozmetičkoj industriji.

Tablica 4 Neki kozmetički proizvodi koji sadrže CO_2 ekstrakte (na temelju dostupne znanstvene literature)

	Biljka	**Kozmetički proizvod**	**Djelovanje**	**Literaturna referenca**
1.	Kantarion (*Hypericum perforatum* L.)	Krema	Poboljšana stabilnost proizvoda	Avşar i sur., 2018.
2.	Lavanda (*Lavandula officinalis L.)*	Krema	Poboljšana stabilnost proizvoda	Avşar i sur., 2018.
3.	Origano *Origanum majorana* L.	Losion za kožu	Veći sadržaj mirisnih spojeva	Costa i sur., 2016.
4..	Potrošena i zelena zrna kave	Proizvod za zaštitu od sunca	Visoka UVB/A zaštita	Marto i sur., 2016.
5.	Sjemenke jagode *(Fragaria chiloensis* (L.) Mill. var. *ananassa* Weston)	Gel za tuširanje	Vlaženje i njegujuća svojstva	Sikora i sur., 2015.
6.	Sjeme crnog ribiza *(Ribes nigrum* L.)	Gel za tuširanje	Poboljšanje mirisa, boje i reoloških svojstva	Vogt i sur., 2014.
7.	Sjemenke jagode *(Fragaria chiloensis* (L.) Mill. var. *ananassa* Weston)	Gel za tuširanje	Poboljšanje mirisa, boje i reoloških svojstva	Vogt i sur., 2014.
8.	Šišarice hmelja (*Humulus lupulus* L.)	Gel za tuširanje	Poboljšanje mirisa, boje i reoloških svojstva	Vogt i sur., 2014.
9.	List mente (*Mentha piperita* L.)	Gel za tuširanje	Poboljšanje mirisa, boje i reoloških svojstva	Vogt i sur., 2014.
10.	Sjemenke kaučukovca *(Hevea brasiliensis)*	Ovlaživač za usne	Poboljšana stabilnost proizvoda	Nian-Yian i sur., 2014.
11.	Piqui (*Caryocar brasiliense*)	Losion za ruke	Antibakterijska i antioksidativna aktivnost	Amaral i sur., 2014.
12.	Piqui (*Caryocar brasiliense*)	Tekući sapun	Antibakterijska i antioksidativna aktivnost	Amaral i sur., 2014.

CO_2 ekstrakti dobiveni superkritičnom ekstrakcijom superiorniji su u svom bioaktivnom djelovanju. Ovako dobiveni ekstrakti izuzetno su koncentrirani jer predstavljaju tzv. „*total*“ ekstrakt koji, osim isparljivih spojeva eteričnih ulja, sadrži i druge neisparljive spojeve. Krajnji

proizvod je sasvim prirodan, bogatiji i potpuno čist ekstrakt, te u odnosu na ekstrakte dobivene konvencionalnim metodama potpuno siguran za potencijalnu primjenu u kozmetičkoj industriji (Nostro i sur., 2004).

2.3. KONOPLJIKA

2.3.1. Morfološke i fiziološke karakteristike konopljike

Važnost farmakološki aktivnih prirodnih spojeva iz biljnih izvora posljednjih je godina postala jednim od najaktivnijih područja istraživanja (Rajić i sur., 2016). Popularna ljekovita biljka s prepoznatljivim blagotvornim učinkom na zdravlje je konopljika, *Vitex agnus castus* L. Plodovi, cvjetovi i lišće konopljike sadrže različite bioaktivne spojeve poput iridoida i iridoidnih glikozida (aukubin i agnusid), flavonoida (kasticin, penduletin i kempferol), terpena (viteksilakton i rotundifuran), komponenti eteričnog ulja (npr. limonen, *α*- i *β*-pinen) i ketosteroida (Deanković, 2018; Komušanac, 2016; Marongiu i sur., 2010; Cossuta i sur., 2008; Hajdú i sur., 2007; Sağlam i sur., 2007; Kuruüzüm-Uz i sur., 2003; Saden-Krehula i sur., 1991). Stoga se ova biljka može uspješno koristiti kao jeftin izvor fenolnih spojeva, posebno u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Latoui i sur., 2012). Upravo su sušeni plodovi konopljike osnovna sirovina za pripremu biljnih preparata kod predmenstrualnih poremećaja uzrokovanih primarnom i sekundarnom insuficijencijom žutoga tijela i mastodinijom (sindromom bolnih dojki) te kod tegoba tijekom menopauze (Novak i sur., 2005). Spojevi odgovorni za ta djelovanja još uvijek nisu utvrđeni (Marongiu i sur., 2010).

Konopljika je formalno klasificirana u obitelj Verbenaceae, koja raste u tropskim i suptropskim područjima (Meena i sur., 2010), no filogenetska klasifikacija smjestila ju je u porodicu Lamiaceae (Aissaoui, 2010). Ovaj je rod važan prirodni izvor hrane i ljekovitih tvari širom svijeta. Postoji oko 270 poznatih vrsta roda *Vitex* distribuiranih po cijelom svijetu (Meena i sur., 2010), od čega je fitokemijski proučeno samo 28 vrsta (Ganapaty i Vidyadhar, 2005), među koje se pored *Vitex agnus-castus* ubrajaju *V. limonifolia*, *V. altissima*, *V. rotundifolia*, *V. peduncularis*, *V. negundo* var. *cannabifolia*, *V. vestita*, *V. Rehmannii*, itd. (Yao i sur., 2016). Ova biljka uglavnom raste na vlažnim primorskim staništima obala i dolina, te na pjeskovitim tlima i stjenovitim predjelima u blizini mora. Može se pronaći i na vapnenačkim padinama te na sunčanim i vrućim mjestima. Činjenica je da preferira tla siromašna s $CaCO_3$ i kalijem, a bogata fosforom. Rastući uz obale Sredozemlja, prodire prema unutrašnjosti do otprilike 250 km i između visina razine mora do 750 m, osobito u područjima u kojima prevladava mediteranska klima (Dogan i sur., 2011). Konopljika raste kao veliki, listopadni, višestruki grm s malim i uskim lišćem, zelenim na vrhu (Hussein, 2007). Ima ljubičaste do svijetloljubičaste cvjetove koji cvjetaju od srpnja do kraja rujna. Cvjetanje je praćeno s pojavom četiri sjemena

vrlo slična crnom papru (Cossuta i sur., 2008). Plod konopljike je ovalnog do gotovo kuglastog oblika, promjera do 5 mm. Eterično ulje ploda konopljike dobiveno postupkom destilacije karakterizira blijedožuta do žuta boja. Odmah nakon destilacije eterično ulje ima ugodnu, pomalo neobičnu mirisnu notu, podsjećajući na kanabis i eukaliptus te se nekoliko minuta nakon pojavljuje aromatičan cvjetni, topli, ali svježi, pomalo papreni, slatki, začinski miris s drvenim podtonovima nalik limunu (Sorensen i Katsiotis, 1999).

Konopljika pripada skupini biljaka koje se u narodnoj medicini koriste stoljećima, a poznata je i kao biljka čija je primjena posebno namijenjena ženama zbog sposobnosti liječenja određenih hormonalnih poremećaja (Dogan i sur., 2011). U medicinske se svrhe koristi najmanje dvije tisuće godina te je i Hipokrat preporučivao uporabu konopljike kod ozljeda i upala (Meier i sur., 2008). Specifični epitet ove biljke potječe od latinskih riječi "*castitas*" (čednost) i "*agnus*" (janje). Biljka je također poznata pod zajedničkim nazivom "*čedno drvo*" zbog svoje sposobnosti da smanji libido i promovira čistoću kod žena te celibat kod redovnika. Upravo su je redovnici najčešće koristili kao začin u kuhanju, pa je biljka u narodu poznata kao "*fratrov papar*" (Daniele i sur., 2005).

2.3.2. Kemijski profili eteričnog ulja konopljike

U vrstama roda *Vitex* prisutne su različite vrste sekundarnih metabolita poput terpena, flavonoida, lignana, fenolnih kiselina, antrakinona itd., pri čemu su terpeni najprisutniji spojevi u obliku monoterpena, seskviterpena, diterpena i triterpena (Yao i sur., 2016).

Budući da je konopljika ljekovita biljka, važno je kvantificirati njezine aktivne spojeve koji doprinose terapijskim aktivnostima (Latoui i sur., 2012). Glavne skupine sekundarnih metabolita pronađenih u plodu konopljike predstavljaju flavonoidi, iridoidi i diterpeni. Kasticin se smatra glavnim flavonoidom, a od ostalih flavonoidnih derivata prisutni su krizosplenetin, krizosplenol D, cinarozid, kvercetagetin, kempferol, izoviteksin, izoramnetin i 7-C-glikozidi luteolina (izoorientin). Među iridoidima ističu se agnozid, aukubin i agnukastozidi A-C. Diterpeni labdanskoga tipa su rotundifuran, viteksilakton, viteksilaktam A, vitetrifolin B i C te 6*β*,7*β*-diacetoksi-13-hidroksi-labda-8,14-dien. U ekstraktima listova, plodova i cvatova identificirani su ketosteroidi (Deanković, 2018). Literaturni pregled provedenih istraživanja na eteričnom ulju ploda konopljike prikazan je u **Tablici 5**.

2.3.3. Kemijski profili CO_2 ekstrakata konopljike

Pregledom literature utvrđeno je da se u znanstvenim radovima nalazi relativno malo podataka o $ESCO_2$ ploda konopljike (Rajić i sur., 2016) što dodatno otežava usporedbu s eteričnim uljem dobivenim postupkom hidrodestilacije (**Tablica 6**).

Ekstrakt dobiven $ESCO_2$ sadrži vrijedne spojeve poput komponenti eteričnog ulja (koje sadrži *β*-kariofilen, 1,8-cineol, itd.), diterpena (rotundifuran), triterpena (*β*-sitosterol, *β*-amirin) i flavonoida (kasticin). Ovi se spojevi mogu ekstrahirati u znatno većim koncentracijama $ESCO_2$ u usporedbi s ekstrakcijom tradicionalnim organskim otapalima, pri čemu je moguće dobiti visokovrijedne bioaktivne ekstrakte (Cossuta i sur., 2008). Iako se ekstrakti i eterično ulje mogu dobiti i iz lista i cvijeta konopljike, u ovom je istraživanju korišten plod konopljike s obzirom na mali broj objavljenih znanstvenih radova na tu temu. Stoga je svrha ovog istraživanja upravo nadopuna znanstvenih saznanja o kemijskom sastavu ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$, ispitanog prvi put na području Hercegovine.

Tablica 5 Kronološki prikaz objavljenih znanstvenih radova o eteričnom ulju ploda konopljike *Vitex agnus castus* dobivenom hidrodestilacijom

Zemljopisno područje	Vrijeme destilacije (h)	Ukupni postotak identificiranih spojeva (%)	Glavni spojevi	Identifikacijska metoda	Literaturna referenca
Sarajevo; BiH	-	79,7	limonen (18,2 %); *β*-pinen (17,5 %); (E)-*β*-farnezen (10,1 %); *β*-kariofilen (6,7 %); *α*-pinen (6,9 %); (*E*)-*β*-farnezen (10,1 %)	GC-MS	Karalija i sur., 2020.
Azerbajdžan; Iran	2,5	99,9	*α*-pinen (19,5 %); 1-metil-4-(1-metiletenil) (13,4 %); kariofilen (8,5 %); sabinen (6,9 %); *β*-seskvifelandren (6,0 %)	GC-MS	Katiraee i sur., 2015.
Maroko	3	98,8	1,8-cineol (19,6 %); sabinen (14,6 %); *α*-pinen (9,7 %); *β*-farnezen (6,0 %); *β*-kariofilen oksid (5,8 %); *β*-kariofilen (5,0 %); sklareol (1,9 %); *β*-sitosterol (3,2 %)	GC-MS	Asdadi i sur., 2015.
Igalo; Crna Gora	3	99,2	*α*-pinen (9,4 %); sabinen (13,4 %); 1,8-cineol (16,3 %); limonen (6,8 %); kariofilen oksid (4,6 %), *trans*-*β*-farnezen (9,3 %); *trans*-*β*-kariofilen (4,1 %); *α*-terpenil-acetat (4,6 %)	GC GC-MS	Stojković i sur., 2011.
Sardinija; Italija	-	-	(*E*)-*β*-farnezen (14,4 %); biciklogermakren (14,0 %); 1,8-cineol (7,4 %); manool (4,0 %); *α*-terpinil-acetat (4,9 %); sabinen (4,9 %); *α*-pinen (4,1 %); *β*-felandren (2,7 %); (*E*)-kariofilen (2,5 %); spatulenol (1,1 %)	GC-MS	Marongiu i sur., 2010.
Manisa; Turska	5	94,1	1,8-cineol (24,9 %); sabinen (13,5 %); *α*-pinen (10,6 %); *α*-terpinil acetat (6,6 %); (*Z*)-*β*-farnezen (5,4 %); *β*-kariofilen (4,5 %)	GC GC-MS	Sarikurkcu i sur., 2009.
Mallorca; Španjolska	1		1,8-cineol (14,0 − 30,2 %); sabinen (13,8 − 48,2 %); *α*-pinen (1,1 − 25,5 %); *β*-felandren (0,8 − 10,9 %); *α*-terpinil-acetat (3,1 − 5,2 %); *trans*-*β*-farnezen (0,3 − 0,6 %); biciklogermakren (1,6 − 9,9 %)		Novak i sur., 2005.
Kreta; Grčka	5	70 – 80	sabinen (16,6 − 31,2 %); 1,8-cineol (4,4 − 14,5 %); (*E*)-*β*-farnezen (4,8 − 9,9 %); *α*-pinen (0,4 − 10,2 %); *β*-kariofilen (1,4 − 6,0 %)	GC GC-MS	Sorensen i Katsiotis, 1999.
Salermo; Italija	3	95	1,8-cineol (20,6 %); *β*-kariofilen (9,3 %); sabinen (7,1 %); *cis*-*β*-farnezen (6,9 %); *α*-pinen (6,8 %); *β*-selinen (6,0 %); *α*-terpineol (5,5 %)	GC GC-MS	Senatore i sur., 1996.
Otok Hvar; Hrvatska − prva sezona; druga sezona	3	-	*α*-pinen (6,6; 19,7 %); sabinen (22,3; 16,1 %); 1,8-cineol (20,7; 23,4 %); α-terpinil-acetat (4,4; 2,5 %); *β*-kariofilen (0,9; 2,1 %); (*E*)-*β*-farnezen (1,7; 4,1 %); kariofilen oksid (5,5; 4,1 %)	GC	Kustrak i sur., 1994.

Tablica 6 Kronološki prikaz objavljenih znanstvenih radova o CO_2 ekstraktu ploda *Vitex agnus castus* dobivenom postupkom $ESCO_2$

Zemljopisno područje	Tlak (MPa)	Temperatura (°C)	Vrijeme ekstrakcije (h)	Prinos procesa	Glavni spojevi	Identifikacijska metoda	Literaturna referenca
Sardinia; Italija	9	40	-	2,2 % (v/v)	(E)-*β*-farnezen (16,9 %); biciklogermakren (15,7 %); 1,8-cineol (9,1 %); manool (5,9 %); *α*-terpinil-acetat (4,7 %); sabinen (4,2 %); *α*-pinen (3,6 %); *β*-felandren (2,3 %); (*E*)-kariofilen (2,3 %); spatulenol (1,5 %)	GC-MS	Marongiu i sur., 2010.
Budimpešta; Mađarska	10; 27,5 i 45	40, 50 i 60	4 – 7	1,9 – 65,7 g/kg	rotundifuran (4,7); *β*-sitosterol (4,9); *β*-amirin (3,4); kasticin (12,4)	TLC; TLC-denzitometrija GC; HPLC	Cossuta i sur., 2008.

2.3.4. Potencijalna primjena ekstrakata konopljike

Konopljika je popularna ljekovita biljka s prepoznatljivim blagotvornim učincima na ljudsko zdravlje (Souto i sur., 2020). Prema podatcima iz tzv. *„ljekaruša“*, starih zbirki s ručno pisanim receptima i uputama za liječenje, plod konopljike se već nekoliko stoljeća koristi za regulaciju funkcije reproduktivnih organa kod žena. Istraživanja novijeg datuma pokazala su kako su upravo diterpeni odgovorni za normalizaciju estrogena i progesterona te točnu razinu prolaktina (Jarry i sur., 2006). Zahvaljujući njihovom djelovanju, smatra se da su ključni za normalizirajući i uravnotežujući učinak na proizvodnju hormona, te na povećanje razine luteinizirajućeg hormona (LH) bez utjecaja na folikule stimulirajućega hormona (FSH) kod žena, no još uvijek nije utvrđen točan mehanizam djelovanja (Hussein, 2007).

Ova biljka također ima široka farmakološka svojstva poput antibakterijskih, antihistaminskih, protuupalnih i antioksidativnih aktivnosti (Meena i sur., 2010). Kasticin ima antioksidativno i antikancerogeno djelovanje (Ilhan, 2020; Haïdara i sur., 2006) te ekstrakt može biti korišten za prevenciju i/ili liječenje ne samo benigne hiperplazije prostate, već i raka prostate (Weisskopf i sur., 2005).

Pored uporabe plodova konopljike zabilježene u literaturi za liječenje predmenstrualnog sindroma, kod poremećaja menstrualnog ciklusa, uključujući amenoreju te hiperprolaktinemiju, koristi se i kao laktogen, za liječenje akni, protiv gljivica te protiv anksioznosti i ranoga poroda. Niroumand i sur. (2018) dali su detaljan pregled farmakoloških učinaka konopljike baziranih na *in vivo* i *in vitro* studijima, te na osnovi provedenih kliničkih istraživanja učinkovitosti uporabe konopljike kod različitih oboljenja.

Europska agencija za lijekove 2010. godine izdala je izvješće o uporabi samljevenih i suhih plodova konopljike u fitomedicini sa sljedećim kemijskim sastavom:

- iridoidglikozidi (oko 1 %), uključujući agnozid i aukubin, te agnukastoside A-C;
- flavonoidi poput kasticina (lipofilni) sa sadržajem 0,02 – 2,0 %, male količine penduletina, krizosplenola D, viteksina i eupatorina; hidrofilni flavonoidi vrste O- ili C-glikozida kao orientin, luteolin-7-glikozid i izoviteksin;
- eterično ulje s glavnim sastojcima (15 – 25 %) kao što je 1,8-cineol; limonen; *α*- i *β*-pinen; u manjim količinama (2 – 5 %) bornil-acetat; kamfen; *p*-cimen i sabinen;
- trigliceridi s *α*-linolenskom, palmitinskom, oleinskom, stearinskom i linolenskom kiselinom;
- diterpeni poput rotundifurana (0,04 – 0,3 %), viteksilaktona (0,02 – 0,17 %), vitetrifolina B.

Nekoliko uspješnih kliničkih ispitivanja potvrdilo je upotrebu ekstrakata konopljike za liječenje predmenstrualnoga sindroma (PMS-a) (Hossein-Rashidi i Nemati, 2017; Momoeda i sur., 2014; Ambrosini i sur., 2013; Schellenberg i sur., 2012). Klinička ispitivanja pokazala su blagotvorne terapeutske učinke nakon tri mjeseca liječenja, ali i postupno vraćanje simptoma nakon prestanka liječenja (Berger i sur., 2000; Schellenberg, 2001; Lauritzen i sur., 1997). Provedene studije ukazuju na to da je za terapeutski učinak potrebna dugotrajna suplementacija.

Primjena ploda konopljike kontraindicirana je u trudnoći i tijekom dojenja zbog nepoznatih učinaka u ranoj trudnoći i mogućih hormonskih učinaka kroz majčino mlijeko. Istraživanja na ženama kojima bi se utvrdila sigurnost uporabe ploda konopljike tijekom trudnoće i dojenja nisu provedena (Dugoua i sur., 2008).

Nuspojave su rijetke i uključuju osip, gastrointestinalni poremećaj, glavobolju i pojačano menstrualno krvarenje (Asdadi i sur., 2015). Također je potrebno spomenuti i da postoji potreba za sveobuhvatnijim kliničkim ispitivanjem uporabe pripravaka na bazi konopljike tijekom dužega perioda kako bi se donijeli konačni zaključci o nalazima povezanim s učincima i posljedicama dugotrajne konzumacije (Souto i sur., 2020).

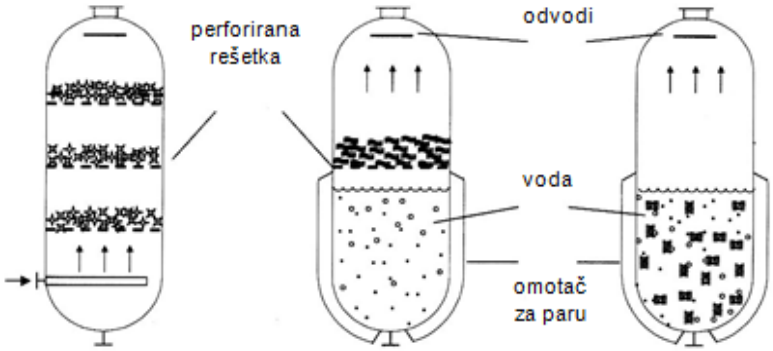
2.4. DESTILACIJA I SUPERKRITIČNA FLUIDNA EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je prvi korak u istraživanju bioaktivnih spojeva iz ljekovitoga bilja. Ovisno o izboru otapala, procesnih parametara i u konačnici same metode, ekstrakcijom se može ostvariti visok stupanj selektivnog uklanjanja nečistoća i dobivanje ekstrakata sa standardiziranim kemijskim profilom, a shodno tomu i visokim terapijskim učinkom. S obzirom na to da se biološki aktivni spojevi nalaze u malim količinama u biljnom materijalu, kvalitativna i kvantitativna istraživanja bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala uglavnom se oslanjaju na odabir odgovarajuće ekstrakcijske metode te se izolacija bioaktivnih spojeva iz biljnoga materijala može provesti različitim ekstrakcijskim postupcima: klasičnim i suvremenim.

Klasični postupci koji se koriste za proizvodnju biljnih izolata su destilacija (hidrodestilacija, parna destilacija i vodeno-parna destilacija), ekstrakcija pomoću neisparljivih otapala (životinjska mast, aktivni ugljen) te ekstrakcija organskim otapalima (etanol, metanol, petroleter, benzen, aceton, *n*-heksan i dr.). Za proizvodnju eteričnih ulja iz ljekovitih biljaka najčešće se koriste hidrodestilacija i destilacija vodenom parom te prešanje, ukoliko se radi o dobivanju eteričnih ulja iz kora citrusa (Mujić i Jokić, 2018).

2.4.1. Izolacija eteričnih ulja destilacijom

Destilacija je tradicionalna metoda za izolaciju eteričnog ulja iz biljaka. Masovna primjena postupaka destilacije omogućuje preradu velikih količina aromatičnih biljaka na jednostavan i ekonomičan način. Postupak destilacije primjenjuje se za izoliranje, pročišćavanje ili razdvajanje tvari koje se ne miješaju ili se neznatno miješaju s vodom. Temperatura vrenja smjese koju čine voda i biljni materijal je temperatura na kojoj je suma parcijalnih tlakova komponenti jednaka tlaku u sustavu, najčešće atmosferskom tlaku. Visoke temperature mogu dovesti do degradacije određenih isparljivih spojeva te upravo ovaj nedostatak ograničava uporabu destilacije za izolaciju termolabilnih spojeva (Azmir i sur., 2013). Postoje tri različita načina destilacije: vodena destilacija (hidrodestilacija), vodeno-parna destilacija i parna destilacija (**Slika 5**). Pravilnim korištenjem opreme za navedene vrste destilacije dobivaju se ulja neupitne kvalitete (Jerković, 2008).



a) Parna destilacija b) Vodeno-parna destilacija c) Vodena destilacija

Slika 5 Različiti tipovi destilacije (Meyer-Warnod, 1984)

Parna destilacija

Princip rada parne destilacije temelji se na uvođenju vodene pare iz generatora pare s dna u biljni materijal postavljen na rešetku, pri čemu biljni materijal nije u direktnom kontaktu s vodom. Koristi se zasićena ili pregrijana para, najčešće kod povišenih tlakova. Vodena para iznosi eterično ulje iz biljnoga materijala u kondenzator gdje se pare kondenziraju, a potom se ulje odjeljuje od vode u separatoru i sakuplja (Jerković, 2008).

Vodeno-parna destilacija

Destilacija vodom i vodenom parom izvodi se uz istovremeni kontakt vode i vodene pare s usitnjenim biljnim materijalom. Biljni materijal postavlja se na perforiranu podlogu na određenoj udaljenosti od dna posude ispunjene vodom (biljni se materijal nalazi neposredno iznad vode). Zasićena, u ovom slučaju, vlažna para podiže se kroz biljni materijal (Skala i sur., 1999). Ovu destilaciju karakterizira veći prinos i kvaliteta eteričnog ulja u odnosu na ulja dobivena vodenom destilacijom. Pretežno se koristi u industriji, a rjeđe u laboratoriju (Jerković, 2008;

Skala i sur., 1999). Nedostatak ove metode je povećana mogućnost stvaranja artefakata-spojeva koji nisu izvorno prisutni u biljci, a koji su nastali zbog termičkih degradacijskih reakcija, npr. hidrolize (Jerković, 2008).

Vodena destilacija

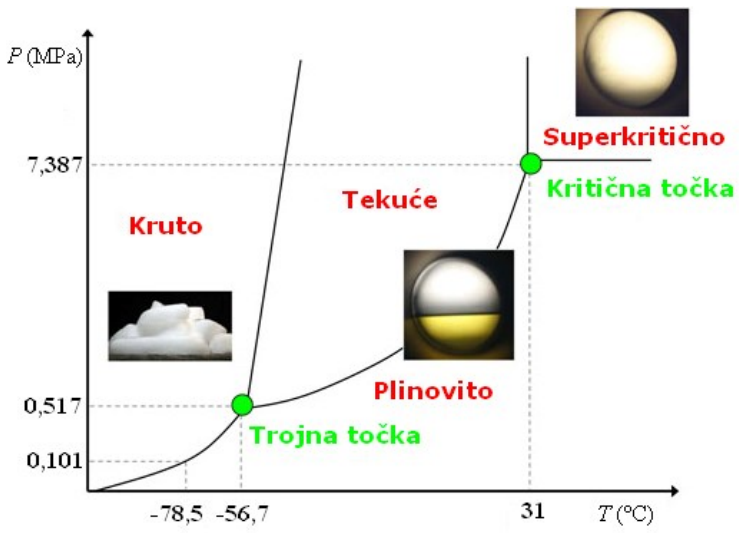
Vodena destilacija je metoda čiji se princip rada temelji na postavljanju usitnjenog biljnog materijala u vodu uz zagrijavanje do ključanja, najčešće pri atmosferskom tlaku. Pare eteričnog ulja i vode kondenziraju se u hladilu i sakupljaju. Postoje različite izvedbe laboratorijskih aparatura, stoga razlikujemo one koji se koriste za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode. Na vrh nastavka stavlja se hladilo, a na dno aparature tikvica s biljnim materijalom i vodom (Jerković, 2008).

2.4.2. Superkritična fluidna ekstrakcija

Kako bi se prevladala ograničenja klasičnih metoda ekstrakcije poput dugotrajne provedbe, degradacije termolabilnih spojeva pod utjecajem visokih temperatura; uporabe toksičnih organskih otapala te shodno tomu i negativnog utjecaja na okoliš, razvijene su nove zelene tehnike ekstrakcije (Mujić i Jokić, 2018; Blekić i sur., 2011; Babović i Petrović, 2010). Neke od najperspektivnijih suvremenih metoda ekstrakcije su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom, ekstrakcija potpomognuta hladnom plazmom, ekstrakcija pomoću enzima, ekstrakcija pomoću pulsirajućeg električnog polja, te ekstrakcija superkritičnim fluidima (Mujić i Jokić, 2018). Razumijevanje svakog aspekta procesa ekstrakcije od vitalne je važnosti jer se većina tih metoda temelji na različitim mehanizmima, a poboljšanje ekstrakcije ovisi o izabranoj ekstrakcijskoj metodi, karakteristikama biljnoga materijala te željenom spoju koji se želi ekstrahirati. ESCO_2 može odgovoriti na navedene nedostatke te poslužiti kao odlična alternativa u ekstrakciji eteričnih ulja (Pavlić, 2017). U ovoj doktorskoj disertaciji istraživanja su bila usmjerena na upravo ovu inovativnu zelenu tehniku ekstrakcije.

SFE je suvremena metoda ekstrakcije kojom se mogu ekstrahirati vrijedni bioaktivni spojevi iz biljnih materijala. Ova operacija prijenosa tvari temeljena je na činjenici da pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste prirodnih spojeva u blizini svoje kritične točke ili u superkritičnom području (**Slika 6**) (Jokić, 2011).

Kritična temperatura i kritični tlak, te kritična gustoća definiraju kritičnu točku neke čiste tvari koja predstavlja krajnju točku razdvajanja plinske i tekuće faze. Iznad kritične točke ne mogu zasebno postojati ni tekuća, ni plinovita faza, a superkritični fluidi imaju svojstva i plinova i tekućina (Jokić, 2011; Brunner, 2005).



Slika 6 Fazni dijagram (tlak-temperatura za CO_2) (Jokić, 2011)

Tablica 7 Vrijednost pojedinih fizikalno-kemijskih svojstava za plinovito, tekuće i superkritično stanje fluida (Aladić, 2015)

Stanje fluida	Plin	Tekućina	Superkritični fluid
Gustoća (kg/m^3)	1	300 – 900	1000
Koeficijent difuzije (cm^2/s)	10^{-1}	10^{-3} – 10^{-4}	10^{-5}
Viskoznost (Pas)	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}

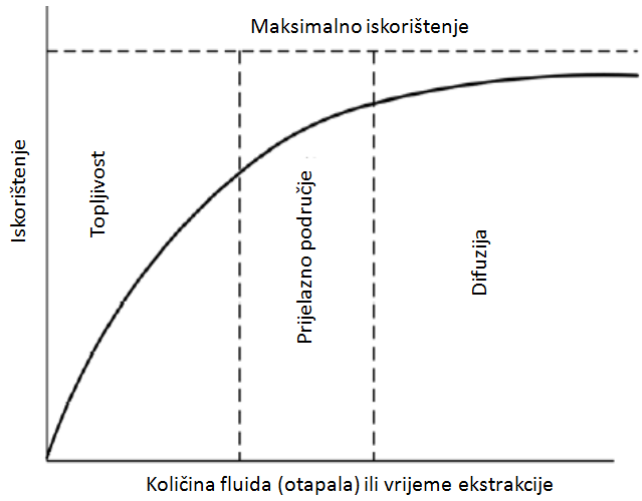
U superkritičnom stanju gustoća fluida približava se gustoći tekućine, viskozitet se približava viskozitetu normalnih plinova, a difuzija je dva reda veličine veća nego kod tipičnih tekućina (**Tablica 7**). Difuzija i viskoznost superkritičnih fluida slične su kao kod plinova što olakšava njihovo prodiranje u poroznu strukturu biljnoga materijala, dovodeći do značajnog povećanja i lakog razdvajanja faza (Jokić, 2011).

2.4.2.1. Mehanizam procesa superkritične ekstrakcije

Brzina superkritične ekstrakcije u početnoj fazi ovisi o ravnoteži faza (topljivost određenih spojeva) na određenom tlaku i temperaturi (ekstrakcijska krivulja je linearna) (**Slika 7**) (Ivanović, 2011).

Izravna korelacija topljivosti i gustoće superkritičnih fluida osnovni je princip na kojemu se bazira ova ekstrakcijska tehnika. Svaki plin iznad svoje kritične točke pokazuje veliko povećanje, ali i veliku promjenu gustoće povećanjem tlaka (iznad kritične temperature). Upravo se malim promjenama tlaka i temperature fluidima u superkritičnom stanju mijenja i sposobnost otapanja bez promjene sastava otapala. Povećanjem tlaka ekstrakcije pri konstantnoj temperaturi raste i topljivost, što je direktno povezano s povećanjem gustoće superkritičnog fluida. Povećanje gustoće osigurava i bolju selektivnost. Povećanje temperature dovodi do

smanjenja gustoće superkritičnog fluida što opet vodi ka povećanoj topljivosti spojeva pri višim tlakovima. Ovaj proces moguće je objasniti činjenicom da je pri višim tlakovima povećanje tlaka pare komponente veće u odnosu na smanjenje gustoće superkritičnog fluida (Mujić i Jokić, 2018).



Slika 7 Tipična ovisnost prinosa ekstrakta o funkciji vremena ekstrakcije ili količini utrošenog otapala (Ivanović, 2011)

Osim topljivosti, važnu ulogu u procesu ekstrakcije ima prijenos tvari. Dakle, prva faza ekstrakcije uvjetovana je topljivošću spojeva u superkritičnom otapalu, dok je brzina druge faze uvjetovana brzinom difuzije te ovaj dio procesa određuje vrijeme trajanja ekstrakcije (Mujić i Jokić, 2018).

Proces ekstrakcije superkritičnim fluidima odvija se u pet uzastopnih faza (Jokić, 2011):

- difuzija superkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje;

- prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz vanjski sloj sfernog omotača, krutog, inertnog materijala;

- kontakt superkritičnog fluida s otopljenom tvari na površini jezgre čestice i ekstrakcija otopljene tvari;

- difuzija otopljene tvari u superkritičnom fluidu kroz sloj vanjskoga sfernog omotača krutog inertnog materijala na vanjsku površinu čestice;

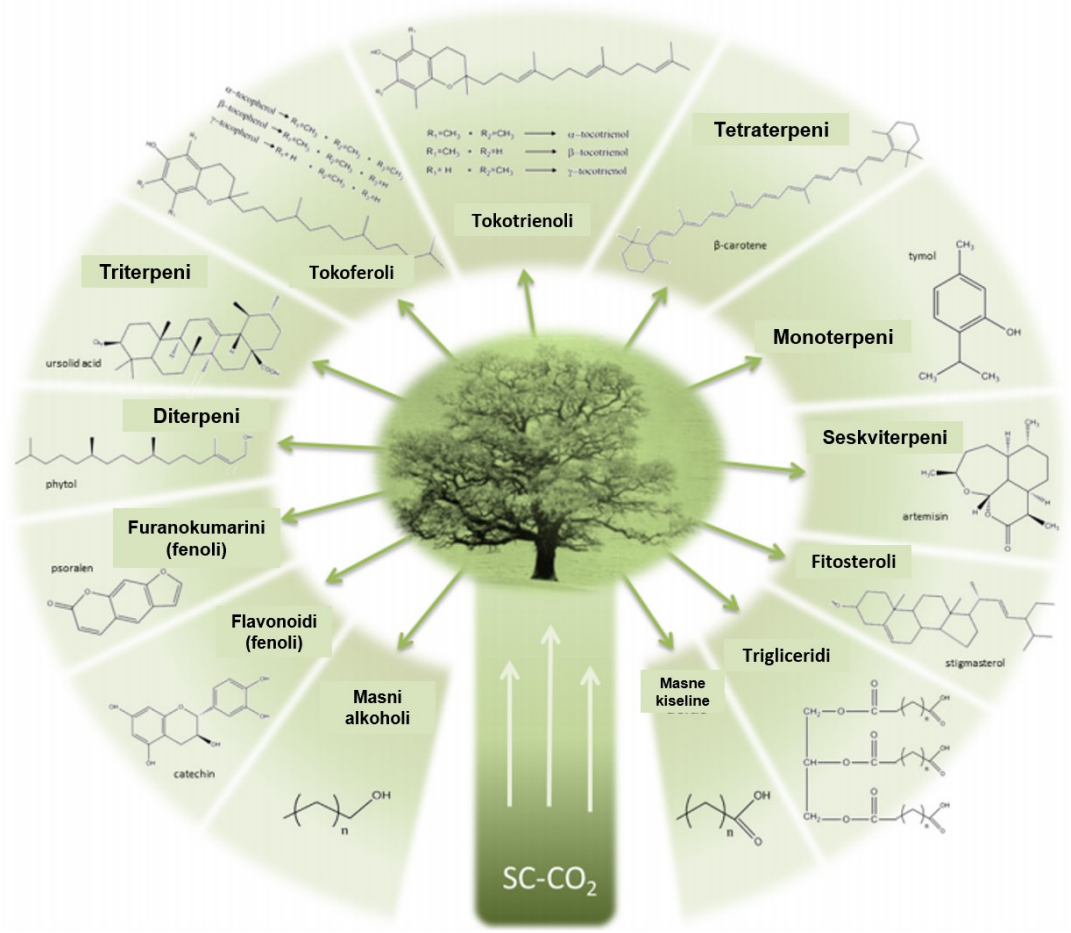
- difuzija otopljene tvari u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida.

Vidljivo je kako uslijed promjene otpora prijenosu, odnosno povećanja utjecaja difuzije kroz čvrstu fazu mase ekstrakcijska krivulja dobiva konveksni oblik (Ivanović, 2011). Ukoliko je

kontrolirajući stupanj procesa vanjski prijenos mase ili ravnoteža faza, brzina ekstrakcije podešava se pravilnim izborom protoka superkritičnog fluida. U slučaju kada se difuzija odvija kroz čvrsti sloj biljnoga materijala, stupanj usitnjenosti i bubrenje biljnog materijala imaju ključnu ulogu kod brzine ekstrakcije (Stamenic i sur., 2010; Zizovic i sur., 2008; Reverchon i De Marco, 2006).

Usitnjavanjem polaznoga biljnog materijala povećava se kontaktna površina materijala s otapalom, skraćuje se difuzijski put kroz kruti materijal, što omogućuje intenzivniji prijenos tvari. (Mujic i Jokic, 2018). Prema literaturnim podatcima (Reverchon i De Marco, 2006), veličina čestica materijala koji se koristi u procesu ekstrakcije trebala bi se kretati u intervalu od 0,25 mm do 2 mm.

SFE se kao ekstrakcijska metoda pokazala učinkovitom za izolaciju spojeva srednje molekulske mase i relativno male polarnosti (terpenskih spojeva, osobito mono- i seskviterpena). Na **Slici 8** prikazane su glavne grupe spojeva na koje je moguće primijeniti ovu tehnologiju ekstrakcije (Pavlić, 2017).



Slika 8 Glavne grupe spojeva za čiju je izolaciju moguće primijeniti SFE tehnologiju (Pavlić, 2017)

Pored toga, brojne prednosti ove ekstrakcijske metode u odnosu na klasične, te prikladnost za upotrebu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji doveli su do niza uspješnih istraživanja provedenih na različitim biljkama (Xu i sur., 2011; Filip, 2014).

Neke od prednosti SFE ekstrakcije:

- otapala korištena u superkritičnoj ekstrakciji jeftina su i sigurna za okoliš, troškovi odlaganja nisu veliki, a u industrijskim procesima moguće je i recikliranje otapala;
- moguće je provesti ekstrahiranje termolabilnih spojeva te se može primijeniti na separaciju slabo isparljivih i temperaturno osjetljivih spojeva;
- ekstrahiranje spojeva visokih temperatura ključanja na relativno niskim temperaturama;
- superkritični fluidi imaju sposobnost otapanja kao što je imaju i organska otapala, ali s boljom difuzijom, nižom viskoznosti i manjom površinskom napetosti fluida;
- razdvajanje ekstrakta od otapala lako je i brzo zbog mogućnosti reguliranja topljivosti spojeva promjenom tlaka ili temperature;
- podešavanjem optimalnih procesnih parametara moguće je ostvariti izolaciju točno određenih spojeva, te utjecati na povećanje prinosa ekstrakcije;
- dodavanjem kootapala (metanola, etanola, vode i dr.) u CO_2, moguće je poboljšati topljivost polarnih supstanci, čime se postiže veća selektivnost prilikom separacije;
- zeleni proces;
- ekstrakcija superkritičnim fluidima može se primijeniti na sustave različitog kapaciteta – od analitičkih (manje od grama do nekoliko grama uzorka), preparativnih (nekoliko stotina grama uzorka), poluindustrijskih postrojenja (kilogram uzorka) do velikih industrijskih postrojenja (tone sirovine) (Jokić, 2011; Norhuda i Jusoff, 2009; Sahena i sur., 2009; Cossuta i sur., 2008; Wang i Weller, 2006; King, 2002; Skala i sur., 2002).

Pored brojnih prednosti, SFE ima i određene nedostatke u usporedbi s drugim postupcima ekstrakcije, a to su:

- rad pri vrlo visokim tlakovima;
- velik utrošak energije za komprimiranje plinova;
- složena regeneracija korištenih otapala koja vodi do znatnih energetskih troškova;
- veliki investicijski troškovi za procesnu opremu (Jokić, 2011).

2.4.2.2. Superkritični fluidi i njihove osobine

Izbor odgovarajućeg otapala ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama fluida koji se može koristiti za ekstrakciju u superkritičnom stanju. Bilo koji fluid može se koristiti kao superkritično

otapalo, međutim tehnička održivost (kritična svojstva), toksičnost, troškovi i sposobnost topljivosti određuju koje je otapalo najbolje za određenu primjenu. CO_2 je najpoželjniji fluid za superkritičnu ekstrakciju prirodnih spojeva zbog brojnih prednosti: relativno je jeftin, lako dostupan, netoksičan, nezapaljiv, bez okusa i mirisa te siguran za okoliš. Nadalje, s tehničkoga stajališta posjeduje dobre osobine postizanja superkritičnog stanja pri temperaturi od 31,06 °C i tlaku od 7,38 MPa. Pored njega, koriste se i voda, freon, amonijak, eten, metan, etan, propan, propen, metilamin, itd., čija su fizikalno-kemijska svojstva prikazana u **Tablici 8** (Aladić, 2015).

Tablica 8 Fizikalno-kemijska svojstva pojedinih superkritičnih fluida (Aladić, 2015)

OTAPALO	T_c (K)	p_c (MPa)	ρ (g/cm^3)
Metan	191	4,06	0,162
Etilen	282	5,03	0,218
Dušikov oksid	310	7,34	0,445
Ugljikov dioksid	304	7,38	0,468
Dietil-eter	467	3,64	0,265
Heksan	507	3,05	0,230
Aceton	508	4,70	0,287
Metanol	513	8,09	0,272
Amonijak	405	11,3	0,225
Voda	647	22,0	0,322

2.4.2.3. Ekstrakcija s CO_2 u superkritičnom stanju ($ESCO_2$)

Prilikom izvođenja $ESCO_2$ moguće je promjenom tlaka i temperature po želji mijenjati selektivnost fluida. Tako je moguće dobiti ekstrakte poželjnoga sastava, ne mijenjajući pritom sastav otapala, već samo temperaturu i tlak (Politeo, 2003).

Snaga otapanja superkritičnoga CO_2 može se sažeti u nekoliko pravila:

- otapa nepolarne ili blago polarne spojeve (alkani, alkeni, terpeni);
- snaga otapanja za spojeve male molekularne mase je visoka i smanjuje se povećanjem molekularne mase;
- organski spojevi s kisikom s niskom ili srednjom molekularnom masom (ketoni, alkoholi, esteri) vrlo su topljivi;
- proteini, polisaharidi, šećeri i mineralne soli, voćne kiseline i glikozidi su netopljivi;
- superkritični CO_2 ima sposobnost odvajanja spojeva koji su manje isparljivi, imaju veću molekularnu masu i/ili su više polarni s porastom tlaka;
- pigmenti su slabo topljivi;
- voda ima slabu topljivost na temperaturama ispod 100 °C (Aladić, 2015; Brunner, 2005).

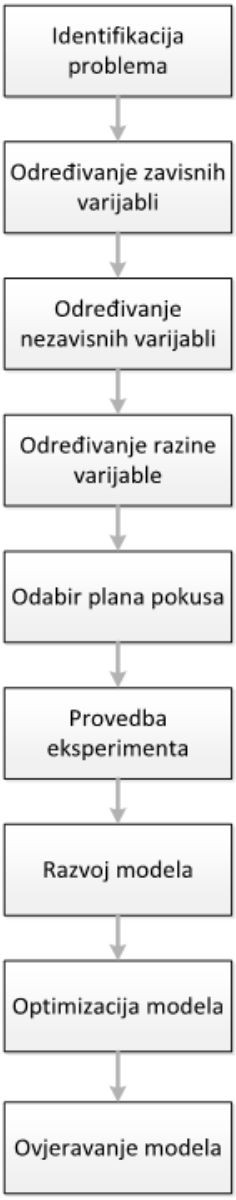
Prema dostupnim literaturnim podatcima, komponente eteričnih ulja dobivene $ESCO_2$ imaju drugačiji kemijski sastav u odnosu na sastav eteričnih ulja dobivenih klasičnim načinom destilacije. S obzirom na to da topljivost tvari u superkritičnom CO_2 pada s povećanjem broja polarnih skupina (npr. hidroksilna, karbonilna, amino ili nitro), zbog indeksa polarnosti CO_2 nije prikladan za ekstrakciju polarnih spojeva (npr. fenolnih spojeva) (Bubalo i sur., 2018). Unatoč tomu, $ESCO_2$ se smatra obećavajućom alternativom različitim ekstrakcijskim metodama izolacije bioaktivnih spojeva (Zeković i sur., 2014) te je njezina primjena upravo predmet interesa velikoga broja znanstvenika u svijetu.

Uspjeh klasičnih metoda ekstrakcije prvenstveno ovisi o iskustvu i sposobnostima izvođača, dok suvremene metode počivaju na superiornoj tehnologiji i skupocjenoj opremi (Jerković, 2008). U skladu s tim, a s ciljem smanjenja ukupnih troškova prilikom takvog ekstrakcijskog procesa, potrebno je provesti proces optimizacije korištenjem provjerenih optimizacijskih tehnika. Uporabom ovih tehnika omogućeno je prebacivanje laboratorijskih mjerenja u industrijsko mjerilo s ciljem postizanja većeg prinosa procesa (Aladić, 2015).

2.5. METODA ODZIVNIH POVRŠINA KAO ALAT ZA OPTIMIZACIJU

Optimizacija je neophodan korak u svakoj analitičkoj tehnici ili industrijskom procesu (Pavlić, 2017) te je pronalaženje uvjeta procesa s najpovoljnijim ishodom glavna svrha optimizacije (Aydar, 2019). U prošlosti se optimizacija tradicionalno provodila praćenjem utjecaja jednog parametra (varijable) na eksperimentalni odgovor, pri čemu se mijenjao samo jedan parametar, dok su drugi održavani konstantnim. Osnovni nedostatak ove vrste optimizacije, nazvane pojedinačna varijabla (engl. *One-variable-at-a-time*) bio je što ne uključuje interaktivnost među ispitivanim varijablama te u konačnici ne prikazuje kumulativni utjecaj na odziv. Pored toga, bilo je potrebno provesti veći broj eksperimenata što znatno poskupljuje istraživanje. Ovaj problem prevladan je optimizacijom analitičkih postupaka, tj. primjenom multivarijantnih statističkih tehnika (Bezerra i sur., 2008) te se problem brojnosti eksperimenata i pouzdanosti zaključaka danas rješava planiranjem eksperimenta.

Metoda odzivnih površina (engl. *Response surface methodology* – RSM) među najrelevantnijim je multivarijantnim statističkim tehnikama korištenim u analitičkoj optimizaciji. Ova metoda predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika utemeljenih na uklapanju polinomske jednadžbe u eksperimentalne podatke, a koji moraju opisati ponašanje skupa podataka s ciljem izrade statističkih predviđanja. Primjenom RSM-a moguće je definirati utjecaj nezavisnih varijabli na zavisne te istovremeno optimirati razine varijabli kako bi se postigla najbolja učinkovitost procesa (Baş i Boyaci, 2007). Glavni koraci za ispravnu provedbu ove metode prikazani su na **Slici 9**.



Slika 9 Shematski prikaz glavnih koraka za provedbu RSM-a (Aydar, 2019)

Dakle, početni korak prije primjene RSM-a predstavljaju preliminarna istraživanja kojima je potrebno dobiti pregled odnosa nezavisnih varijabli na zavisnu varijablu (odziv) preko odzivne funkcije., Ujedno je potrebno razlučiti na koji način članovi modela (nezavisne varijable) utječu na promatrani odziv (izmjerenu vrijednost u eksperimentu) (Aydar, 2019). Pored preliminarnih eksperimenata, u obzir treba uzeti i prethodne rezultate te iskustva primijenjena u sličnim optimizacijskim sustavima (Pavlić, 2017). Sljedeći korak je odabir plana pokusa koji će definirati eksperimente koje je potrebno provesti na istraživačkom području (Bezerra i sur., 2008).

Najčešći oblici plana pokusa su:

- faktorijalni plan pokusa (engl. *Full factorial design* − FFD) na tri razine;
- Box-Behnkenov plan pokusa (engl. *Box-Behnken design* − BBD);

- centralno kompozitni plan pokusa (engl. *Central composite rotable design* − CCRD);
- Doehlertov plan pokusa (engl. *Doehlert design* − DD) itd. (Baş i Boyaci, 2007).

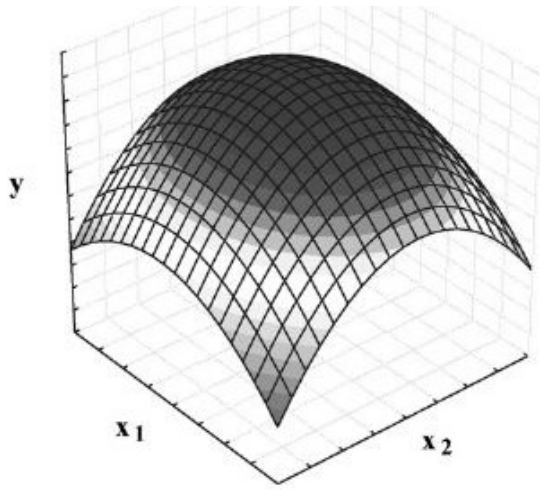
U industriji je vrlo često potrebno postaviti optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli za dobivanje maksimalnog, minimalnog ili ciljanog odziva određenog područja interesa (Aydar, 2019). Navedeni planovi pokusa razlikuju se s obzirom na broj potrebnih pokusa, odabir eksperimentalnih točaka te razinu ispitivanih varijabli. Stoga je ključan korak pri provedbi RSM-a upravo odabrati odgovarajući plan pokusa jer će taj odabir direktno utjecati na kvalitetu predviđenoga modela (Bezerra i sur., 2008).

Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta (matrica plana pokusa (**1**)) dobiva se kontinuirana površina koja spaja visine izmjerenih vrijednosti, a naziva se odzivna površina (Baş i Boyaci, 2007).

Matrični oblik modela:

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ . \\ . \\ . \\ y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & . & . & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & . & . & x_{2k} \\ . & . & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . & . \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & . & . & x_{nk} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ . \\ . \\ . \\ \beta_k \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ . \\ . \\ . \\ \varepsilon_n \end{bmatrix} \qquad (\mathbf{1})$$

Grafički prikaz odzivnih ploha u trodimenzionalnom (3D) obliku omogućava vizualizaciju i bolje razumijevanje utjecaja nezavisnih varijabli na izlazne veličine. Funkcija nezavisnih varijabli f(X_1, X_2) na izlaznu veličinu y grafički je prikazana 3D dijagramom na **Slici 10** (Montgomery, 2005).



Slika 10 Primjer prikaza odzivne plohe

Nakon provedenih eksperimenata i izmjerenih vrijednosti odziva, na red dolazi prilagodba rezultata odgovarajućim polinomnim modelima. Dizajn eksperimenta za modele prvoga reda koristi se samo u slučajevima kada eksperimentalni podatci ne tvore krivulje, odnosno kada se mogu aproksimirati linearnom funkcijom. Tada je dobivena aproksimacijska funkcija modela prvoga reda (**2**):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \cdots \beta_i x_i + \varepsilon \qquad (\mathbf{2})$$

Kod takvih modela na odzivnu funkciju utječu samo ispitivane nezavisne varijable bez njihove interakcije. Međutim, za aproksimaciju eksperimentalnih podataka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom koristi se polinomna jednadžba drugoga reda u sljedećem obliku (kvadratni polinom) (**3**):

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j X_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} X_j^2 + \sum \sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j \qquad (\mathbf{3})$$

gdje je:

Y – prinos procesa;

β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma;

β_j – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

β_{jj} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma;

β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma;

X_i i X_j – kodirane nezavisne varijable (tlak i temperatura) (Baş i Boyaci, 2007).

Koeficijenti odzivne funkcije (modela) određuju se metodom najmanjih kvadrata. Definiranjem koeficijenata odzivne funkcije izrađuje se matematički model koji može predvidjeti ponašanje ispitivanog odziva u okviru eksperimentalnoga područja. S ciljem provjere slaganja matematičkog modela i eksperimentalnih rezultata provode se analiza i test adekvatnosti odzivne funkcije primjenom analize varijance (ANOVA) ili studentovog t-testa. Provedbom ovoga posljednjeg koraka ističu se oni faktori ili njihove interakcije koji značajno utječu na promatrani proces (Ferreira i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovoga rada realiziran je na Katedri za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku i u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkoga fakulteta u Splitu.

3.1. ZADATAK

Zadatak ove doktorske disertacije bio je:

- prikupiti uzorke biljnoga materijala: cvijet smilja te plod konopljike s područja Hercegovine;
- pripremiti materijal za ekstrakciju – provesti usitnjavanje s ciljem povećanja površine uzorka (IKA A11 basic); klasiranje prosijavanjem na standardnoj seriji sita (Labortechnik GmbH, Ilmenau, Njemačka) te utvrđivanje raspodjele veličine čestica;
- odrediti udio vlage u suhom biljnom materijalu cvijeta smilja i ploda konopljike;
- izolirati eterično ulje iz cvijeta smilja i ploda konopljike postupkom hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru;
- provesti postupak $ESCO_2$ cvijeta smilja i ploda konopljike u laboratorijskom uređaju za superkritičnu ekstrakciju;
- ispitati utjecaj najznačajnijih procesnih parametara tijekom $ESCO_2$ na prinos ekstrakcije i odabranih isparljivih spojeva iz cvijeta i ploda konopljike;
- identificirati i kvantificirati isparljive spojeve iz eteričnog ulja cvijeta smilja i ploda konopljike dobivene postupkom hidrodestilacije i $ESCO_2$ primjenom metode plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS);
- identificirati i kvantificirati skopoletin (derivat kumarina) u CO_2 ekstraktima cvijeta smilja reverzno-faznom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (RP-HPLC);
- optimirati proces $ESCO_2$ odabranih biljnih vrsta primjenom metode odzivnih površina (RSM) u odnosu na prinos ekstrakcije i koncentraciju odabranih fitokemikalija korištenjem programa Design Expert®.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Cvijet smilja

Cvjetovi smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum*) korišteni u istraživanju ubrani su na plantaži smilja (veličine ~14 ha) tvrtke Roing d.o.o. Ljubuški (Hercegovina, BiH) (GPS koordinate: 43° 11' 54,3" N 17° 35' 49,5" E) (**Slika 11**) tijekom perioda cvjetanja u srpnju 2015. godine te su prirodno osušeni na zraku bez kontakta sa sunčevom svjetlosti.

Slika 11 Cvijet smilja (plantaža tvrtke Roing) (Izvor: autor)

2.2.2. Plod konopljike

Plodovi konopljike (*Vitex agnus castus* L.) (**Slika 12**) sakupljani su u dolini rijeke Neretve, u okolici Mostara (Hercegovina, BiH) (GPS koordinate: 43° 14' 37,2" N 17° 50' 29,3" E) početkom listopada 2015. godine i potom osušeni na zraku, zaštićeni od direktne sunčeve svjetlosti.

Slika 12 Plod konopljike (Izvor: autor)

3.2.3. Kemikalije i standardi

- Za $ESCO_2$ korišten je komercijalni CO_2, čistoće 99,97 % proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).
- Za pripremu uzoraka za GC-MS analizu eteričnog ulja i CO_2 ekstrakata smilja korišten je dietil-eter (J. T. Baker, Milano, Italija), dok je za analizu konopljike korišten *n*-heksan (J. T. Baker, Milano, Italija).
- Za pripremu uzoraka za RP-HPLC analizu CO_2 ekstrakta cvijeta smilja korišten je etanol (HPLC čistoće, BDH Prolabo, Velika Britanija). Kao moblina faza korišteni su metanol (J. T. Baker, Milano, Italija) i destilirana voda.
- Za određivanje skopoletina korišten je skopoletin standard kupljen od tvrtke *Dr. Ehrenstorfer GmbH* (Augsburg, Njemačka) sa standardnom čistoćom od 99,5 % (prema podatcima dobavljača).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje udjela vlage u uzorku cvijeta smilja i ploda konopljike

Udio vlage u uzorku cvijeta smilja i ploda konopljike određen je standardnom metodom AOAC 925.40 (2000). U osušenu, izvaganu posudicu odvagalo se 5 g usitnjenog biljnog uzorka, te se uzorak u posudici s podignutim poklopcem sušio u sušioniku na temperaturi od 103 °C do konstantne mase, odnosno dok razlika između dva uzastopna mjerenja nije bila najviše 0,005 g. Posudica s uzorkom je zatim ohlađena u eksikatoru do sobne temperature. Udio vode u cvijetu smilja i plodu konopljike izračunat je prema sljedećem izrazu (**4**):

$$w_{s.t.} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \quad (\mathbf{4})$$

gdje je:

$w_{s.t.}$ – udio suhe tvari (%);

m_0 – masa prazne posude (g);

m_1 – masa posude s uzorkom prije sušenja (g);

m_2 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

Promjena udjela vlage u materijalu prije postupka $ESCO_2$ može značajno utjecati na prinos i kvalitetu ekstrakta te se spomenuto ispitivanje provelo i u ovom radu. Postupak povećanja udjela vlage proveo se tako što su plodovi konopljike navlaženi destiliranom vodom, nakon

čega je izmjeren udio vlage. Plodovi su zatim usitnjeni u mlinu za usitnjavanje 60 s te odmah podvrgnuti procesu $ESCO_2$.

3.3.2. Priprema uzorka za ekstrakciju

Prije provođenja eksperimenta ekstrakcije, uzorci cvijeta smilja i ploda konopljike usitnjeni su na laboratorijskom mlinu (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Njemačka). Nakon usitnjavanja uzoraka provedena je granulometrijska analiza na standardnoj seriji sita (Labortechnik GmbH, Ilmenau, Njemačka) te je određen srednji promjer čestica uzorka izračunat prema jednadžbi (**5**):

$$\frac{100}{d} = \sum\left(\frac{m_i}{d_i}\right) \qquad (5)$$

gdje su:

d – srednji promjer čestica;

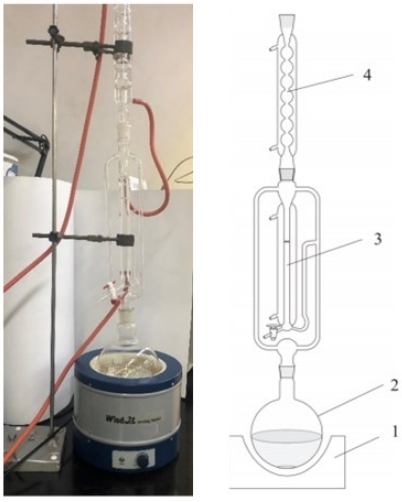
m_i – maseni udio i-te frakcije (%);

d_i – srednji promjer i-te frakcije (mm).

Na seriju od devet standardnih sita preneseno je 100 g usitnjenog biljnog materijala. Sita su posložena tako da gornje sito ima najveće otvore, dok je zadnje sito tzv. „*slijepo sito*“. Prosijavanje se provodilo 20 minuta te se potom ponovno vagalo svako pojedino sito. Postupak je proveden u tri ponavljanja.

3.3.3. Izolacija eteričnog ulja cvijeta smilja i ploda konopljike hidrodestilacijom

Za laboratorijsko dobivanje eteričnog ulja cvijeta smilja i ploda konopljike korištena je aparatura po Clevengeru (Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Njemačka) (**Slika 13**).



Slika 13 Aparatura za hidrodestilaciju po Clevengeru: 1) grijaće tijelo (kalota); 2) tikvica s okruglim dnom; 3) aparat po Clevengeru; 4) hladilo po Allihnu

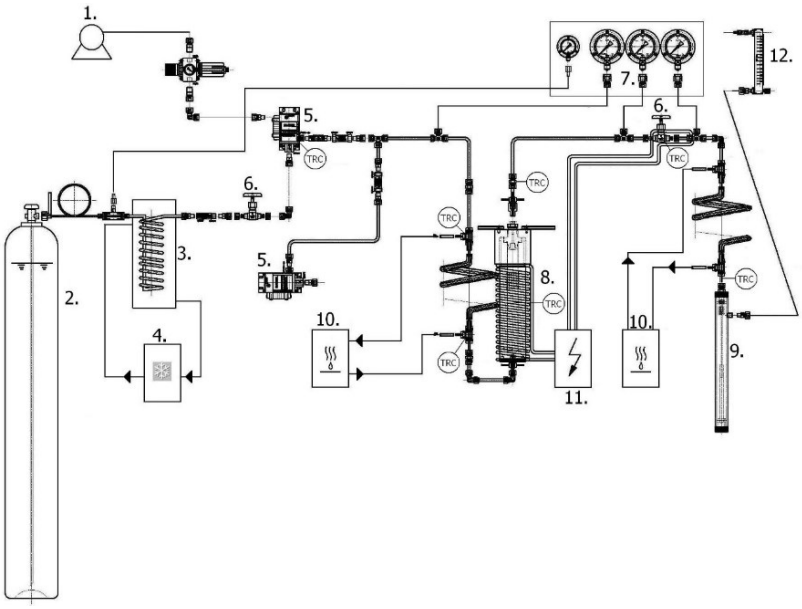
U tikvicu s okruglim dnom dodana je usitnjena masa suhoga materijala i destilirana voda prema količinama navedenim u **Tablici 9**. Tijekom procesa destilacije eterično je ulje skupljano u gornjem dijelu cijevi te je nakon završetka hidrodestilacije prebačeno u menzuru. Nakon očitavanja volumena, izdvojeno eterično ulje osušeno je s bezvodnim $MgSO_4$ i čuvano pri temperaturi 4 – 6 °C nekoliko dana. Nakon sušenja, uzorak je analiziran pomoću GC-MS-a.

Tablica 9 Parametri iskazani u postupku hidrodestilacije biljnoga materijala u aparaturi po Clevengeru

	Masa biljnog materijala (g)	**Vrijeme trajanja postupka (h)**
Cvijet smilja	50	2
Plod konopljike	100	4

3.3.4. ESCO_2 cvijeta smilja i ploda konopljike

Ekstrakcija željenih bioaktivnih spojeva iz cvijeta smilja i ploda konopljike provela se na uređaju za ekstrakciju superkritičnim fluidima, čija je shema dana na **Slici 14**.



Slika 14 Shematski prikaz uređaja za superkritičnu ekstrakciju (Aladić, 2015)

1. Kompresor; 2. CO_2 spremnik; 3. Izmjenjivač topline od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sistem grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka

Rad osnovnih sastavnica uređaja za superkritičnu ekstrakciju od vitalnog je značaja za ostvarenje unaprijed definiranih procesnih parametara. Rashladna kupelj pothlađuje CO_2 na -5 °C, te ga tako rashlađenog uvodi u pumpu. Visokotlačna pumpa komprimira CO_2 na željeni

tlak ekstrakcije, dovodeći ga u ekstraktor. U ekstraktoru se nalazi biljni materijal. Tako stlačeni CO_2 zagrijava se preko istostrujnog izmjenjivača topline na temperaturu ekstrakcije i uvodi u ekstraktor gdje prelazi preko uzorka obavljajući ekstrakciju topljivih spojeva. Ekstraktor se sastoji od tri dijela, pri čemu se izdvaja čep u koji je ugrađen filtracijski element bez kojega proces ekstrakcije ne bi bio izvodljiv. Grijan centraliziranim sustavom grijača ostvaruje željenu temperaturu ekstrakcije. Superkritični CO_2 zajedno s ekstraktom odlazi do redukcijskoga ventila kojemu se tlak snižava na tlak separacije. Ekstrakt se skuplja na dnu separatora, a izdvojeni superkritični CO_2 dalje odvodi do kondenzatora u kojemu se vraća iz plinovitog u tekuće stanje (Mujić i Jokić, 2018; Aladić, 2015).

Tablica 10 Konstantni parametri tijekom $ESCO_2$

	Masa uzorka (g)	**Trajanje ekstrakcije (h)**	**Brzina protoka fluida (kg/h)**
Cvijet smilja	40	1,5	1,94
Plod konopljike	100	1,5	1,94

Masa osušenoga materijala cvijeta smilja i ploda konopljike tijekom provedbe svih eksperimenata $ESCO_2$ bila je konstantna (**Tablica 10**). Odabrano je vrijeme ekstrakcije od 90 min jer se upravo to vrijeme u preliminarnim istraživanjima pokazalo kao optimalno vrijeme u kojemu se uspije dobiti potpuni prinos ekstrakcije. Odvajanje CO_2 i ekstrakta provelo se u separatoru pri tlaku od 1,5 MPa i temperaturi od 25 °C. Dobiveni ekstrakti čuvani su na 4 – 6 °C do analize. Najznačajniji procesni parametar tijekom $ESCO_2$ zasigurno je tlak, stoga se ispitivao njegov utjecaj na iskorištenje i sastav dobivenih ekstrakata na primjeru cvijeta smilja, a zatim i tlak, temperatura i njihova interakcija na primjeru ploda konopljike.

3.3.5. Procesni uvjeti za $ESCO_2$ cvijeta smilja prema CCRD-u

Postupak dobivanja CO_2 ekstrakata $ESCO_2$ iz cvijeta smilja proveo se prema unaprijed isplaniranom CCRD-u (detaljno opisanom u radu autora Ferreira i sur., 2019; Bezerra i sur., 2008 i Baş i Boyaci, 2007) prikazanom u **Tablici 12**, gdje su se tijekom izvođenja pokusa mijenjali odabrani procesni parametri (tlak i temperatura), pri čemu su masa materijala u ekstraktoru, vrijeme ekstrakcije i maseni protok CO_2 održavani konstantnim (prikazani u **Tablici 10**). Prema CCRD-u, kao odzivna se varijabla ispitivao prinos ekstrakcije i udio skopoletina u dobivenim ekstraktima. Tlak i temperatura varirali su u ispitivanju prinosa ekstrakcije, dok se utjecaj na kemijski profil isparljivih spojeva cvijeta smilja ispitao samo pri tlakovima 7,9 MPa, 15,0 MPa i 22,1 MPa. Pri tomu je temperatura od 50 °C bila konstantna, kao i ostali procesni uvjeti (veličina čestica, protok fluida i vrijeme ekstrakcije).

Tablica 11 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu procesa $ESCO_2$ cvijeta smilja

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina				
		-1,41	-1	0	+1	1,41
Tlak (MPa)	X_1	7,9	10,0	15,0	20,0	22,1
Temperatura (°C)	X_2	35,8	40,0	50,0	60,0	64,1

Tablica 12 Eksperimentalni uvjeti $ESCO_2$ cvijeta smilja prema CCRD-u

Broj eksperimenta	Tlak (MPa)	Temperatura (°C)
1	15,0	50,0
2	20,0	60,0
3	20,0	40,0
4	7,9	50,0
5	15,0	50,0
6	15,0	64,1
7	15,0	50,0
8	15,0	35,8
9	15,0	50,0
10	15,0	50,0
11	10,0	60,0
12	22,1	50,0
13	10,0	40,0

3.3.6. Procesni uvjeti za $ESCO_2$ ploda konopljike prema CCRD-u

Postupak dobivanja ekstrakata $ESCO_2$ iz ploda konopljike proveo se prema unaprijed isplaniranom CCRD-u prikazanom u **Tablici 14**, gdje su se tijekom izvođenja pokusa mijenjali odabrani procesni parametri (tlak i temperatura), pri čemu su masa materijala u ekstraktoru, vrijeme ekstrakcije i maseni protok CO_2 održavani konstantnim.

Tablica 13 Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu u procesu $ESCO_2$ ploda konopljike

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina				
		-1,41	-1	0	+1	1,41
Tlak (MPa)	X_1	8,4	12,5	22,5	32,5	36,6
Temperatura (°C)	X_2	36,0	40,0	50,0	60,0	64,0

Tablica 14 Eksperimentalni uvjeti $ESCO_2$ ploda konopljike prema CCRD-u

Broj eksperimenta	Tlak (MPa)	Temperatura (°C)
1	12,5	40,0
2	36,6	50,0
3	22,5	35,8
4	32,5	60,0
5	8,4	50,0
6	22,5	50,0
7	12,5	60,0
8	22,5	50,0
9	22,5	50,0
10	22,5	64,1
11	32,5	40,0
12	22,5	50,0
13	22,5	50,0

3.3.7. Identifikacija kemijskoga profila dobivenih hidrodestilata i CO_2 ekstrakata cvijeta smilja i ploda konopljike primjenom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Eterična ulja cvijeta smilja i ploda konopljike dobivena postupkom hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru te ekstrakti dobiveni $ESCO_2$ ispitani su primjenom GC-MS analize. Za analizu izoliranih isparljivih spojeva korišten je plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7890A u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5975C, spojenim na računalo (**Slika 15**).

Slika 15 Vezani sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Prilikom pripreme uzoraka, eterična ulja i CO_2 ekstrakti smilja razrijeđeni su dietil-eterom, a ekstrakti ploda konopljike *n*-heksanom te potom injektirani u kolonu. Separacija spojeva provedena je na kapilarnoj koloni H5-5MS (dužine 30 m, unutarnjega promjera 0,25 mm, debljine sloja stacionarne faze 0,25 µm, J&W, SAD).

Korišteni su sljedeći uvjeti rada plinskoga kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim uz porast temperature od 200 °C, brzinom 3 °C / min izotermno 18 min;
- energija ionizacije: 70 eV;
- temperatura ionskog izvora: 230 °C;
- interval snimanja masa: 30 – 300 masenih jedinica kod eteričnog ulja i ekstrakata smilja i 45 – 450 masenih jedinica kod eteričnog ulja i ekstrakata konopljike.

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podatci:

- kromatogram ukupne ionske struje;
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektribivaju najsličniji spektru nepoznatoga spoja pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcima;
- vrijeme zadržavanja pojedinoga spoja;
- relativni udio pojedinoga spoja izražen u postotcima.

Postotni sastav isparljivih spojeva uzoraka izračunat je iz površine pikova kromatograma primjenom metode normalizacije (bez korekcijskih faktora), a postotci identificiranih komponenti izraženi su kao srednja vrijednost rezultata dvije GC-MS analize svih ekstrakata.

3.3.8. Ekstrakcija i kvantifikacija skopoletina u CO_2 ekstraktima cvijeta smilja reverzno-faznom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (RP-HPLC) uz UV detekciju

Reverzno-fazna visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (RP-HPLC) uz UV detekciju korištena je za određivanje skopoletina u dobivenim ekstraktima cvijeta smilja *H. italicum*. HPLC analize provedene su na Shimadzu sustavu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) koji se sastojao od pumpe (LC-20AD Prominence), jedinice za uklanjanje zraka (DGU-20A5R), uređaja za automatsko injektiranje (SIL-10AF) i detektora s nizom fotodioda (SPD-M20A Prominence UV / VIS) (**Slika 16**). Sustav je bio spojen na računalo opremljeno softverom Lab Solution Lite Version 5.52. Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem kolone COSMOSIL 5C18-MA-II (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan), duljine 150 mm, s unutarnjim promjerom od 4,6 mm.

Slika 16 Shimadzu sustav za RP-HPLC

Gradijentno eluiranje dalo je najbolje rezultate u razdvajanju spojeva koristeći metanol i destiliranu vodu. Korišteni gradijenti prikazani su u **Tablici 15**.

Tablica 15 Korišteni gradijenti za eluiranje

Vrijeme (min)	Metanol (%)	Destilirana voda (%)
0,0	40,0	60,0
15,0	40,0	60,0
15,0	40,0	60,0
20,0	80,0	20,0
20,0	80,0	20,0
40,0	80,0	20,0
40,0	40,0	60,0
49,9	40,0	60,0
50,0	kraj	Kraj

Brzina protoka iznosila je 1,0 mL/min, volumen injektiranja 10 µL, UV valna duljina 254 nm, a HPLC analiza provedena je pri temperaturi od 30 °C.

Standardna kalibracijska krivulja za skopoletin dobivena je pripremom šest otopina u koncentracijskom rasponu od 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 i 20,0 µg/L s odgovarajućim razrjeđivanjem matične otopine, a vrijeme zadržavanja analiziranoga spoja bilo je 7,29 minuta.

Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s R^2 = 0,9996. Dodatno, granica detekcije skopoletina (LOD) bila je 0,07 mg/L, a granica kvantifikacije (LOQ) iznosila je 0,2 mg/L. Uzorci ekstrakata razrijeđeni su do koncentracije 5 mg/mL u apsolutnom etilnom alkoholu, profiltrirani kroz 0,45 µm PTFE (politetrafluoroetilen) filtere te podvrgnuti HPLC analizi. Prinos skopoletina

(izražen u miligramima skopoletina na 100 g cvjetova *H. Italicum)* izračunat je iz koncentracije skopoletina u biljnim ekstraktima (µg/mL) određenim RP-HPLC analizom.

3.3.9. Statistička obrada podataka

Za analizu utjecaja parametara $ESCO_2$ na ispitivane odzive te optimizaciju procesa korištena je metoda odzivne površine (RSM), pri čemu je za ispitivanje utjecaja dviju nezavisnih varijabli tijekom $ESCO_2$ (tlaka i temperature) na eksperimentalni odziv korišten CCRD.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametra na promatrane procese $ESCO_2$ cvijeta smilja i ploda konopljike, te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametra provedena je primjenom softverskoga paketa Design-Expert®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA).

ANOVA je korištena za ocjenu adekvatnosti modela. Test statističkih razlika temeljio se na ukupnim kriterijima pogreške s razinom pouzdanosti od 95,0 %. Adekvatnost dobivenih modela određena je koeficijentom determinacije (R^2) te *p*-vrijednostima za model i nedostatkom modela (engl. *Lack of fit*). Na osnovi dobivenoga matematičkog modela (polinoma) konstruirane su odzivne površine koje omogućuju vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane procese.

Kao završni korak u metodi odzivnih površina provedeno je optimiranje promatranoga procesa (Montgomery, 2005). Za optimiranje procesa primijenjena je metoda temeljena na konceptu željene funkcije (engl. *Desirability function* − D). Optimiranje se provelo tako što je praćeni odziv preveden u individualnu željenu funkciju čije se vrijednosti kreću 0 – 1, pri čemu 0 predstavlja najlošiju vrijednost individualne željene funkcije, a 1 najbolju vrijednost za promatrani odziv. Ukupna željena funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija (Aladić, 2015).

4. REZULTATI

Prikaz rezultata rada podijeljen je u dvije cjeline:

- Rezultati istraživanja provedenih na cvijetu smilja;
- Rezultati istraživanja provedenih na plodu konopljike.

4.1. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA CVIJETU SMILJA

4.1.1. Određivanje veličine čestica

Tablica 16 Prosječna veličina čestica u usitnjenim uzorcima cvijeta smilja

	Veličina otvora sita (mm)	**1. uzorak (g)**	**2. uzorak (g)**	**3. uzorak (g)**
0	3,15	2,2	1,2	2,1
1	1,40	11,7	36,9	36,9
2	0,63	2,8	1,0	2,0
3	0,50	1,8	0,4	0,4
4	0,32	6,9	10,1	9,2
5	0,20	2,7	0,8	0,7
6	0,10	1,8	1,8	1,7
7	0,009	1,3	0,3	0,1
8	0,005	0,4	0,2	0,1
9	"*slijepo sito*"	0,3	0,1	0,1

Srednja veličina čestica (tri ponavljanja) iznosila je 0,354 mm +/- 0,041 (izračunata prema jednadžbi **5**).

4.1.2. Određivanje udjela vlage u cvijetu smilja

Prosječni udio vlage u cvijetu smilja izračunat prema jednadžbi (**4**) iznosio je 2,3 %.

4.1.3. Prinos eteričnog ulja cvijeta smilja dobivenog hidrodestilacijom

Provedenim postupkom hidrodestilacije po Clevengeru dobiveni prinos eteričnog ulja iznosio je 0,3 % (v/v).

4.1.4. Kemijski profil eteričnog ulja cvijeta smilja dobivenog hidrodestilacijom

Tablica 17 Kemijski profil eteričnog ulja cvijeta smilja dobivenog hidrodestilacijom po Clevengeru određen pomoću GC-MS analize

Br.	Spoj	RI	%
1.	4-metilheksan-3-on	< 900	0,1
2.	nonan	900	0,1
3.	*α*-pinen	940	13,7
4.	*α*-fenhen	953	0,5
5.	*β*-pinen	982	0,6
6.	*α*-terpinen	1022	0,6
7.	limonen	1034	3,1
8.	isobutil-2-metilbut-2-enoat (isobutil-angelat)**	1055	0,3
9.	*γ*-terpinen	1064	0,6
10.	*α*-terpinolen	1092	0,2
11.	linalool	1105	0,7
12.	isopropil-2-metilbut-2-enoat**	1158	0,8
13.	terpinen-4-ol	1184	0,4
14.	*α*-terpineol	1197	0,2
15.	dekanal	1209	0,1
16.	nerol	1241	0,5
17.	linalil-acetat	1262	0,1
18.	(*Z*)-heks-3-enil-tiglat	1282	0,1
19.	heksil-3-metilbut-2-enoat (heksil-angelat)**	1289	0,4
20.	undekan-2-on	1297	0,1
21.	neril-acetat	1369	5,4
22.	*α*-ilangen	1375	0,2
23.	*α*-kopaen	1380	2,9
24.	italicen	1407	4,5
25.	*cis*-*α*-bergamoten	1419	1,2
26.	*trans*-kariofilen	1424	4,7
27.	*trans*-*α*-bergamoten	1440	1,1
28.	geranil-propionat	1479	1,9
29.	*γ*-selinen	1479	2,4
30.	*γ*-kurkumen	1485	23,2
31.	*β*-selinen	1492	9,9
32.	*α*-selinen	1499	6,7
33.	*δ*-cadinen	1528	1,7
34.	nerolidol	1570	0,3
35.	guaiol	1603	0,8
36.	*α*-gurjunen	1640	0,7
37.	*α*-kadinol	1650	0,2
38.	7-*epi*-amiteol	1665	1,3
39.	*α*-bisabolol	1691	0,4
40.	heksahidrofarnezil-aceton	1849	0,1
	ukupno identificirano		92,8 %

RI − indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C_9 − C_{25}); % − postotci površine kromatograma.

4.1.5. Utjecaj tlaka i temperature $ESCO_2$ cvijeta smilja na prinos ekstrakcije i udio skopoletina

Prinos skopoletina (izražen kao mg skopoletina/100 g cvijeta *H. italicum*) izračunat je iz koncentracije skopoletina u biljnim ekstraktima (µg/mL) utvrđene RP-HPLC analizom.

Tablica 18 Rezultati utjecaja tlaka i temperature na prinos $ESCO_2$ i udio skopoletina u ekstraktima cvijeta smilja (prema CCRD-u)

	Tlak (MPa)	Temperatura (°C)	CO_2 gustoća (kg/m^3)	Prinos ekstrakcije (%)	Prinos skopoletina (mg/100g)
1	15,0	50,0	659	2,9	0,6
2	20,0	60,0	696	4,2	0,7
3	20,0	40,0	831	2,7	1,9
4	7,9	50,0	220	0,6	0,3
5	15,0	50,0	659	2,9	0,9
6	15,0	64,1	527	0,8	0,0
7	15,0	50,0	659	3,5	0,6
8	15,0	35,8	784	2,9	0,2
9	15,0	50,0	659	3,2	0,8
10	15,0	50,0	659	2,3	0,9
11	10,0	60,0	294	1,7	0,6
12	22,1	50,0	794	4,8	1,5
13	10,0	40,0	568	2,3	0,2

4.1.6. Kemijski profili isparljivih spojeva CO_2 ekstrakata cvijeta smilja

Tablica 19 Kemijski profil isparljivih spojeva u CO_2 ekstraktima cvijeta smilja (dobivenih primjenom različitih tlakova $ESCO_2$)

Br.	Spoj	RI	7,9 MPa (%)	15,0 MPa (%)	22,1 MPa (%)
1.	2-metil-butananska kiselina	< 900	-	0,1	-
2.	nonan	< 900	-	0,1	-
3.	*α*-oinen	940	t	0,1	-
4.	heksanska kiselina	990	-	0,1	-
5.	*α*-terpinen	1022	t	t	-
6.	*p*-cimen	1030	-	0,1	-
7.	*β*-felandren	1035	-	-	-
8.	limonen	1034	-	t	t
9.	1,8-cineol	1036	-	t	-
10.	*γ*-terpinen	1064	-	0,3	-
11.	*α*-terpinolen	1092	-	0,1	-
12.	linalool	1105	t	0,3	t
13.	nonanal	1112	-	t	-
14.	terpinen-4-ol	1184	-	0,1	0,2
15.	*α*-terpineol	1197	0,1	0,1	0,2
16.	dekanal	1209	-	0,1	-
17.	nerol	1241	-	0,1	0,2

18.	neril-acetat	1369	0,1	0,4	0,2
19.	*α*-ilangen	1375	-	0,1	0,2
20.	*α*-kopaen	1380	0,1	0,3	0,2
21.	italicen	1407	0,1	0,3	0,2
22.	*cis*-*α*-bergamoten	1419		0,1	
23.	*trans*-kariofilen	1424	0,3	0,4	0,7
24.	aromadendren	1443	-	-	-
25.	*α*-humulen	1457	0,2	0,1	0,1
26.	aloaromadendren	1464	-	-	-
27.	*γ*-kurkumen	1485	1,3	-	-
28.	*Ar*-kurkumen	1487	1,6	3,3	2,9
29.	*β*-selinen	1492	1,3	-	-
30.	*α*-selinen	1499	0,5	0,7	0,6
31.	4-metil-2,6-bis(1,1-dimetiletil)fenol	1515	0,2	-	0,3
32.	*δ*-kadinen	1528	0,2	0,3	0,1
33.	*α*-kalakoren	1548	0,2	0,1	-
34.	spatulenol	1584	-	-	-
35.	dodekanska kiselina	1587	-	-	-
36.	2-etil-5-hidroksi-3,6-dimetilpiran-4-on*	1613	-	0,9	0,8
37.	7-*epi*-amiteol*	1665	0,5	0,4	0,6
38.	*α*-bisabolol	1692	-	-	-
39.	tretradekanska kiselina	1775	-	-	0,7
40.	eikosan	2000	-	7,4	-
41.	1-[2-(3-hidroksiprop-1-en-2-il) -2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il] etanon* (12-hidroksitremeton; bitalin A)	2043	12,9	6,1	23,0
42.	heneikosan	2100	-	-	-
43.	1-[2-(3-acetilprop-1-en-2-il) -2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon* (12-acetoksitremeton)	2114	12,7	3,7	12,1
44.	1-[2-(2-metil-2,3-dihidroksipropil) -2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon*	2121	17,2	19,7	20,4
45.	1-[2-(3-hidroksi-2-(1-hidroksiprop-1-en-2-il) -2,3-dihidro-1-benzofuran- 5 il]etanon* (gnafaliol)	2158	2,4	2,4	2,9
46.	dokosan	2200	3,8	4,5	10,1
47.	isobutil-bitalin A*	2283	6,5	4,1	4,8
48.	trikosan	2300	-	0,4	5,6
49.	1-[2-(acetilprop-1-en-2-il) -3-hidroksi-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon*	2309	10,3	6,7	7,1
50.	di-izooktil-ftalat	> 2300	-	1,4	6,3
51.	skvalen	> 2300	35,6	-	-
	ukupno identificirano:		91,8 %	95,1 %	87,8 %

− točan izomer nije identificiran; RI − indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C_9 − C_{25}); % − postotci površine kromatograma; t − spoj prisutan u tragovima. $ESCO_2$ provedena pri konstantnoj temperaturi (50 °C), protoku CO_2 (1,94 kg/h), vremenu ekstrakcije (90 min) i veličini čestice 0,354 mm.

4.1.7. Statistička analiza parametara $ESCO_2$ cvijeta smilja

Tablica 20 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih prinosa ekstrakcije cvijeta smilja dobivenog $ESCO_2$

Izvor varijabilnosti	**SS**	**df**	**MS**	**F-vrijednost**	***p*-vrijednost***
Model	12,81	5	2,56	4,35	0,040
X_1	9,97	1	9,97	16,95	0,004
X_2	0,56	1	0,56	0,95	0,362
X_1^2	7,646 x10^{-3}	1	7,646 x10^{-3}	0,01	0,912
X_2^2	1,36	1	1,36	2,31	0,172
X_1 X_2	0,91	1	0,91	1,55	0,253
Ostatak	4,12	7	0,59		
Nedostatak modela	3,36	3	1,12	5,94	0,059
Pogreška	0,76	4	0,19		
Ukupno	16,93	12			
R^2	0,856				

X_1 − tlak ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; *SS − suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS − varijanca. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

S ciljem određivanja regresijskih koeficijenata u jednadžbi (**3**) primijenjena je metoda najmanjih kvadrata. Polinom koji opisuje ponašanje prinosa ekstrakcije u ispitivanom eksperimentalnom području (**Tablica 20**) dan je jednadžbom (**6**):

$$y_1 = 2,99 + 1,12X_1 - 0,26X_2 - 0,33X_1^2 - 0,44X_2^2 + 0,48X_1X_2 \quad (\mathbf{6})$$

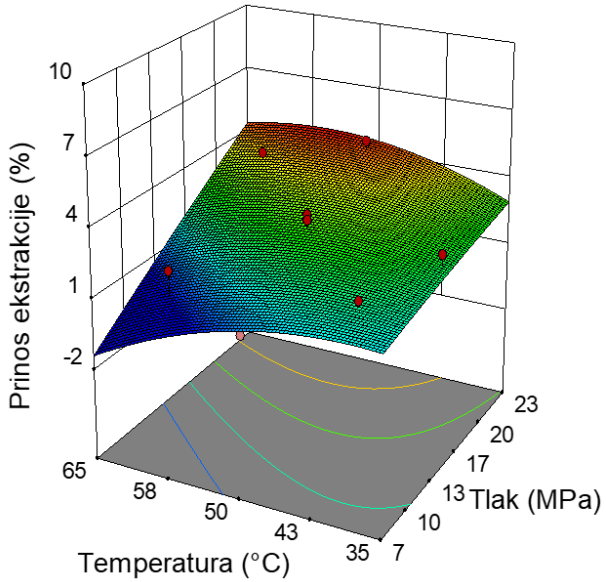
gdje su kodirane vrijednosti:

y_1 − prinos ekstrakcije;

X_1 − tlak ekstrakcije;

X_2 − temperatura ekstrakcije.

Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim eksperimentalnim dizajnom dobivena je kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti. Prinos ekstrakcije *H. italicum* vizualno je prikazan na **Slici 17** kao funkcija tlaka i temperature.



Slika 17 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine prinosa cvijeta smilja tijekom $ESCO_2$ u ovisnosti o tlaku i temperaturi

Tablica 21 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti udjela skopoletina cvijeta smilja dobivenog $ESCO_2$

Izvor Varijabilnosti	**SS**	**df**	**MS**	**F-vrijednost**	***p*-vrijednost***
Model	3,09	5	0,62	9,41	0,005
X_1	1,64	1	1,64	24,97	0,002
X_2	0,10	1	0,10	1,57	0,250
X_1^2	0,11	1	0,11	10,83	0,244
X_2^2	0,46	1	0,46	1,62	0,033
X_1X_2	0,71	1	0,71	7,02	0,013
Ostatak	0,46	7	0,06		
Nedostatak modela	0,32	3	0,11	3,15	0,148
Pogreška	0,14	4	0,034		
Ukupno	3,55	12			
R^2	0,8705				

*X_1 − tlak ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; *SS − suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS − varijanca; *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0{,}05$.

Polinom koji opisuje ponašanje prinosa ekstrakcije u ispitivanom eksperimentalnom području (**Tablica 21**) dan je jednadžbom (**7**):

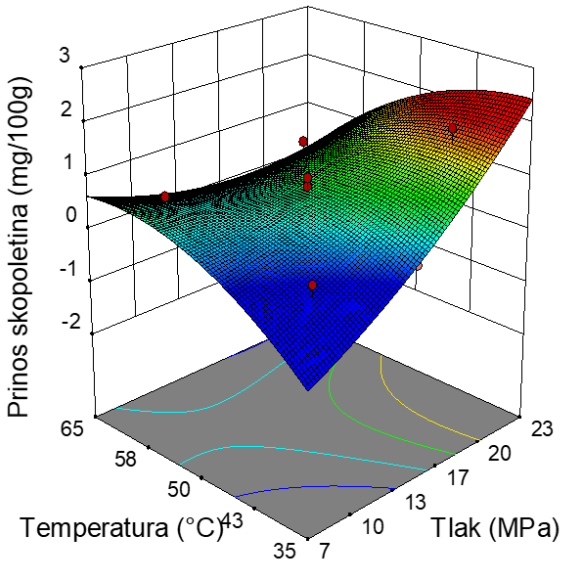
$$y_1 = 0{,}79 + 0{,}45X_1 - 0{,}11X_1^2 + 0{,}12X_1^2 - 0{,}26X_2^2 - 0{,}42X_1X_2 \qquad (7)$$

gdje su kodirane vrijednosti:

y_1 − prinos skopoletina;

X_1 − tlak ekstrakcije;

X_2 − temperatura ekstrakcije.



Slika 18 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine prinosa skopoletina u ovisnosti o temperaturi i tlaku

4.1.8. Optimalni procesni uvjeti $ESCO_2$ cvijeta smilja

Tablica 22 Stvarne i predviđene vrijednosti za ispitivane odzive pri optimalnim uvjetima $ESCO_2$ cvijeta smilja

Tlak	20 MPa	
Temperatura	45,3 °C	
	Prinos ekstrakcije	**Skopoletin**
Stvarne vrijednosti	3,7	1,5
Predviđene vrijednosti	3,8	1,5

4.2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA PLODU KONOPLJIKE

4.2.1. Određivanje veličine čestica

Prosječna veličina čestice usitnjenoga ploda konopljike iznosila je 0,356 mm +/- 0,068, izračunata prema jednadžbi (**5**).

Tablica 23 Prosječna veličina čestica u usitnjenim uzorcima ploda konopljike

Broj sita	Veličina otvora sita (mm)	1. uzorak (g)	2. uzorak (g)	3. uzorak (g)
0	3,15	0	0	0
1	1,40	1,82	1,85	1,87
2	0,63	37,47	37,52	37,45
3	0,50	12,47	12,21	13,80
4	0,32	20,31	20,21	20,08
5	0,20	12,60	12,80	13,10
6	0,10	13,31	13,69	13,21
7	0,009	6,97	7,11	6,31
8	0,005	4,39	5,93	4,37
9	"*slijepo sito*"	3,21	3,39	3,59

4.2.2. Određivanje udjela vlage u plodu konopljike

Početni udio vlage u plodu konopljike izračunat prema jednadžbi **4** iznosio je 11,2 %. U drugom dijelu istraživanja koji se odnosio na ispitivanje utjecaja vlage na kemijski sastav ekstrakta dobivenih $ESCO_2$ koristili su se uzorci navlaženi destiliranom vodom, čiji je udio vlage u plodovima iznosio 14,9 %, te osušeni uzorci s udjelom vlage 1,7 %.

4.2.3. Prinos eteričnog ulja ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom

Provedenim postupkom hidrodestilacije po Clevengeru dobiveni prinos eteričnog ulja iznosio je 0,4 % (v/v).

4.2.4. Kemijski profil eteričnog ulja ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom

Tablica 24 Kemijski profil eteričnog ulja ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom

Br.	Spoj	Udjeli spojeva u eteričnom ulju
1.	*α*-pinen	0,7
2.	sabinen	0,5
3.	*β*-pinen	0,1
4.	1,8-cineol	4,9
5.	*β*-tujon	1,9
6.	*α*-tujon	1,0
7.	kamfor	3,3
8.	borneol	3,0
9.	terpinen-4-ol	0,5
10.	*α*-terpineol	0,5
11.	bornil-acetat	1,8
12.	*α*-terpinil-acetat	6,8
13.	*α*-gurjunen	0,9
14.	*trans*-kariofilen	10,7

15.	*trans*-*α*-bergamoten	0,1
16.	*α*-humulen	15,6
17.	*trans*-*β*-farnezen	7,6
18.	aromadendren	2,8
19.	*α*-kurkumen	0,1
20.	biciklogermakren	2,4
21.	*δ*-kadinen	0,5
22.	palustrol	0,3
23.	spatulenol	3,3
24.	kariofilen oksid	7,3
25.	viridiflorol	16,7
26.	*α*-humulen oksid	5,2
27.	*α*-kadinol*	1,1

* = spoj uvjetno identificiran.

4.2.5. Utjecaj tlaka i temperature $ESCO_2$ ploda konopljike na prinos ekstrakcije i udio najznačajnijih isparljivih spojeva

Tablica 25 Vrijednosti promatranog odziva pri ispitivanju utjecaja procesnih uvjeta $ESCO_2$ prema CCRD-u na prinos ekstrakcije ploda konopljike

Eksp.	Tlak (MPa)	Temperatura (°C)	Prinos ekstrakcije (%)
1	12,5	40,0	2,9
2	36,6	50,0	9,7
3	22,5	35,8	6,5
4	32,5	60,0	8,9
5	8,4	50,0	1,2
6	22,5	50,0	6,9
7	12,5	60,0	2,2
8	22,5	50,0	6,7
9	22,5	50,0	6,6
10	22,5	64,1	8,1
11	32,5	40,0	7,4
12	22,5	50,0	7,6
13	22,5	50,0	7,6

Dobiveni ekstrakti $ESCO_2$ pri različitim tlakovima (8,4 MPa; 12,5 MPa; 22,5 MPa; 32,5 MPa i 36,6 MPa) i temperaturama (35,8 °C; 40,0 °C, 50,0 °C, 60,0 °C i 64,1 °C) karakterizirani su GC-MS analizom čiji su podatci prikazani u **Tablici 26**. U **Tablici 32** prikazani su rezultati GC-MS analize dvaju ekstrakta dobivenih $ESCO_2$ s različitim udjelom vlage.

4.2.6. Kemijski profili isparljivih spojeva CO_2 ekstrakata ploda konopljike

Tablica 26 Kemijski sastav isparljivih spojeva CO_2 ekstrakata plodova konopljike dobivenih $ESCO_2$ (izražen kao postotak spoja u TIC-u)

Br.	Spoj	RI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.	*α*-pinen	940	0,3	0,5	0,4	1,1	0,1	0,8	0,1	1,4	1,1	0,5	1,9	1	0,8
2.	sabinen	978	2,2	3,2	3,1	5,1	0,4	4,2	0,3	6,5	5,2	2,6	8,1	4,9	4,3
3.	*β*-pinen	981	0,2	0,3	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,5	0,1	0,2	0,5	0,1	0,1
4.	*α*-terpinen	1021	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
5.	*p*-cimen	1026	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1
6.	limonen	1038	0,4	0,1	0,9	0,8	0,2	0,9	0,2	0,7	1	0,1	1,3	0,8	0,8
7.	1,8-cineol	1033	6,8	8	7,6	9,1	4,2	8,5	2,6	10,7	11,4	7,8	12,2	10,1	9,9
8.	*γ*-terpinen	1063	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3
9.	*cis*-sabinen hidrat	1070	0,2	-	0,1	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-
10.	*trans*-sabinen hidrat	1102	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
11.	*β*-tujon	1105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.	*α*-tujon	1102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	kamfor	1145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-
14.	borneol	1168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.	terpinen-4-ol	1181	0,7	0,8	0,4	1	1,5	0,4	1,2	0,8	1,3	1,1	0,9	1,1	1
16.	*α*-terpineol	1193	0,5	0,6	0,7	0,6	1	0,6	0,9	0,5	0,7	0,6	0,7	0,4	0,5
17.	bornil-acetat	1286	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-
18.	*α*-terpinil-acetat	1354	8,6	7,6	8,9	8,2	13,5	7,1	9,5	7,9	8,5	8	7,7	8,3	8,5
19.	*α*-gurjunen	1409	2,1	2,1	2,3	2,2	2,7	1,9	2,2	2	2,2	2,1	2	2,2	2,2
20.	*trans*-kariofilen	1421	15,9	15,8	16,3	16,1	18,6	13,6	16,2	14,5	15,6	14,5	14,2	15,5	15,8
21.	*trans*-*α*-bergamoten	1438	0,4	0,1	0,2	0,1	0,4	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
22.	*α*-humulen	1456	1	1	1,1	1	1,2	1	1	0,9	0,9	0,9	1,2	1	1,1
23.	*trans*-*β*-farnezen	1460	19,3	19,8	18,4	17,5	23,4	15,6	20,3	16,5	17,7	16,7	14,8	17,9	17,7
24.	aromadendren	1441	4,4	4,6	4,3	4,1	4,4	3,7	4,4	3,8	3,9	3,9	3,8	4,2	4,3
25.	*γ*-kurkumen	1480	-	-	-	-	0,2	0,1	0,1	0,3	-	-	0,5	-	-
26.	*α*-kurkumen	1484	0,1	0,2	0,1	0,4	0,3	0,5	0,2	0,3	0,1	0,2	0,5	0,1	0,1
27.	germakren D	1481	0,4	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,1	0,4	0,4	0,1	0,3
28.	biciklogermakren	1495	9,5	11,6	9,6	9,3	8,5	8,8	9,8	8,8	9,5	9,6	8,7	10,3	10,4

29.	*δ*-kadinen	1513	0,3	0,4	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3
30.	palustrol	1567	0,7	0,7	0,8	0,6	0,5	0,7	0,7	0,6	0,1	0,6	0,4	0,7	0,6
31.	spatulenol	1577	2,5	2,2	2,9	2,4	2,2	2,5	2,6	2,1	2,3	6,9	2,4	2,4	2,1
32.	kariofilen oksid	1581	3,6	4,4	4,5	3,5	3,2	3,3	3,8	3,8	4	4,2	4,5	4,5	4,4
33.	viridiflorol	1591	3,3	3,8	3,5	3	2,1	3,3	3,8	3,3	3,1	3,9	3,4	3,3	3,3
34.	*α*-humulen oksid	1601	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35.	*α*-kadinol*	1652	5,5	6,5	6,7	5,6	3,3	6,2	5,9	5,1	5	2,5	5	6,1	5,5
36.	cembren A*	1941	-	1,8	2,1	1	-	1,6	-	0,6	-	1,9	0,5	1	1,1

RI − indeksi zadržavanja u odnosu na C_9 − C_{25} alkane na stupcu HP-5MS; − spoj nije identificiran; * spoj uvjetno identificiran; TIC − kromatogram ukupne ionske struje. $ESCO_2$ provedena pri konstantnom protoku CO_2 (1,94 kg/h), vremenu ekstrakcije (90 min) i veličini čestice 0,356 mm.

4.2.7. Statistička analiza parametara $ESCO_2$ ploda konopljike

Statistička analiza ANOVA određenih parametara $ESCO_2$ napravljena je samo za najzastupljenije bioaktivne spojeve u dobivenim ekstraktima, dok za spojeve u tragovima, kao i one u niskim koncentracijama nije rađena statistička analiza.

Tablica 27 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranoga prinosa ekstrakcije ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	*p*-vrijednost*
Model	79,21	5	15,84	32,95	0,0001
X_1	68,42	1	68,42	142,31	< 0,0001
X_2	1,06	1	1,06	2,21	0,1804
X_1^2	8,31	1	8,31	17,28	0,0043
X_2^2	0,17	1	0,17	0,35	0,5744
X_1X_2	1,42	1	1,42	2,95	0,1298
Ostatak	3,37	7	0,48		
Nedostatak modela	2,54	3	0,85	4,12	0,1023
Pogreška	0,82	4	0,21		
Ukupno	82,58	12			
R^2	0,9592				

*X_1 – tlak ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti, df – stupnjevi slobode; MS – varijanca. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

Polinom koji opisuju ponašanje prinosa ekstrakcije u ispitivanom eksperimentalnom području **(Tablica 27)** dan je jednadžbom **(8)**:

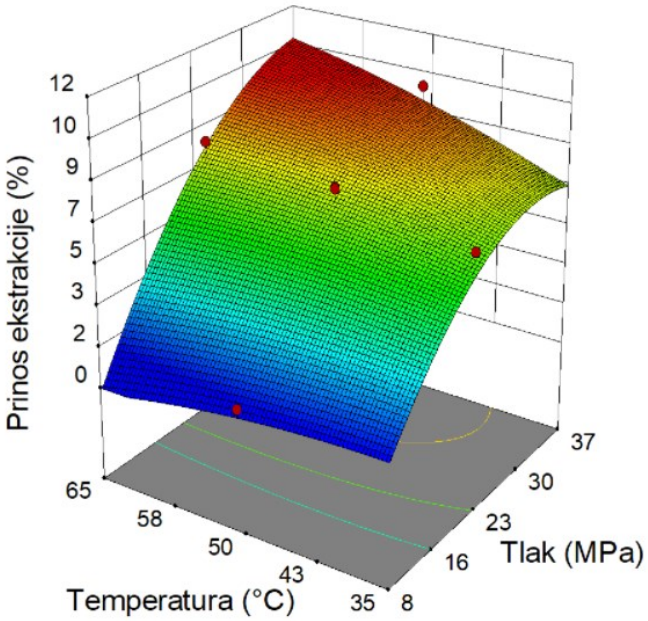
$$y_1 = 7,12 + 2,92X_1 + 0,36X_2 - 1,09X_1^2 - 0,15X_2^2 + 0,60X_1X_2 \quad (8)$$

gdje su kodirane vrijednosti:

y_1 − prinos ekstrakcije;

X_1 − tlak ekstrakcije;

X_2 − temperatura ekstrakcije.



Slika 19 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine prinosa $ESCO_2$ ploda konopljike u ovisnosti o tlaku i temperaturi

Tablica 28 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti udjela 1,8-cineola ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$

Izvor Varijabilnosti	**SS**	**df**	**MS**	**F-vrijednost**	***p*-vrijednost***
Model	71,00	5	14,20	5,41	0,023
X_1	37,30	1	37,30	14,22	0,007
X_2	6,16	1	6,16	2,35	0,169
X_1^2	22,95	1	22,95	8,75	0,021
X_2^2	7,18	1	7,18	2,74	0,142
X_1X_2	0,30	1	0,30	0,12	0,744
Ostatak	18,36	7	2,62		
Nedostatak modela	13,71	3	4,57	3,93	0,109
Pogreška	4,65	4	1,16		
Ukupno	89,36	12			
R^2	0,795				

*X_1 – tlak ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$

Polinom koji opisuje udio 1,8-cineola ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$ u ispitivanom eksperimentalnom području (**Tablica 28**) dan je jednadžbom (**9**):

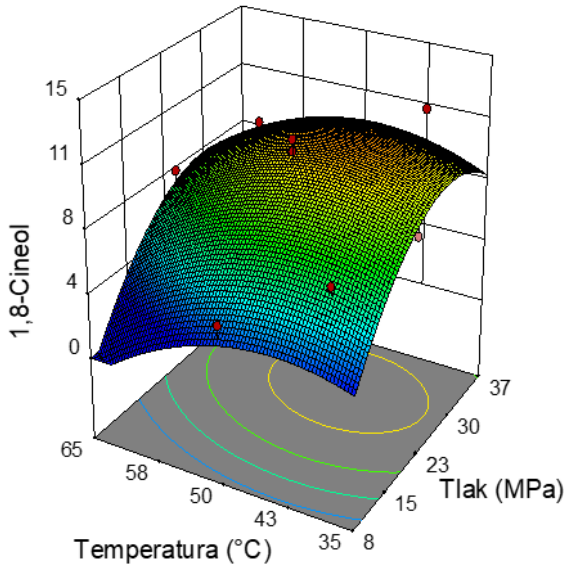
$$y_1 = 10,12 + 2,16X_1 - 0,88X_2 - 1,82X_1^2 - 1,02X_2^2 + 0,28X_1X_2 \qquad (\mathbf{9})$$

gdje su kodirane vrijednosti:

y_1 − udio 1,8-cineola;

X_1 − tlak ekstrakcije;

X_2 − temperatura ekstrakcije.



Slika 20 Trodimenzionalni dijagrami odzivne površine prinosa 1,8- cineola u ekstraktu ploda konopljike u ovisnosti o temperaturi i tlaku

Tablica 29 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti udjela *α*-terpinil-acetata ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$

Izvor varijabilnosti	**SS**	**df**	**MS**	**F-vrijednost**	***p*-vrijednost***
Model	21,07	5	4,21	3,28	0,077
X_1	13,90	1	13,90	10,80	0,013
X_2	$2{,}023 \times 10^{-3}$	1	$2{,}023 \times 10^{-3}$	$1{,}573 \times 10^{-3}$	0,969
X_1^2	6,89	1	6,89	5,35	0,054
X_2^2	0,02	1	0,02	0,02	0,902
X_1X_2	0,04	1	0,04	0,03	0,865
Ostatak	9,00	7	1,29		
Nedostatak modela	7,61	3	2,54	7,29	0,042
Pogreška	1,39	4	0,35		
Ukupno	30,07	12			
R^2	0,701				

*X_1 – tlak ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca; *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0{,}05$

Polinom koji opisuje udio α-terpinil-acetata ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$ u ispitivanom eksperimentalnom području (**Tablica 29**) dan je jednadžbom (**10**):

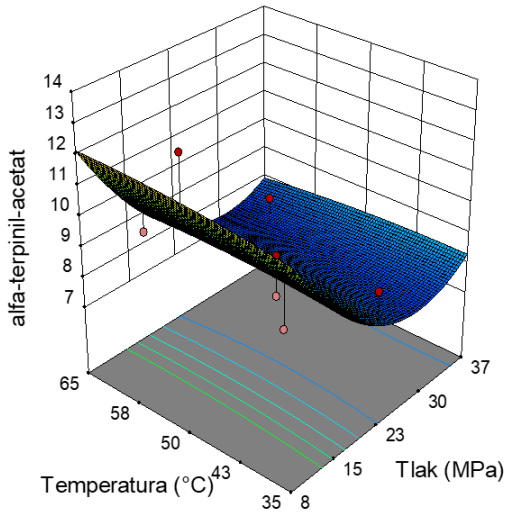
$$y_1 = 8{,}06 - 1{,}32X_1 + 0{,}016X_2 + 0{,}99X_1^2 - 0{,}055X_2^2 - 0{,}10X_1X_2 \qquad (\mathbf{10})$$

gdje su kodirane vrijednosti:

y_1 − udio *α*-terpinil-acetata;

X_1 − tlak ekstrakcije;

X_2 − temperatura ekstrakcije.



Slika 21 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine prinosa *α*-terpinil-acetata u ekstraktu ploda konopljike u ovisnosti o temperaturi i tlaku

Tablica 30 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti udjela *trans*-kariofilena ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$

Izvor varijabilnosti	**SS**	**df**	**MS**	**F-vrijednost**	***p*-vrijednost***
Model	8,42	5	1,68	2,66	0,117
X_1	4,15	1	4,15	6,54	0,037
X_2	0,01	1	0,01	0,02	0,882
X_1^2	2,72	1	2,72	4,29	0,077
X_2^2	0,53	1	0,53	0,83	0,393
X_1X_2	0,64	1	0,64	1,01	0,348
Ostatak	4,44	7	0,63		
Nedostatak modela	4,38	3	1,46	97,29	0,003
Pogreška	0,06	4	0,01		
Ukupno	12,86	12			
R^2	0,655				

*X_1 – tlak ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca; *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Polinom koji opisuje udio *trans*-kariofilena u plodu konopljike dobiven $ESCO_2$ u ispitivanom eksperimentalnom području (**Tablica 30**) dan je jednadžbom (**11**):

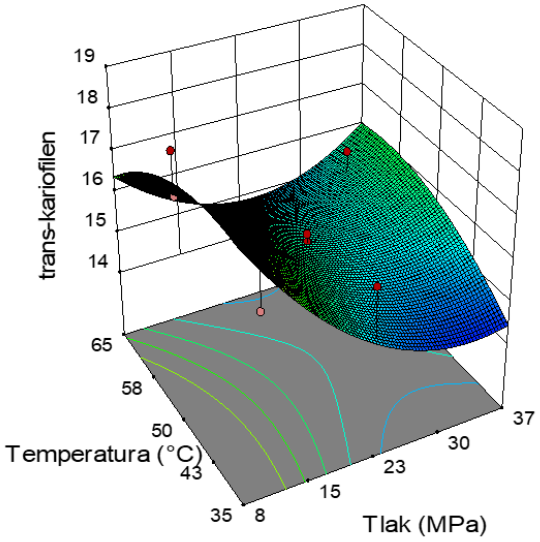
$$y_1 = 15,60 - 0,72X_1 - 0,043X_2 + 0,62X_1^2 - 0,27X_2^2 + 0,40X_1X_2 \quad (\mathbf{11})$$

gdje su kodirane vrijednosti:

y_1 − udio *trans*-kariofilena;

X_1 − tlak ekstrakcije;

X_2 − temperatura ekstrakcije.



Slika 22 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine prinosa *trans*-kariofilena u ekstraktu ploda konopljike u ovisnosti o temperaturi i tlaku

Tablica 31 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti udjela *trans*-*β*-farnezena ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	*p*-vrijednost*
Model	45,37	5	9,07	4,42	0,038
X_1	19,19	1	19,19	9,36	0,018
X_2	0,21	1	0,21	0,10	0,758
X_1^2	24,07	1	24,07	11,74	0,011
X_2^2	0,19	1	0,19	0,09	0,770
X_1X_2	0,72	1	0,72	0,35	0,571
Ostatak	4,44	7	0,63		
Nedostatak modela	4,38	3	1,46	97,29	0,003
Pogreška	0,06	4	0,01		
Ukupno	12,86	12			
R^2	0,759				

*X_1 – tlak ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca; *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0{,}05$.

Polinom koji opisuje udio *trans*-*β*-farnezena ploda konopljike dobivenog $ESCO_2$ u ispitivanom eksperimentalnom području (**Tablica 31**) dan je jednadžbom (**12**):

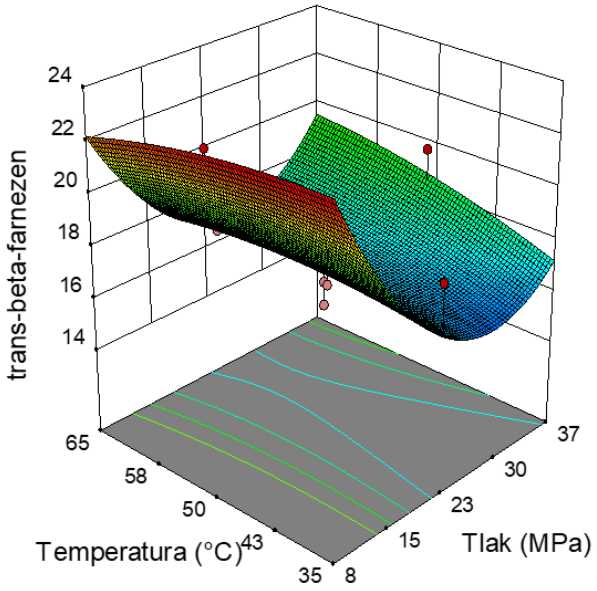
$$y_1 = 17{,}08 - 1{,}55X_1 + 0{,}16X_2 + 1{,}86X_1^2 - 0{,}16X_2^2 - 0{,}43X_1X_2 \qquad (\mathbf{12})$$

gdje su kodirane vrijednosti:

y_1 − udio *trans*-*β*-farnezena;

X_1 − tlak ekstrakcije;

X_2 − temperatura ekstrakcije.



Slika 23 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine prinosa *trans-β*-farnezena u ekstraktu ploda konopljike u ovisnosti o temperaturi i tlaku

4.2.8. Utjecaj promjene udjela vlage na kemijski profil CO_2 ekstrakata ploda konopljike

Istraživanja nekoliko autora dokazala su kako veći udio vode utječe na povećanje prinosa ekstrakcije, stoga je postupak ekstrakcije suhog i navlaženog uzorka ploda konopljike podvrgnut $ESCO_2$ pri temperaturi od 50 °C i tlaku od 22,5 MPa (ponavljanja u centralnoj točki) s ciljem ispitivanja utjecaja promjene udjela vlage na sastav i udio spojeva.

Tablica 32 Rezultati utjecaja promjene udjela vlage na sastav isparljivih spojeva ekstrakta konopljike dobivenih $ESCO_2$

Br.	Spoj	Suhi uzorak (%)	Uzorak s povećanom vlažnošću (%)
1.	*α*-pinen	0,5	0,5
2.	sabinen	2,0	2,4
3.	*β*-pinen	0,1	0,1
4.	*α*-terpinen	0,1	0,1
5.	*p*-cimen	0,1	0,1
6.	limonen	0,1	0,1
7.	1,8-cineol	9,3	8,7
8.	*γ*-terpinen	0,1	0,3
9.	terpinen-4-ol	-	0,5
10.	*α*-terpineol	-	1,4
11.	*α*-terpinil-acetat	6,2	9,1

12.	*α*-gurjunen	2,9	2,4
13.	*trans*-kariofilen	20,4	17
14.	*trans*-*α*-bergamoten	0,1	0,1
15.	*α*-humulen	1,4	1,0
16.	*trans*-*β*-farnezen	8,7	19,3
17.	aromadendren	5,6	4,5
18.	*α*-kurkumen	0,1	0,1
19.	germakren D	-	0,5
20.	biciklogermakren	11,2	11,2
21.	*δ*-kadinen	0,1	0,1
22.	palustrol	0,2	0,3
23.	spatulenol	3,7	1,3
24.	kariofilen oksid	7,2	5,4
25.	viridiflorol	4,2	3,5
26.	*α*-kadinol	8,7	6,0
27.	cembren A	0,4	0,5

4.2.9. Optimalni procesni uvjeti $ESCO_2$ ploda konopljike

Usporedba eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti prikazana je u **Tablici 33**.

Tablica 33 Stvarne i predviđene vrijednosti za ispitivane odzive pri optimalnim uvjetima $ESCO_2$ ploda konopljike

Tlak	32,5 MPa				
Temperatura	60 °C				
	Prinos ekstrakcije (%)	**1,8-cineol (%)**	***α*-terpinil-acetat (%)**	***trans*-kariofilen (%)**	***trans*-*β*-farnezen (%)**
Stvarne vrijednosti	8,9	9,1	8,2	16,1	17,5
Predviđene vrijednosti	9,5	9,3	7,6	15,6	17,7

5. RASPRAVA

5.1. HIDRODESTILACIJA I SUPERKRITIČNA FLUIDNA EKSTRAKCIJA CVIJETA SMILJA

5.1.1. Kemijski profil eteričnog ulja cvijeta smilja dobivenoga hidrodestilacijom

Eterično ulje smilja ima složen kemijski sastav koji je teško proizvesti sintetski (Talic i sur., 2019). Kemijski profili eteričnog ulja smilja prikazani u **Tablici 2,** dobiveni s različitih područja Sredozemlja, pokazuju izvanrednu raznolikost te izravno ukazuju na biokemijska i fiziološka svojstva svake botaničke vrste dostupne na određenom zemljopisnom području (Staver i sur., 2015). S obzirom na to da su biljke sakupljane na različitim lokalitetima, na različitim nadmorskim visinama i pri nejednakoj izloženosti suncu, može se zaključiti da okolišni uvjeti utječu na kemijsku raznolikost eteričnog ulja smilja (Zeljković i sur., 2015). Genetske razlike također značajno utječu na metabolizam biljaka što također može objasniti razlike u kemijskom sastavu eteričnih ulja (Satta i sur., 1999).

Cvjetovi smilja za potrebe ovog istraživanja ubrani su u periodu pune cvatnje, početkom srpnja i podvrgnuti procesu hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru. Kemijski sastav dobivenog eteričnog ulja cvijeta smilja *H. italicum* subsp. *italicum* određen je GC-MS analizom (**Tablica 17**). Prinos eteričnog ulja dobivenog procesom hidrodestilacije iznosio je 0,3 %. Naime, poznato je da cvijet smilja sadrži vrlo malo eteričnog ulja (manje od 0,05 %). Biljke uzgojene u kontinentalnim područjima u fazi cvjetanja sadrže 0,15 % ulja, a nakon cvjetanja 0,13 % eteričnog ulja (Houdret, 2002). Relativno niski prinosi hidrodestilacije ove mediteranske biljne vrste zabilježeni su i u prethodnim sličnim studijama (Staver i sur., 2018; Mastelic i sur., 2005; Blažević i sur., 1995).

Kemijski profil eteričnog ulja smilja dobivenog procesom hidrodestilacije sadržavao je seskviterpenske spojeve kao najzastupljenije, a osobito *γ*-kurkumen (23,2 %), *β*-selinen (9,9 %) i *α*-selinen (6,7 %), dok su među monoterpenima najzastupljeniji bili *α*-pinen (13,7 %) i limonen (3,1 %). Pored navedenih spojeva, GC-MS profil eteričnog ulja pokazao je i prisutnost neril-acetata (5,4 %) te udio italicena (4,5 %).

Istraživanje autora Zeljković i sur., 2015, koji su dobili četiri uzorka eteričnog ulja iz smilja sakupljenog na različitim područjima Dalmacije, ukazuje na to kako nadmorska visina utječe na sličnosti u kvalitativnom i razlike u kvantitativnom sastavu eteričnih ulja. Navedeno su obrazložili činjenicom da su sakupljane biljke rasle na različitim nadmorskim visinama te imale različitu razinu izloženosti suncu. Uočeno je kako su niža nadmorska visina i izloženost suncu utjecali na višu ukupnu količinu spojeva koji sadrže kisik i nizak sadržaj monoterpena u

uzorcima. Satta i sur. (1999) zaključili su da su eterična ulja dobivena iz smilja prikupljenog na visinama između 100 i 200 m bila bogata linaloolom i *γ*-kurkumenom, dok su ona dobivena na visinama između 500 i 900 m bila bogata nerolom, neril-acetatom, neril-propionatom i *γ*-kurkumenom. Plantaža s koje je prikupljen biljni materijal za potrebe ovog istraživanja nalazi se na 100 m nadmorske visine te je stoga i prisutnost *γ*-kurkumena u iznosu od 23,2 % na osnovi navedenog istraživanja opravdano visoka.

Analize eteričnog ulja smilja s područja Hercegovine u različitim dijelovima biljke (lišće, cvjetovi, stabljike) i u različitim vegetacijskim razdobljima prethodno su proučavane te se pokazalo da je tijekom razdoblja cvatnje prisutan veći sadržaj terpenskih ugljikovodika u odnosu na oksidirane (Talic i sur., 2019). Iako se sastav eteričnog ulja smilja razlikuje u skladu sa sezonskim promjenama, utvrđeno je da je *α*-pinen glavni spoj prisutan tijekom cijele sezone u svim kemotipovima, što je detaljno prikazano u **Tablici 2**. Uzorci prikupljeni na Korzici (Bianchini i sur., 2009), kao i eterična ulja iz južne Hrvatske (Maksimovic i sur., 2013; Mastelić i sur., 2008; Mastelic i sur., 2005; Blažević i sur., 1995) također su sadržavala *α*-pinen u najvećem udjelu, kao i ispitana eterična ulja s područja Hercegovine (Tanović i sur., 2020; Odak i sur., 2019; Karalija i sur., 2020; Talic i sur., 2019). Karakterističan spoj prisutan u glavnom sastavu izoliranog eteričnog ulja s područja Hercegovine je *γ*-selinen (Talic i sur., 2019).

U istraživanju novijega datuma (Talic i sur., 2021) u uzorcima skupljenim na 10 lokaliteta na području Hercegovine glavni spojevi eteričnog ulja smilja dobiveni hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru bili su također *α*-pinen (4,1 − 19,3 %) i limonen (1,3 − 6,2 %), dok su neril-acetat (3,6 − 21,1 %) i linalool (2,3 − 5,7 %) bili najzastupljeniji oksidirani monoterpeni. Najzastupljeniji seskviterpenski ugljikovodici bili su *γ*-kurkumen (8,4 − 18,6 %), *trans*-kariofilen (3,1 − 8,5 %), *β*-selinen (2,8 − 6,7 %) te 4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion (5,1 −14,5 %). Kemijski profil dobivenog eteričnog ulja smilja s područja Hercegovine autori su iskoristili za usporedbu sa 64 eterična ulja iz drugih sredozemnih regija. Njihovi rezultati potvrdili su navode kako je kemijski profil eteričnih ulja smilja s područja Hercegovine sličan onom iz jadranske regije (Hrvatska i jugoistočna Italija) te da sadrži *α*-pinen, neril-acetat, *γ*-kurkumen i *β*-diketone. Pored toga, eterična ulja s područja Hercegovine odlikovala su se prisutnošću *β*-kurkumena, *α*-bergamotena i italicena. U drugom istraživanju eteričnog ulja smilja s područja Hercegovine (Talic i sur., 2019), GC-MS kemijski profil sadržavao je *α*-pinen (15,7 %) kao glavni spoj, a slijedili su ga *γ*-kurkumen (12,8 %), 4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion (8,7 %), neril-acetat (6,9 %), limonen (6,4 %) i *β*-selinen (5,3 %). Ostali spojevi prisutni u primjetnim količinama bili su *trans*-kariofilen (3,9 %), *α*-selinen (3,6 %), *γ*-selinen (3,1 %) i *β*-diketoni (0,4 – 8,7). Specifičan spoj u navedenom istraživanju bio je 4,6,9-trimetildec-8-en-3,5-dion, koji se također nalazio

među glavnim spojevima u istraživanjima autora koji su se bavili ispitivanjem smilja s područja Italije i Francuske (Andreani i sur., 2019; Fraternale i sur., 2019).

U istraživanju drugih autora (Tanović i sur., 2020) uzorci smilja prikupljeni su na dva lokaliteta u Hercegovini (Mostar i Čapljina). Berba je obavljana u ranim jutarnjim satima, kada je koncentracija eteričnog ulja najviša, nakon čega je biljni materijal sušen i odmah podvrgnut procesu destilacije vodenom parom, s obzirom na to da koncentracija eteričnog ulja smilja brzo opada nakon branja (Handa i sur., 2008). Glavni cilj njihovog istraživanja bio je pronaći optimalnu razvojnu fazu smilja (faza butonizacije, početak cvjetanja, puno cvjetanje, završetak cvjetanja), pri kojoj će se ostvariti najviši prinos eteričnog ulja. Kemijski profil dobivenih eteričnih ulja utvrđen je GC-MS analizom te je pokazao najviši sadržaj eteričnog ulja u razvojnoj fazi punog cvjetanja (22. 7. 2018.), a najniži u razvojnoj fazi butonizacije (10. 7. 2018.). Prijelazom iz faze punog cvjetanja (0,31 %) u fazu završetka cvjetanja, udio eteričnog ulja se smanjivao (0,17 %). Glavni spojevi analiziranog eteričnog ulja u fazi punog cvjetanja bili su *α*-pinen (21,32 %), neril-acetat (10,62 %), izoitalicen (6,25 %), *β*-kariofilen (4,51 %), *α*-kopaen (4,19 %), limonen (3,91 %) i nerol (1,15 %). Značajan je sadržaj neril-acetata (10,62 %) koji pokazuje kvalitetu smilja s ovih prostora (Politeo, 2003).

Istraživanje autora Karalija i sur. (2020) prikazalo je prisutnost *α*-pinena (13,9 %), germakrena D (9,0 %) i *ar*-kurkumena (8,7 %) u eteričnom ulju smilja prikupljenom na plantaži u okolici Sarajeva (BiH). Autor ne navodi dio biljke korišten za hidrodestilaciju.

S obzirom na zemljopisnu blizinu i veliku sličnost u kemijskom profilu eteričnih ulja smilja s hercegovačkog podneblja i s različitih područja Hrvatske značajno je detaljnije prokomentirati glavne spojeve. Eterična ulja dobivena iz smilja sakupljenog duž jadranske obale (Dalmacija) sadrže visoke količine *α*-pinena i seskviterpenskih ugljikovodika *α*- i *β*-kurkumena, kao i neril-acetata. Eterično ulje ispitano u istraživanju koje su proveli Staver i sur. (2018) na smilju s dalmatinskog podneblja bilo je bogato *γ*-kurkumenom i *α*-pinenom s prisutnom značajnom količinom neril-acetata, što podupire spomenute literaturne podatke, kao i sličnost s kemijskim profilom eteričnog ulja smilja s hercegovačkog podneblja. Međutim, razlike se mogu primijetiti u usporedbi s istraživanjem provedenim na uzorcima prikupljenim blizu Splita, gdje su *α*-pinen (12,8 %) i neril-acetat (10,4 %) bili glavni spojevi zajedno s monoterpenima koji čine većinu ukupnoga kemijskog sastava, dok su seskviterpeni bili prisutni u znatno nižoj koncentraciji (Mastelić i sur., 2008). U drugom istraživanju provedenom na eteričnom ulju smilja prikupljenog na različitim mjestima u Dalmaciji (otok Brač, Biokovo središte, Makarska) pokazale su se kvalitativne i kvantitativne razlike u njihovim kemijskim profilima. Svi uzorci eteričnog ulja bili su bogati seskviterpenskim ugljikovodicima, gdje je bračko eterično ulje posjedovalo *α-trans*-bergamoten (10,0 %) i *β*-akoradien (10,1 %) kao dominantne spojeve, dok su uzorci s Biokova

bili bogati *α*-humulenom. Suprotno navedenom, uzorak u blizini Makarske bio je bogat oksidiranim seskviterpenima, te s rozifoliolom (8,5 %) kao glavnim spojem (Zeljković i sur., 2015). Analiza eteričnog ulja s jadranske obale, pokazala je seskviterpenske ugljikovodike kao najčešću kemijsku skupinu uz izomere kurkumena (Blažević i sur., 1995; Ivanovic i sur., 2011a).

H. italicum pokazuje zanimljive biološke aktivnosti koje su rezultat velike raznolikosti njegovih kemijskih profila. Utvrđeno je da metaboliti izolirani iz *H. italicum*, a posebno isparljiva frakcija eteričnog ulja pokazuju mnoštvo antimikrobnih, protuupalnih, antivirusnih, antioksidativnih te antiproliferativnih bioloških svojstava. Uporaba eteričnog ulja smilja u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji ovisi u prvom redu o njegovom kemotipu te glavnim spojevima.

Kemijski profil eteričnog ulja cvijeta smilja dobiven istraživanjem u ovoj doktorskoj disertaciji sadržavao je *γ*-kurkumen, *β*-selinen i *α*-selinen, dok su u nižim koncentracijama (ispod 3 %) bili najzastupljeniji *α*-pinen i limonen. Pored navedenih spojeva, GC-MS profil eteričnog ulja sadržavao je i neril-acetat, italicen i nerol.

Neril-acetat pridonosi ublažavanju boli. Pored ovoga spoja, iste su učinke autori Guinoseau i sur. (2013) pripisali i pojavi italidiona u eteričnom ulju *H. Italicum*. Ova vrsta spojeva pokazuje antihematomska svojstva pa se ovo eterično ulje često naziva „*superarnicom aromaterapije*“. Zbog toga se preporučuje za kuperoznu kožu (crvene vene), hematome (čak i stare hematome), trombozu i prevenciju modrica. Kada se eterično ulje smilja pomiješa s nekim drugim specifičnim eteričnim uljem, smatra se da su pripravljene smjese antialergijske. Dakle, ovi recepti za aromaterapiju mogu biti korisni u slučajevima astme, peludne groznice ili ekcema. Nerol je kao spoj skupa sa svojim derivatima poželjan u parfemskoj industriji (Talic i sur., 2021).

Najveći dio znanstvenih studija na biljci *H. italicum* bio je usmjeren na eterična ulja, ističući veliku količinu monoterpena poput neril-acetata, neril-propanoata i *α*-pinena, dok se vrlo malo zna o kemijskom sastavu polarnih ekstrakata *H. italicum*. Polarni spojevi poput flavonoida iz ekstrakata i terpena iz eteričnih ulja smatraju se odgovornim za pozitivne biološke učinke smilja (Viegas i sur., 2014). Naime, smilje sadrži i ne-flavonoide poput pirona, floroglucinola i acetofenona, koji mogu imati antiradikalno djelovanje (Kladar i sur., 2015; Katalinic i sur., 2006). Prema rezultatima ispitivanja utjecaja eteričnog ulja smilja na stanice melanoma, ono bi se moglo smatrati perspektivnim prirodnim izvorom novih spojeva protiv raka (Gismondi i sur., 2020).

Ova izvanredna svojstva objašnjavaju entuzijazam koji postoji oko eteričnog ulja *H. italicum*. Međutim, treba voditi računa o vrsti biljke i pripadajućim spojevima, vremenu sazrijevanja, dijelu biljke koji se koristi te primijenjenim postupcima ekstrakcije (Guinoseau i sur., 2013).

Činjenica je da poznavanje kemoraznolikosti eteričnog ulja ove medicinski i ekonomski važne biljke može olakšati njezinu zaštitu te upravljanje njezinom održivošću (Talic i sur., 2021). Stoga se vrijednost rezultata prikazanih u **Tablici 17** očituje u prikazu kemijskoga profila cvijeta smilja s plantažnog uzgoja u odnosu na kemijski profil istoimene biljke s područja Hercegovine prikazan u radovima drugih autora (**Tablica 2**), gdje je prikupljan samonikli biljni materijal.

Eterično ulje izolirano iz cvijeta smilja sa zemljopisnog područja Hercegovine ima specifičan kemijski sastav u kojemu je zastupljena visoka koncentracija *γ*-kurkumena, neril-acetata i *α*-pinena, što mu daje visoku kvalitetu i zemljopisnu prepoznatljivost. Međutim, nedostatak dodatnoga znanja o kemijskom sastavu i farmakološkim svojstvima ove biljke s ovoga područja jedna je od glavnih prijetnji njezinoj bioodrživosti (Talic i sur., 2021) i stoga je svako novo istraživanje u ovom pogledu dobrodošlo.

5.1.2. Kemijski profili CO_2 ekstrakata cvijeta smilja

Posljednjih je godina objavljeno nekoliko studija (Maksimovic i sur., 2017; Mouahid i sur., 2017; Maksimovic i sur., 2013; Ivanovic i sur., 2011a; Mićić i sur., 2009) o SFE-u cvijeta smilja i pri tomu je uočeno kako je kemijski sastav dobivenih ekstrakata varirao ovisno o području rasta biljke, klimatskim uvjetima te procesnim parametrima ekstrakcije.

Naime, podatci o utjecaju procesnih parametara $ESCO_2$ na prinos ekstrakcije i udio isparljivih spojeva iz cvijeta smilja, kao što je već spomenuto u odlomku 2.2.3., (dostupnih u znanstvenoj literaturi) prilično su oskudni. Ipak, postoji određeni broj istraživanja na osnovi kojih bi se mogla povući paralela između različitih zemljopisnih područja, odabranih procesnih parametara te pripadajućega kemijskog profila dobivenog $ESCO_2$. Podatci o ekstrakciji iz *H. italicum* pomoću $ESCO_2$ objavljeni u znanstvenim člancima prikazani su u **Tablici 3**, gdje su tlak i temperatura ekstrakcije varirali u rasponu 79,3 – 35,0 MPa i 39,8 − 64,1 °C, s ekstrakcijskim vremenom od 1,5 do 4 sata. Dobiveni prinosi ekstrakcije kretali su se u rasponu 1,4 − 5,7 %. Značajan broj parametara utječe na SFE, stoga je izuzetno važno odrediti utjecaj onih najznačajnijih na konačni sastav ekstrakta i njegov prinos. S ciljem pronalaska onoga parametra koji statistički značajno utječe na ekstrakciju cvijeta smilja dobivenog $ESCO_2$, u ovoj doktorskoj disertaciji korištena je metoda odzivnih površina i CCRD-a. Upravo ova tehnika optimizacije omogućuje pronalaženje optimalnih parametara procesa ekstrakcije (Sharif i sur., 2014).

S obzirom na pretpostavljene i literaturno dokazane činjenice vezane uz značajan utjecaj veličine čestica uzorka na sam učinak ekstrakcije (Jokić, 2011), pri svim se eksperimentima koristila konstantna veličina čestica cvijeta smilja od 0,354 mm (prethodno određena prosijavanjem na standardnoj seriji sita (**Tablica 16**). Vrijeme ekstrakcije od 90 min u preliminarnim se istraživanjima pokazalo kao optimalno vrijeme u kojemu se uspijeva dobiti

potpuni prinos ekstrakcije, stoga je izabrano kao konstantni parametar tijekom svih procesa ekstrakcije uz protok fluida od 1,94 kg/h.

Preliminarna istraživanja objavljena u radu Jerković i sur. (2016) pokazala su značajan utjecaj tlaka i temperature na prinos $ESCO_2$. Stoga se istraživanje u ovoj doktorskoj disertaciji fokusiralo na utjecaj tlaka (u rasponu 7,9 – 22,1 MPa) i temperature (u rasponu 35,8 – 64,2 °C) na prinos ekstrakcije, pri čemu je uočeno da prinos raste u rasponu 0,6 – 4,8 %, ovisno o utjecaju procesnih parametara. Radni uvjeti varirali su na tri razine i provedeno je 13 eksperimenata prema planu pokusa prikazanom u **Tablici 12** s pet ponavljanja u središnjoj točki (15,0 MPa i 50,0 °C).

Uzimajući u obzir prethodno objavljena istraživanja o SFE-u vrsta *Helichrysum* (Marongiu i sur., 2006; Marongiu i sur., 2003; Poli i sur., 2003), odabrana gornja temperaturna granica (64,1 °C) bila je dovoljno niska da se izbjegnu promjene termolabilnih spojeva. Kako bi se izolirali ekstrakti bogati isparljivim spojevima, postupak $ESCO_2$ izveden je pri tlakovima do 22,1 MPa, uz donju granicu od 7,9 MPa (malo iznad kritičnoga tlaka CO_2 otapala od 7,4 MPa). Rezultati su prikazani u **Tablici 19**.

Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih prinosa ekstrakcije cvijeta smilja dobivenog $ESCO_2$ dana je u **Tablici 20** u kojoj f-vrijednost modela iznosi 4,35, što znači da je model bio značajan. *p*-vrijednost ovoga regresijskog modela iznosila je 0,040, što je bio pokazatelj postojanja značajne veze između nezavisnih varijabli (tlaka i temperature) i odziva, pri čemu *p*-vrijednost nedostatka modela nije bila značajna. Utjecaj tlaka (X_1) pokazao je statističku značajnost na prinos ekstrakcije, pri čemu temperatura (X_2) nije bila statistički značajna. Interakcije između parametara nisu pokazale statistički značajan utjecaj na prinos ekstrakcije. Kvadratni članovi modela X_1^2, koji se odnosi na tlak i X_2^2, koji se odnosi na temperaturu također nisu pokazali statistički značajan utjecaj na prinos ekstrakcije. f-vrijednost nedostatka modela iznosila je 5,94, što je pokazatelj toga da nedostatak modela nije statistički značajan. Koeficijent korelacije R^2 iznosio je 0,856, što pokazuje slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka. Najbolji način prikaza utjecaja parametara $ESCO_2$ na prinos ekstrakcije cvijeta smilja unutar istraživanoga područja je pomoću 3D modela odzivnih površina. Iz 3D grafa (**Slika 17**) vidljivo je kako prinos $ESCO_2$ značajno raste s porastom tlaka u cijelom istraživanom području (od 7,9 do 22,1 MPa). S druge strane, temperatura nema toliko značajan utjecaj. Ipak, s porastom temperature od 35,8 do 45,0 °C vidljiv je blagi porast prinosa ekstrakcije, dok od 45,0 do 55,0 °C nema nikakvog utjecaja. Dalje je vidljivo da povećanjem temperature od 55,0 do 64,1 °C dolazi do blagoga pada u prinosu.

Podatci u **Tablici 18** pokazuju značajno variranje prinosa ekstrakcije od 0,6 do 4,8 %, što ovisi o primijenjenim parametrima ekstrakcije (tlaku i temperaturi). Kontekst istraživanja vođen je dalje slijedom ispitivanja utjecaja tlaka kao najznačajnijeg procesnog parametra na udio isparljivih spojeva u dobivenim ekstraktima. Iz toga je vidljivo kako je prinos ekstrakcije rastao s porastom tlaka, stoga su provedeni eksperimenti pri tlakovima od 7,9 MPa, 15,0 MPa i 22,1 MPa pri 50,0 °C. Time se ispitao utjecaj minimalnog, srednjeg i maksimalnoga tlaka na udio isparljivih spojeva u ekstraktu smilja dobivenim $ESCO_2$.

Dobiveni ekstrakti cvijeta smilja primjenom $ESCO_2$ određeni su analizom GC-MS, pri čemu je identificiran ukupno 51 spoj (**Tablica 19**). Broj identificiranih spojeva u provedenim ekstrakcijama ovisio je o utjecaju tlaka. Tako je pri tlaku od 7,9 MPa identificirano 27 spojeva, pri 15,0 MPa 48 spojeva i pri 22,1 MPa 29 spojeva. Kao glavni spojevi u svim dobivenim ekstraktima istaknuli su se derivati tremetona: 12-hidroksitretmeton (bitalin A; 6,1 – 23,0 %), 12-acetoksitretmeton (3,7 – 13,3 %), 1-[2-(3-hidroksi-2-(1-hidroksiprop-1-en-2-il)-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon (gnafaliol; 2,4 – 2,9 %), 1-[2-(2-metil-2,3-dihidroksipropil)-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon (17,2 – 20,4 %), izobutil-bitalin A (4,1 – 6,5 %) i 1-[2-(acetilprop-1-en-2-il)-3-hidroksi-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon (6,7 – 10,3 %).

Pregledom dobivenih rezultata prikazanih u **Tablici 19** uočen je utjecaj različitih ekstrakcijskih tlakova na udjele navedenih spojeva u dobivenim ekstraktima. Pretpostavka je da su ekstrakti sadržavali i visokomolekularne spojeve koje nije moguće detektirati GC-MS analizom.

Spojevi koji se u eteričnom ulju smilja izoliranom hidrodestilacijom pojavljuju u najvišim koncentracijama bili su *γ*-kurkumen (23,2 %), *α*-pinen (13,7 %), *β*-selinen (9,9 %), *α*-selinen (6,7 %), neril-acetat (5,4 %), *trans*-kariofilen (4,7 %), limonen (3,1 %) i *α*-kopaen (2,9 %), izostali su u kemijskom profilu ekstrakata dobivenih $ESCO_2$. Ekstrakti $ESCO_2$ sadržavali su i manji udio mono- i seskviterpena poput *ar*-kurkumena (0,4 – 5,0 %), 7-*epi*-amiteola (0,2 – 1,3 %), *α*-selinena (0,2 – 1,2 %), *trans*-kariofilena (0,2 – 0,8 %), neril-acetata (0,1 – 0,4 %), italicena (0,1 – 0,3 %) ili *α*-kopaena (0,1 – 0,3 %). Bio je značajan udio i drugih spojeva poput eikosana (7,4 %), dokosana (3,8 – 10,1 %), skvalena (35,6 %), te derivata tremetona. Derivati tremetona i ranije su pronađeni u ekstraktima *H. italicum*. Karakteristični spoj cvijeta smilja i u eteričnom ulju (5,4 %) i CO_2 ekstraktu (0,1 – 0,4 %) bio je neril-acetat, prisutan u različitim koncentracijama.

Optimalni parametri $ESCO_2$ dobiveni korištenjem RSM-a bili su pri tlaku od 20,5 MPa i temperaturi od 45,3 °C. Provjera i valjanost generiranoga matematičkog modela izvedena je ekstrakcijom u tim optimalnim uvjetima. Usporedba eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti prikazana je **Tablicom 22**, gdje je vidljivo blisko podudaranje dobivenih eksperimentalnih i predviđenih podataka.

Značajan spoj dobiven $ESCO_2$ u visokoj koncentraciji pri niskom tlaku (7,9 MPa) bio je skvalen. On se prirodno pojavljuje kao glavna komponenta lipida na površinskom sloju kože. Nanesen putem kozmetičkih proizvoda pokazuje prednosti za kožu u svojstvu emolijanta i antioksidansa, pri čemu se koristi i za vlaženje kože kroz različite hidratore (Huang i sur., 2009). Pored toga, skvalen se koristi i u liječenju kožnih poremećaja poput seboroičnog dermatitisa, akni, psorijaze ili atopijskog dermatitisa. Međutim, potrebno je provesti dodatna ispitivanja proizvoda koji sadrže skvalen kako bi se istražila njegova značajnost u tretmanima liječenja kožnih oboljenja (Wołosik i sur., 2013). S obzirom na to da se primjenom $ESCO_2$ dobivaju ekstrakti bez zaostatka otapala, te da se kao takvi mogu izravno primjenjivati u kozmetičkim proizvodima, njegova ekstrakcija ovom metodom izrazito je značajna u kozmetičkoj industriji.

U ispitivanju autora Mićić i sur. (2009), u kojem je ispitan utjecaj porasta tlaka na prinos ekstrakcije, također je zaključeno kako s porastom tlaka raste i prinos ekstrakcije (od 0,35 do 5,71 %). U ekstraktu dobivenom $ESCO_2$ pri tlaku od 8 MPa identificirano je 20 spojeva od kojih su najznačajniji *γ*-kurkumen (23,35 %) i *trans*-kariofilen (10,53 %), dok je u CO_2 ekstraktu dobivenom pri tlaku od 35 MPa identificirano 18 spojeva, među kojima su najznačajniji tritriakontan (27,13 %) i nonakosan (13,28 %).

Ovo istraživanje pruža nove podatke o utjecaju tlaka na $ESCO_2$ cvjetova *H. italicum* korištenjem RSM-a. Statistička procjena rezultata pokazala je kako tlak ima značajan utjecaj na prinos ekstrakcije i udio značajnih isparljivih spojeva.

5.1.4. Utjecaj procesnih uvjeta $ESCO_2$ na udio skopoletina

Skopoletin je bioaktivni spoj koji se nalazi u cvijetu smilja, a $ESCO_2$ upravo pruža novi i ekološki način dobivanja biljnih ekstrakata sa željenim sadržajem skopoletina, bez tragova konvencionalnih organskih otapala i prema tomu izravno upotrebljivih u kozmetičkoj industriji (Jokić i sur., 2016). Ekstraktibilnost spojeva s $ESCO_2$ ovisi o prisutnosti pojedinačnih funkcionalnih grupa u tim spojevima te njihovoj molekularnoj masi i polarnosti. Budući da je CO_2 nepolarno otapalo, najbolju učinkovitost pokazuje u ekstrakciji nepolarnih spojeva ili spojeva niže molekularne mase (Jokić, 2011). S obzirom na činjenicu da je skopoletin polaran spoj, očekivano je da će ga CO_2 ekstrakti sadržavati u nižoj koncentraciji. Stoga je uspjeh ovog istraživanja postignut izolacijom spomenutoga spoja $ESCO_2$ i u niskim koncentracijama. Ekstrakti koji sadrže skopoletin imaju značajno antibakterijsko, antifungalno (Gnonlonfin i sur., 2012; Garcia i sur., 1995), protuupalno (Jamuna i sur., 2015), antioksidativno (Jamuna i sur., 2015; Shaw i sur., 2003) bioaktivno djelovanje, a skopoletin posjeduje i mogućnost ublažavanja znakova starenja (Stiefel i sur., 2017; Nam i Kim, 2015).

S ciljem pronalaženja optimalnih ekstrakcijskih parametara za skopoletin korišten je CCRD i RSM. Pomoću navedene metode odzivnih površina i odabranoga plana pokusa pronađene su optimalne vrijednosti za dva najvažnija parametra $ESCO_2$, a to su tlak i temperatura, s ciljem postizanja najvećega prinosa ekstrakcije cvijeta smilja i najvišega sadržaja skopoletina u samim CO_2 ekstraktima (**Tablica 18**).

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 18** vidljivo je kako prinos skopoletina iz cvjetova smilja dobivenih $ESCO_2$ varira od 0,024 do 1,933 mg/100 g cvijeta smilja. Najveći prinos skopoletina dobiven je pri tlaku od 20,0 MPa i temperaturi od 40,0 °C.

Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranoga prinosa skopoletina dobivenog $ESCO_2$ iz cvijeta smilja dana je u **Tablici 21**. *p*-vrijednost ovoga regresijskog modela iznosila je 0,005, što je bio pokazatelj postojanja značajne veze između nezavisnih varijabli (tlaka i temperature) i odziva, pri čemu *p*-vrijednost nedostatka modela nije bila značajna. f-vrijednost modela iznosi 3,15, što znači da je model bio značajan. Utjecaj tlaka (X_1) pokazao je statističku značajnost na prinos skopoletina, pri čemu temperatura (X_2) nije bila značajna. Interakcija parametara pokazala je statističku značajnost utjecaja na prinos skopoletina. Kvadratni član modela $X_1^{2,}$ koji se odnosi na tlak, nije pokazao statističku značajnost, dok je X_2^2, koji se odnosi na temperaturu, pokazao statistički značajan utjecaj na prinos skopoletina. Koeficijent korelacije R^2 iznosio je 0,870 i prema tomu pokazuje slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka. Na **Slici 18** prikazan je 3D dijagram odakle je vidljivo kako je tlak bio najznačajniji ekstrakcijski parametar, pri čemu je koncentracija skopoletina značajno rasla s porastom tlaka od 7,9 do 22,1 MPa. Temperatura je imala dvostran utjecaj na ekstrakciju skopoletina u istraživanom području (35,8 − 64,2 °C). S porastom temperature od 35,8 °C do 50,0 °C vidljiv je blagi porast koncentracije skopoletina, dok je daljnji porast temperature ekstrakcije do 64,2 °C negativno utjecao na koncentraciju skopoletina.

Posljednjih godina samo se nekoliko autora bavilo izolacijom skopoletina primjenom $ESCO_2$ iz različitih biljaka. Sajfrtová i sur. (2005) ekstrahirali su skopoletin iz korijena koprive (*Urtica dioica* L.), a Tzeng i sur. (2007) iz pelina (*Artemisia annua* L.), pri čemu su koristili kootapalo etanol za potpomognutu $ESCO_2$. Tzeng i sur. (2007) i Sajfrtová i sur. (2005) primijetili su značajan utjecaj temperature i tlaka na prinos skopoletina, koji je bio 28,9 mg/100 g suhe mase za pelin i 5,8 mg/100 g suhe mase za korijen koprive. Tatke i Rajan (2014) proveli su usporedbu ekstrakcijskih tehnika: ekstrakcije po Soxhletu, ekstrakcije refluksom, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, $ESCO_2$ i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima koristeći etanol kao otapalo. Unatoč uporabi kootapala zbog nepolarnih karakteristika CO_2 kao otapala, uočili su dobivanje najnižega prinosa skopoletina $ESCO_2$. Molnar i sur. (2017) u istraživanju CO_2

ekstrakata iz šest biljaka s hercegovačkoga područja, od kojih je jedna *H. italicum*, nisu identificirali kumarine. Naime, isti su autori u istraživanju provedenom 2016. godine u ekstraktima dobivenim iz cvijeta smilja $ESCO_2$ uspješno identificirali kumarine pri istim procesnim uvjetima kao i u prethodnom radu (Jokić i sur., 2016). Potencijalno objašnjenje može biti to da je berba smilja obavljena u drugom dijelu vegetacijskoga perioda. Drugo objašnjenje može biti da biljka nije bila pod stresnim utjecajima iz okoline zbog toga što je akumulacija skopoletina povezana s otpornošću na napad mikroorganizama i druge stresove poput mehaničkih ozljeda i dehidracije (Gnonlonfin i sur., 2012). S obzirom na to da je skopoletin, derivat kumarina sa značajnim bioaktivnim djelovanjem, daljnji nastavak ovog istraživanja u tomu bi pogledu mogao biti značajan.

5.2. HIDRODESTILACIJA I SUPERKRITIČNA FLUIDNA EKSTRAKCIJA PLODA KONOPLJIKE

5.2.1. Kemijski profil eteričnog ulja ploda konopljike dobivenog hidrodestilacijom

Konopljika je biljka bogata bioaktivnim spojevima, no izolacija istih prvenstveno ovisi o dijelu biljke iz kojega se provodi ekstrakcija, izboru ekstrakcijske metode i samog otapala, procesnim parametrima ekstrakcije, kao i o njezinom zemljopisnom porijeklu. U **Tablici 24** objavljeni su podatci koji prvi put prikazuju kemijski profil eteričnog ulja ploda konopljike s područja Hercegovine.

Dobiveni prinos eteričnog ulja ploda konopljike postupkom hidrodestilacije iznosio je 0,4 %. Prinos eteričnog ulja ploda konopljike dobiven hidrodestilacijom u literaturi se kreće u iznosu 0,23 – 0,72 % (Asdadi i sur., 2015; Stojković i sur., 2011; Sarikurkcu i sur., 2009). Postupkom hidrodestilacije ukupno je ekstrahirano 27 spojeva, pri čemu su najzastupljeniji bili viridiflorol (16,7 %), *α*-humulen (15,6 %), *trans*-kariofilen (10,7 %), *trans*-*β*-farnezen (7,6 %), kariofilen oksid (7,3 %), *α*-terpinil-acetat (6,8 %), *α*-humulen oksid (5,2 %), 1,8-cineol (4,9 %), kamfor (3,3 %) i spatulenol (3,3 %).

Slični rezultati dobiveni su i u provedenim istraživanjima sljedećih autora: Asdadi i sur. (2015); Stojković i sur. (2011); Cossuta i sur. (2008); Novak i sur. (2005) i Sorensen i sur. (1999). Glavne komponente eteričnog ulja ploda konopljike u spomenutim istraživanjima bile su 1,8-cineol, sabinen, *α*-pinen, *trans*-*β*-farnezen, *β*-kariofilen oksid, *β*-kariofilen, *β*-felandren, *α*-terpinil-acetat, biciklogermakren, *α*-humulen i spatulenol.

U jedinom istraživanju dostupnom u literaturnom pregledu eteričnog ulja konopljike (Karalija i sur., 2020) iz materijala prikupljenog na plantaži u okolici Sarajeva (BiH), glavni spojevi bili su

limonen (18,2 %), *β*-pinen (17,5 %) i (*E*)-*β*-farnezen (10,1 %), pri čemu nije vidljiva sličnost sa sastavom dobivenim u ovom istraživanju. Autori ne navode dio biljke korišten za izolaciju eteričnog ulja pa to može biti jedan od razloga razlike u kemijskom profilu.

Prema istraživanju koje su proveli Stojković i sur. (2011), eterično ulje lišća, nezrelih i zrelih plodova sakupljenih na području Crne Gore bilo je bogat izvor *α*-pinena. Analizom eteričnog ulja zrelog ploda konopljike otkriven je 51 spoj, pri čemu su glavni bili 1,8-cineol, sabinen, *α*-pinen i *trans*-*β*-famezen. U eteričnom ulju nezrelih plodova identificirano je 50 spojeva, među kojima su glavni bili sabinen i 1,8-cineol.

Eterično ulje ploda konopljike s područja Budimpešte (Mađarska) dobiveno hidrodestilacijom sadržavalo je sljedeće glavne isparljive spojeve: *α*-pinen, limonen, 1,8-cineol, *β*-kariofilen, *trans*-*β*-farnezen, *α*-humulen i spatulenol (Cossuta i sur., 2008).

Novak i sur. (2005) proveli su istraživanje na zrelim i nezrelim plodovima konopljike te lišću s područja Vinagrelle (Mallorca, Španjolska). Glavni spojevi dobivenih eteričnih ulja konopljike bili su 1,8-cineol, sabinen, *α*-pinen, *β*-felandren, *α*-terpinil-acetat, *trans*-*β*-farnezen i biciklogermakren. Zaključili su kako su isti spojevi bili prisutni u svim biljnim organima, s tim da je koncentracija svih spojeva u lišću bila različita u odnosu na plodove, izuzevši *α*-terpinil-acetat i *epi*-13-manoil-oksid. Kemijski profili zrelih i nezrelih plodova bili su isti.

Prema istraživanju kojega su proveli Sorensen i sur. (1999), glavni spojevi u istraživanom eteričnom ulju ploda konopljike s Krete (Grčka) bili su 1,8-cineol, sabinen, *α*-pinen, *β*-farnezen, *β*-kariofilen oksid i *β*-kariofilen. Ostali spojevi bili su prisutni u nižim koncentracijama, kao npr. *β*-sitosterol čija prisutnost može biti posljedica zemljopisnih uvjeta i klime. Utvrđeno je kako je kvantitativni sastav eteričnog ulja ploda konopljike s područja Krete sličan eteričnom ulju s područja bivše Jugoslavije (Sorensen i sur., 1999). U usporedbi s egipatskim eteričnim uljem, najzanimljivija je razlika prisutnosti *α*-kadinena i *β*-kadinena. Također, spojevi koji nisu otkriveni u kretskim istraživanjima pronađeni su u egipatskom eteričnom ulju. Glavna komponenta egipatskog eteričnog ulja ploda konopljike bio je *α*-terpineol. Usporedbom eteričnog ulja s ruskog i kretskog područja moguće je uočiti razliku u prisutnosti sadržaja *α*- i *β*-pinena i limonena. Njihove koncentracije visoko su prisutne u ruskom eteričnom ulju.

Fitokemijska analiza eteričnog ulja ploda konopljike s područja Amazone pokazala je nekoliko glavnih spojeva: 1,8-cineol, (*E*) -*β*-farnezenen, sabinen, *α*-pinen, *α*-terpinil-acetat, *β*-kariofilen i biciklogermakren (Zoghbi i sur., 1999).

Analiza eteričnog ulja ploda konopljike iz Manise u Turskoj rezultirala je otkrivanjem 27 spojeva, pri čemu su glavni bili 1,8-cineol, sabinen, *α*-pinen, *α*-terpinil-acetat i (*Z*)-*β*-farnezen (Sarikurkcu i sur., 2009). Iz plodova konopljike prikupljenih u Švicarskoj (Romanshorn) izoliran

je jedan novi diterpen, 6*β*,7*β*-diacetoksi-13-hidroksi-labda-8,14-dien, kao i dva poznata diterpena, rotundifuran i viteksilakton (Hoberg i sur., 1999).

Uzimajući u obzir kemijski profil eteričnog ulja dobivenog iz različitih dijelova konopljike, čini se kako su *α*-pinen i 1,8-cineol bili značajno prisutni u svim dijelovima biljke. Može se pretpostaviti kako su svi spojevi uključeni u antioksidativnu aktivnost (Katiraee i sur., 2015).

Eterično ulje ploda konopljike pokazalo je djelotvornost u borbi protiv raznih vrsta gljivica, tako da svoju uporabu opravdano pronalazi u tradicionalnoj medicini. Zbog svoje značajne antimikrobne aktivnosti, primjenu bi moglo pronaći i u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, pri čemu je dokazano da spojevi poput sabinena, *β*-sitosterola i *α*-pinena djeluju antifungalno, antimikrobno i repelentno (Katiraee i sur., 2015; Meena i sur., 2010; Arokiyaraj i sur., 2009; Dorman i Deans, 2000).

5.2.2. Kemijski profili CO_2 ekstrakata ploda konopljike

Znanstveni doprinos provedenih istraživanja u ovom radu bio je potaknut ograničenim brojem dostupnih literaturnih podataka koji su se bavili SFE-om ploda konopljike (Mele i sur., 2013; Marongiu i sur., 2010; Cossuta i sur., 2008). Stoga se istražio utjecaj procesnih parametara $ESCO_2$ na prinos ekstrakcije pri čemu su u samim ekstraktima identificirana četiri najzastupljenija isparljiva spoja iz ploda konopljike: 1,8-cineol (2,6 – 12,2 %), *α*-terpinil-acetat (7,1 – 13,5 %), *trans*-kariofilen (14,2 – 16,2 %) i *trans*-*β*-farnezen (14,8 – 19,8 %). Osim glavnih spojeva, drugi seskviterpeni prisutni u višoj koncentraciji u dobivenim ekstraktima bili su aromadendren (3,7 – 4,6 %), kariofilen oksid (3,2 – 4,5 %), viridiflorol (2,1 – 3,9 %), *α*-kadinol (3,3 – 6,7 %) i spatulenol (2,1 – 6,9 %).

Za optimizaciju najvažnijih procesnih varijabli $ESCO_2$, tlaka i temperature, a kako bi se postigao najveći prinos ekstrakata ploda konopljike te dobio najviši udio četiri glavna isparljiva spoja (1,8-cineol, *α*-terpinil-acetat, *trans*-kariofilen i *trans*-*β*-farnezen), korišten je CCRD prikazan u **Tablici 25**. Provedbom višestruke polinomne regresije s ciljem pronalaska konstanti modela i koeficijenata regresije, svaki je odgovor (y) ocijenjen funkcijom glavnih, kvadratnih i interakcijskih učinaka tlaka ekstrakcije (X_1) i temperature ekstrakcije (X_2). Rezultati u **Tablici 27** pokazali su da je dobiveni model (**8**) za prinos ekstrakcije značajan ($p \leq 0{,}05$), s visokim R^2 (0,959). Što je vrijednost R^2 bliža vrijednosti 1, to se empirijski model više prilagođava stvarnim podatcima. f-vrijednost nedostatka modela za prinos ekstrakcije iznosila je 4,12, što je pokazatelj toga da nedostatak modela nije statistički značajan. Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugoga reda na prinos ekstrakcije u **Tablici 27** pokazali su da je utjecaj tlaka (X_1) bio iznimno značajan ($p < 0{,}0001$). Kvadratni član tlaka (X_1^2) također je pokazao statističku značajnost ($p < 0{,}05$), dok utjecaj temperature (X_2^2) nije bio značajan. Kvadratni

član temperature i interakcija između tlaka i temperature (X_1X_2) također nisu statistički značajno utjecali na prinos ekstrakcije ploda konopljike.

Usporedbom prinosa dviju ekstrakcijskih metoda vidljiva je značajna razlika (poglavlje 4.2.3 i 4.2.5). Dobiveni prinos eteričnog ulja ploda konopljike postupkom hidrodestilacije iznosio je 0,4 %, dok podatci u **Tablici 25** pokazuju značajno variranje kako prinosa ekstrakcije plodova konopljike od 1,2 do 9,7 % prema primijenjenim procesnim parametrima. Cossuta i sur. (2008) također su izvijestili o višim prinosima (do 6,57 g/100 g) ekstrakata ploda konopljike pri višim tlakovima, dok su najniži prinos dobili pri tlaku od 10 MPa. Mele i sur. (2013) u svom su istraživanju za tri veličine čestica (< 0,3 mm, 0,3 − 0,8 mm i 3 –3,2 mm) dobili prinose ekstrakcije od 4,9 %, 4,1 % i 2,8 %. Veličina čestice u ovom radu tijekom $ESCO_2$ bila je konstantna i iznosila je 0,356 mm (poglavlje 4.2.1).

Utjecaj tlaka bio je statistički značajan za sva četiri glavna ekstrahirana spoja (1,8-cineol, *α*-terpinil-acetat, *trans*-kariofilen i *trans-β*-farnezen), što je prikazano **u Tablicama 28, 29, 30 i 31,** dok je kvadratni član tlaka (X_1^2) bio statistički značajan za udio 1,8-cineola i *trans-β*-farnezena. R^2 za glavne spojeve kretao se od 0,655 do 0,795. Izuzetno značajan utjecaj tlaka na iskorištenje $ESCO_2$ konopljike vidljiv je na **Slici 19**. U istraživanom području, s porastom tlaka značajno je rastao i prinos ekstrakcije. Temperatura nije imala značajnog utjecaja, ali se iz grafova ipak može zaključiti kako je s porastom temperature u istraživanom području (35,8 – 64,1 °C) iskorištenje neznatno raslo. Sličan utjecaj tlaka i temperature na prinos ekstrakcije objavili su i Cossuta i sur. (2008), gdje su prikazali značajno povećan prinos u rasponu 10,0 – 27,5 MPa.

Ekstrakti dobiveni $ESCO_2$ pod različitim tlakovima (8,4 MPa, 12,5 MPa, 22,5 MPa, 32,5 MPa i 36,6 MPa) i temperaturama od 35,8 °C, 40,0 °C, 50,0 °C, 60,0 °C i 64,1 °C karakterizirani su GC-MS analizom, a rezultati su predstavljeni u **Tablici 26**. Korištena temperatura ekstrakcije od 35,8 °C malo je iznad kritične temperature otapala CO_2 (31,1 °C). Odabrana donja granica za tlak iznosila je 8,4 MPa (malo iznad kritičnoga tlaka otapala CO_2), dok je gornja granica temperature od 64,1 °C, kao i kod smilja, bila dovoljno niska kako bi se izbjegle promjene termolabilnih spojeva (Jokić i sur., 2016).

Različiti parametri tlaka i temperature tijekom $ESCO_2$ utjecali su na izolaciju brojnih spojeva u dobivenim ekstraktima. Relativno niski tlakovi (8,4 MPa i 12,5 MPa) bili su dovoljni za ekstrakciju glavnih isparljivih spojeva, kao i manje važnih monoterpena i seskviterpena iz plodova konopljike (**Tablica 26**). Dobro je poznato da s porastom tlaka rastu i gustoća CO_2 i topljivost spojeva. Osim topljivosti, važnu ulogu u ekstrakciji ima i prijenos tvari (Jokić i sur., 2012). Usporedbom dva glavna spoja 1,8-cineola (4,2 % – 8,0 %) i biciklogermakrena (8,5 %

– 11,6 %) u dobivenim je ekstraktima s povećanjem tlaka s 8,4 MPa na 36,6 MPa pri 50 °C vidljivo povećanja prinosa ekstrakcije. Isti trend primijećen je kod nekoliko manje važnih spojeva kao što su viridiflorol, kariofilen oksid, kadinol i spatulenol. Ovaj zaključak je donesen u skladu s istraživanjima drugih autora (Moldão-Martins i sur., 2000) o većoj zastupljenosti oksidiranih seskviterpena u ekstraktima dobivenim $ESCO_2$ pri povišenim tlakovima. Međutim, udjeli ostalih glavnih spojeva poput *α*-terpinil-acetata, *trans*-kariofilena i *trans*-*β*-farnezena varirali su u ekstraktima pri različitim tlakovima uz konstantnu temperaturu od 50 °C. Utjecaj procesnih parametara $ESCO_2$ na udio 1,8-cineola vidljiv je na **Slici 20**. S porastom tlaka od 8,4 do 27,5 MPa rastao je i udio 1,8-cineola, dok daljnji porast tlaka do 36,6 MPa nije značajno utjecao na njegov udio. Porast temperature od 35,8 do 50,0 °C nije značajno utjecao na udio 1,8-cineola, dok je daljnji porast temperature do 64,1 °C uzrokovao pad udjela 1,8-cineola. Utjecaj procesnih parametara $ESCO_2$ na udio *α*-terpinil-acetata u plodu konopljike vidljiv je na **Slici 21**. U slučaju *α*-terpinil-acetata, tlak je imao negativan utjecaj te je vidljiv pad udjela ovoga spoja s porastom tlaka od 8,36 do 23,0 MPa, a daljnji porast tlaka nije značajno utjecao na njegov udio. Porast temperature također nije utjecao na njegov udio u istraživanom području (35,8 − 64,1 °C). Slični su zaključci dobiveni kod Moldão-Martins i sur. (2000) koji su opisali smanjenje sadržaja monoterpena pri povećanju tlaka.

Utjecaj temperature na ekstrakciju $ESCO_2$ teže je predvidjeti s obzirom na činjenicu da povećanjem temperature pri višim tlakovima dolazi do smanjenja gustoće CO_2, a što dalje posljedično dovodi do smanjenja snage otapala za ekstrakciju ciljane tvari. No s druge strane, porast temperature povećava tlak pare spoja. To je posljedica toga što je na višim tlakovima povećanje tlaka pare spoja veće u odnosu na smanjenje gustoće superkritičnog fluida pri povećanju temperature. Iz toga se može zaključiti da povećanje temperature pri višim tlakovima ima povoljan utjecaj na proces ekstrakcije, odnosno povećanje topljivosti spojeva (Jokić i sur., 2012). Kao posljedica toga fenomena, topljivost otopljene tvari vjerojatno će se smanjivati, održavati konstantnom ili povećavati s povišenjem temperature pri konstantnom tlaku, a ovisit će o tomu je li gustoća otapala ili tlak pare otopljene tvari prevladavajući. Ponašanje dvaju glavnih seskviterpena *trans*-kariofilena (**Slika 22**) i *trans*-*β*-farnezena (**Slika 23**) bilo je prilično slično. Utjecaj procesnih parametara $ESCO_2$ na udio *trans*-kariofilena prikazan je 3D dijagramom (**Slika 22**), iz kojega je vidljiv negativan utjecaj tlaka u području od 8,4 MPa do 23,0 MPa, nakon čega daljnji porast tlaka nije značajno utjecao na njegov udio. Također, porast temperature nije značajno utjecao na udio *trans*-kariofilena u cijelom istraživanom području (35,8 – 64,1 °C). Sličan trend primijećen je i kod *trans*-*β*-farnezena gdje je utjecaj procesnih parametara $ESCO_2$ na njegov udio u plodu konopljike vidljiv na **Slici 23**. Tlak je i u ovom slučaju imao negativan utjecaj te je vidljiv pad udjela ovoga spoja s porastom tlaka od 8,4 do 23,0 MPa, dok daljnji porast tlaka do 36,6 MPa nije značajno utjecao na njegov

udio. Porast temperature, kao i u slučaju *trans*-kariofilena, nije utjecao na udio *trans*-*β*-farnezena na cijelom istraživanom području (35,8 – 64,1 °C).

Optimalni parametri $ESCO_2$ dobiveni su pri 32,5 MPa i 60,0 °C. Provjera i valjanost generiranog matematičkog modela provedena je ekstrakcijom u tim optimalnim uvjetima. Usporedba eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti prikazana je u **Tablici 33**, odakle je vidljivo blisko podudaranje dobivenih eksperimentalnih i predviđenih podataka prinosa ekstrakcije i udjela četiri najzastupljenija spoja (1,8-cineol, *α*-terpinil-acetat, *trans*-kariofilen i *trans*-*β*-farnezen).

Marongiu i sur. (2010) istraživali su izolaciju isparljivih spojeva konopljike koristeći $ESCO_2$ s područja Sardinije (Italija), ali samo pri tlaku od 9 MPa i temperaturi od 40 °C. Istraživanje autora Cossuta i sur. (2008) bilo je usmjereno na određivanje optimalnih uvjeta za ekstrakciju $ESCO_2$ ploda konopljike s mađarskoga podneblja. Procesni parametri također su definirani s ciljem postizanja maksimalnoga prinosa ekstrakcije (10 – 45 MPa i 40 – 60 °C), međutim izolirali su različite vrste spojeva u odnosu na istraživanje provedeno u ovom radu: diterpen rotundifuran, *β*-amirin i *β*-sitosterol (TLC-om i denzitometrijom), te flavonoidni kasticin (HPLC-om). Dobiveni prinosi mijenjali su se između 1,9 i 65,7 g/kg, a sve to prema snazi superkritičnog otapala. Prinos navedenih spojeva bio je 0,06 – 1,06 rotundifurana, 0,02 – 1,08 sitosterola, 0,04 – 0,63 amirina, 0,87 – 2,71 kasticina (g/kg suhoga materijala). Eksperimenti provedeni pri 45 MPa i 45 °C odabrani su kao najbolji uvjeti rada. Mele i sur. (2013) ispitali su mogućnost ekstrakcije rotundifurana iz ploda konopljike s tekućim CO_2 u aparaturi po Jennyngsu. Zaključili kako je ova vrsta ekstrakcije vrlo selektivna prema ovom spoju, jednom od diterpena odgovornih za dopaminergičnu aktivnost.

U rezultatima ovog istraživanja prikazanim u poglavlju 4.2.4. i 4.2.6. utvrđene su značajne razlike u sastavu eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom i isparljivih spojeva ekstrakata dobivenih primjenom $ESCO_2$, što je bilo i očekivano. Viridiflorol je pronađen kao glavni spoj eteričnog ulja (17,9 %), dok je u CO_2 ekstraktima bio prisutan u značajno nižoj koncentraciji (2,1 – 4,2 %). *α*-humulen oksid bio je prisutan samo u eteričnom ulju (5,2 %).

Ovi rezultati ukazuju na to da se α-humulen oksid i viridiflorol mogu smatrati artefaktima nastalim tijekom hidrodestilacije iz odgovarajućih seskviterpenskih ugljikovodika (*α*-humulena i biciklogermakrena), takoder pronađenih među glavnim spojevima CO_2 ekstrakata, ali u nižoj koncentraciji u eteričnom ulju. *α*-humulen dominirao je u eteričnom ulju (15,6 %), pri čemu je vjerojatno nastao od *trans*-kariofilena ili *trans*-*β*-farnezena čiji su udjeli bili niži u eteričnom ulju (10,7 %; 7,6 %) u usporedbi s ekstraktima. Udjeli oksidiranih seskviterpena kariofilen oksida i spatulenola također su bili povišeni u eteričnom ulju, kao i udjeli bornil-acetata. *β*-tujon (1,9

%), *α*-tujon (1,0 %), kamfor (3,3 %) i borneol (3,0 %) pronađeni su samo u eteričnom ulju. Budući da je postotak monoterpena 1,8-cineola bio niži (4,9 %) u usporedbi s ekstraktima (7,6 – 12,2 %) na tlakovima od 22,5 MPa i više moguće je kako su svi ti monoterpeni nastali tijekom hidrodestilacije. Zaključno, eksperimentalni dokazi potvrđuju kako se primjenom $ESCO_2$ može prevenirati razgradnja termolabilnih spojeva.

Primjenom RSM-a u ovom radu dobiveni su optimalni uvjeti za $ESCO_2$ ploda konopljike te su glavni isparljivi spojevi ekstrakata karakterizirani GC-MS analizom bili seskviterpenski ugljikovodici: *trans*-*β*-farnezen (15,6 – 23,4 %), *trans*-kariofilen (13,6 – 18,6 %) i biciklogermakren (8,5 – 11,6 %), zajedno s oksigeniranim monoterpenima *α*-terpinil-acetatom (7,6 – 13,5 %) i 1,8-cineolom (2,6 – 12,2 %). Takav poseban sastav bioaktivnih spojeva u svim dobivenim ekstraktima $ESCO_2$ plodova konopljike mogao bi biti atraktivan farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

trans-*β*-farnezen posjeduje širok spektar važnih bioloških aktivnosti poput antibakterijskog, antifungalnog, antiradikalnog te antikancerogenog djelovanja (Marongiu i sur., 2010; Sarikurkcu i sur., 2009). Insekticidno, antibakterijsko, anestetsko, antikancerogeno i protuupalno bioaktivno djelovanja pripisuje se *trans*-kariofilenu (Leandro i sur., 2012). 1,8-cineol posjeduje umjerena antioksidativna i citotoksična svojstva te je važan analgetik. Pored toga, posjeduje i antitumorsku aktivnost (Asdadi i sur., 2003), dok je *α*-terpinil-acetat pokazao jaku repelentnu aktivnost (Liu i sur., 2013).

Navedena bioaktivna djelovanja ekstrahiranih spojeva iz ploda konopljike izazivaju posebno zanimanje farmaceutske industrije s obzirom na to da imaju potencijal zamijeniti dosad primjenjivanu farmakološku terapiju, posebno za pojedince koji ne ispunjavaju uvjete za klasičnu farmakoterapiju (Souto i sur., 2020). Potrebno je napomenuti kako postoji potreba za sveobuhvatnijim kliničkim ispitivanjem tijekom dužega perioda kako bi se donijeli konačni zaključci o raznim učincima i posljedicama dugotrajne konzumacije ekstrakata ploda konopljike.

Prethodno navedeni radovi drugih autora fokusirali su se na izolaciju samo određenih spojeva ili na ispitivanje utjecaja točno definiranoga tlaka i temperature za $ESCO_2$. Literaturnim pregledom uočeno je da nigdje u literaturi nije prikazan kompletan kemijski profil isparljivih spojeva ploda konopljike s područja Hercegovine dobiven $ESCO_2$ što rezultati ovog istraživanja upravo prikazuju.

5.2.3. Utjecaj povećanja udjela vlage na prinos i kemijski profil CO_2 ekstrakata ploda konopljike

Povećanje prinosa ekstrakcije iz biljnoga materijala raste s povećanjem vlažnosti u biljnom materijalu i može biti povezano sa sljedećim fenomenima: a) topljivost vode u superkritičnoj fazi pojačava topljivost otopljene tvari i/ili b) bubrenje biljnoga tkiva vodom utječe na unutarnji otpor ili prijenos čvrste mase i kretanje otopljene tvari na površinu čestica (Balachandran i sur., 2006). S obzirom na to da do sada nema znanstvenih podataka o utjecaju tlaka, temperature i vlaženja na prinos $ESCO_2$ ploda konopljike, određeni su kemijski profili ekstrakata ploda konopljike primjenom GC-MS-a.

Početni udio vlage u uzorku ploda konopljike u ovom radu iznosio je 11,2 % (poglavlje 4.2.2.). S ciljem ispitivanja utjecaja udjela vlažnosti na ekstrakciju $ESCO_2$, jedan uzorak ploda konopljike navlažen je vodom nakon čega je izmjereni udio vlage iznosio 14,9 % te je proveden proces $ESCO_2$ na 50,0 °C i 22,5 MPa (središnja točka CCRD-a). Zatim je s ciljem dobivanja uzorka sa sniženim udjelom vlage uzorak osušen na udio vlage od 1,7 % i ekstrahiran pri istim uvjetima. Prinos plodova konopljike nakon 90 minuta izloženosti $ESCO_2$ kod osušenog je uzorka iznosio 5,3 %, a kod uzorka s povećanim udjelom vlage 8,8 %. Eksperimentalni rezultati pokazali su da je biljni materijal s povećanim udjelom vlage imao veći prinos ekstrakcije pri istom tlaku i temperaturi, što je bilo za očekivati.

U **Tablici 32** dani su rezultati GC-MS analiza dvaju ekstrakata ploda konopljike − sušenog i ploda konopljike prethodno navlaženog vodom. Vidljivo je da je u ekstraktu iz prethodno navlaženog uzorka ploda konopljike dominirao *trans*-*β*-farnezen u odnosu na suhi uzorak. Udio *α*-terpinil-acetata i *α*-terpineola bio je također viši u ekstraktu iz prethodno navlaženoga ploda. S druge strane, udjeli oksidiranih seskviterpena spatulenola, kariofilen oksida, viridiflorola i *α*-kadinola bili su niži u odnosu na osušeni ekstrakt.

Ivanović i sur. (2011a) također su pokazali da veći udio vode utječe na povećanje prinosa ekstrakcije, što su autori objasnili kao rezultat veće pogonske sile. Daljnji primjeri utjecaja vlaženja materijala prije $ESCO_2$ opisani su u istraživanju autora Nguyen i sur. (1991) i Mehr i sur. (1996), gdje je uočeno povećanja prinosa CO_2 ekstrakta vanilije iz zrna vanilije, odnosno kofeina iz sjemenki guarane.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih na **cvijetu smilja** u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. GC-MS analizom okarakteriziran je kemijski sastav eteričnog ulja smilja *H. italicum* subsp. *Italicum*, prikupljenog iz plantažnog uzgoja na području Hercegovine. Profil eteričnog ulja smilja dobiven procesom hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru sadržavao je najzastupljenije seskviterpenske spojeve: *γ*-kurkumen (23,2 %), *β*-selinen (9,9 %) i *α*-selinen (6,7 %), dok su među monoterpenima najzastupljeniji bili *α*-pinen (13,7 %) i limonen (3,1 %). Pored navedenih spojeva, GC-MS profil eteričnog ulja sadržavao je i veće udjele neril-acetata (5,4 %) i italicena (4,5 %), što mu daje visoku kvalitetu i zemljopisnu prepoznatljivost.

2. Prinos eteričnog ulja procesom hidrodestilacije iznosio je 0,3 %, dok je $ESCO_2$ dala značajno više prinose ekstrakata u rasponu od 0,6 do 4,8 % (u ovisnosti o primijenjenom tlaku i temperaturi). Optimalni uvjeti za najviši prinos ekstrakcije postignuti su pri tlaku od 22,1 MPa i temperaturi od 50,0 °C. Tlak je pokazao statistički najznačajniji utjecaj na prinos (p = 0,004).

3. Dobiveni CO_2 ekstrakti cvijeta smilja karakterizirani su GC-MS-om pri čemu je identificiran ukupno 51 spoj. Broj identificiranih spojeva u provedenim ekstrakcijama ovisio je o primijenjenom tlaku (pri 7,9 MPa identificirano je 27 spojeva, pri 15,0 MPa 48 spojeva i pri 22,07 MPa 29 spojeva). Kao glavni spojevi u svim dobivenim ekstraktima istaknuli su se derivati tremetona: 12-hidroksitretmeton (bitalin A; 6,1 – 23,0 %), 12-acetoksitretmeton (3,7 – 13,3 %), 1-[2-(3-hidroksi-2-(1-hidroksiprop-1-en-2-il)-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon (gnafaliol; 2,4 – 2,9 %), 1-[2-(2-metil-2,3-dihidroksipropil)-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon (17,2 – 20,4 %), izobutil-bitalin A (4,1 – 6,5 %) i 1-[2-(acetilprop-1-en-2-il)-3-hidroksi-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]etanon (6,7 – 10,3 %). Dobiveni ekstrakti sadržavali su i manji udio mono- i seskviterpena poput *ar*-kurkumena (0,4 – 5,0 %), 7-*epi*-amiteola (0,2 – 1,3 %), *α*-selinena (0,2 – 1,2 %), *trans*-kariofilena (0,2 – 0,8 %), neril-acetata (0,1 – 0,4 %), italicena (0,1 – 0,3 %) ili *α*-kopaena (0,1 – 0,3 %).

4. Optimizacijom dva najznačajnija procesna parametra tijekom $ESCO_2$, tlaka i temperature, dokazano je da je iz cvijeta smilja moguće dobiti i značajan udio skopoletina. Skopoletin je spoj sa značajnim bioaktivnim djelovanjem i upravo $ESCO_2$ pruža novi i ekološki način dobivanja biljnih ekstrakata sa željenim sadržajem skopoletina, što ih čini superiornijim u odnosu na ekstrakte dobivene klasičnim ekstrakcijskim metodama korištenjem organskih otapala.

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih na **plodu konopljike** u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Kemijski sastav eteričnog ulja ploda konopljike sadržavao je 27 spojeva, pri čemu su najzastupljeniji bili viridiflorol (16,7 %); *α*-humulen (15,6 %); *trans*-kariofilen (10,7 %); *trans-β*-farnezen (7,6 %); kariofilen oksid (7,3 %); *α*-terpinil-acetat (6,8 %); *α*-humulen oksid (5,2 %); 1,8-cineol (4,9 %); kamfor (3,3 %) i spatulenol (3,3 %).

2. Prinos eteričnog ulja procesom hidrodestilacije iznosio je 0,4 %, dok je $ESCO_2$ ostvaren viši prinos u rasponu od 1,2 do 9,7 % (u ovisnosti o primijenjenom tlaku i temperaturi). Optimalni uvjeti $ESCO_2$ za najviši prinos ekstrakcije ploda konopljike te najveći udio četiri glavna spoja bili su tlak od 32,5 MPa i temperatura od 60,0 °C. Tlak je pokazao izniman statistički značaj na prinos ekstrakcije (p = 0,0001).

3. Utjecaj tlaka na prinos četiri glavna spoja bio je dvostran. Primijećen je značajan utjecaj na prinos 1,8-cineola (4,2 – 8,0 %). Isti trend vidljiv je i kod nekoliko manje zastupljenih spojeva kao što su viridiflorol, kariofilen oksid, kadinol i spatulenol. U slučaju *α*-terpinil-acetata, *trans*-kariofilena i *trans-β*-farnezena tlak je imao negativan utjecaj te je vidljiv pad udjela ovih spojeva porastom tlaka.

4. Dobiveni CO_2 ekstrakti ploda konopljike sadržavali su dominantno seskviterpenske ugljikovodike: *trans-β*-farnezen (15,6 – 23,4 %), *trans*-kariofilen (13,6 – 18,6%) i biciklogermakren (8,5 – 11,6 %), zajedno s oksidiranim monoterpenima *α*-terpinil-acetatom (7,6 – 13,5 %) i 1,8-cineolom (2,6 – 12,2 %). Takav poseban sastav bioaktivnih spojeva u svim dobivenim ekstraktima $ESCO_2$ plodova konopljike mogao bi biti atraktivan farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

5. Eksperimentalni rezultati pokazali su da je vlaženje ploda konopljike prije $ESCO_2$ imalo utjecaj na povišenje prinosa ekstrakcije pri istom tlaku i temperaturi. U dobivenom CO_2 ekstraktu dominirao je *trans-β*-farnezen u odnosu na suhi uzorak. Udio *α*-terpinil-acetata bio je također viši u ekstraktu iz prethodno navlaženoga ploda. S druge strane, udjeli oksidiranih seskviterpena spatulenola, kariofilen oksida, viridiflorola i *α*-kadinola bili su niži u odnosu na osušeni ekstrakt.

6. Premda CO_2 ekstrakti nisu novost, razvoj tehnologije u XXI. stoljeću te rezultati ispitivanja kemijskoga profila ekstrakata dobivenih $ESCO_2$ iz cvijeta smilja i ploda konopljike mogli bi potaknuti njihovu uspješnu primjenu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

7. LITERATURA

Aissaoui, H.: Recherche et détermination structurale des metabolites secondaires de type flavonique d'une espèce de la famille des Verbenacées, In: Departement de chimie. Constantine: Universite mentouri constantine, faculte des sciences exactes, str. 3-6; 2010.

Aiyegoro, OA., Okon, AI.: Preliminary phytochemical screening and In vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10: 21; 2010.

Aladić, K.: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis sativa* L.) ulja superkritičnim CO_2 iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2015.

Amaral, LF., Moriel, P., Foglio, MA., Mazzola, PG.: *Caryocar brasiliense* supercritical CO_2 extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:73; 2014.

Ambrosini, A., Di Lorenzo, C., Coppola, G., Pierelli, F.: Use of *Vitex agnus-castus* in migrainous women with premenstrual syndrome: an open-label clinical observation. *Acta Neurologica Belgica*, 113: 25–29; 2013.

Andreani, S., Uehara, A., Blagojević, P., Radulović, N., Muselli, A., Baldovini, N.: Key odorants of industrially produced *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 132: 275–282; 2019.

Angioni, A., Barra, A., Arlorio, M., Coisson, JD., Russo, MT., Pirisi, FM., Satta, M., Cabras, P.: Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4): 1030-1034; 2003.

AOAC. Official methods of analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA, 2000.

Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., Fiebich, BL., Munoz, E.: Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *Journal of Natural Products*, 70(4): 608–612, 2007.

Arokiyaraj, S., Perinbam, K., Agastian, P., Kumar, RM.: Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Vitex agnus-castus*. *International Journal of Green Pharmacy*, 3(2): 162-164; 2009.

Asanova, ZhK., Suleimenov, EM., Atazhanova, GA., Dembitskii, AD., Pak, RN., Dar, A., Adekenov, SM.: Biological activity of 1,8-cineole from levant wormwood. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(1): 28-30; 2003.

Asdadi, A., Hamdouch, A., Oukacha, A., Moutaj, R., Gharby, S., Harhar, H., El Hadek, M., Chebli, B., Idrissi Hassani, LM.: Study on chemical analysis, antioxidant and *in vitro* antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(4): 118-127; 2015.

Atanasov, AG., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, EH., Rollinger, JM., Schuster, D., Breuss, JM., Bochkov, V., Mihovilovic, MD., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, VM., Stuppner, H.: Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8): 1582–1614; 2015.

Avşar, G., Yüksel, D., Emen, FM., Demirdöğen, RE., Yeşilkaynak, T., Kahrıman, L.: Supercritical carbondioxide extraction of *Lavandula Officinalis* (lavender) and *Hypericum Perforatum* (centaury) plants grown in Mersin region: Investigation of antioxidant and antibacterial activities of extracts and usage as cosmetic preservatives in creams. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 5(3): 1215-1220; 2018.

Azmir, J., Zaidul, ISM., Rahman, MM., Sharif, KM., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, MHA., Ghafoor, K., Norulaini, NAN., Omar, AKM.: Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4): 426–436; 2013.

Babović, NV., Petrović, SD.: Izolovanje antioksidanasa postupkom natkritične ekstrakcije. *Hemijska industrija*, 65(1): 79–86; 2011.

Barbulova, A., Colucci, G., Apone, F.: New Trends in Cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 2(2): 82-92; 2015.

Baş, D.; Boyacı, İH.: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3): 836–845; 2007.

Berger, D., Schaffner, W., Schrader, E., Meier, B., Brattström,. A: Efficacy of *Vitex agnus castus* L. extract Ze 440 in patients with pre-menstrual syndrome (PMS). *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 264: 150-153; 2000.

Bernhoft, A.: A brief review on bioactive compounds in plants. U: Bioactive compounds in plants: benefits and risks for man and animals. Urednik: Bernhoft A, Norveška, str. 11-17, 2010.

Bertoli, A., Conti, B., Mazzoni, V., Meini, L., Pistelli, L.: Volatile chemical composition and bioactivity of six essential oils against the stored food insect *Sitophilus zeamais* Motsch. (*Coleoptera Dryophthoridae*). *Natural Product Research*, 26(22): 2063- 2071; 2012.

Bezerra, MA., Santelli, RE., Oliveira, EP., Villar, LS., Escaleira, LA.: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5): 965-977; 2008.

Bianchini, A., Santonic, F., Paolini, J., Bernardini, A-F., Mouillot, D., Costa, J.: Partitioning the relative contributions of inorganic plant composition and soil characteristics to the quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don fil. essential oil. *Chemistry & biodiversity*, 6(7): 1014-1033; 2009.

Bianchini, A., Tomi, P., Costa, J., Bernardini, AF., Morelli, I., Flamini, G., Cioni, PL., Usai, M., Marchetti, M.: A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil. subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy). *Flavour and Fragrance Journal*,18(6): 487-491; 2003.

Bianchini, A., Tomi, P., Costa, J., Bernardini, AF.: Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. italicum essential oils from Corsica (France). *Flavour and Fragrance Journal*, 16(1): 30-34; 2001.

Bigović, DJ.: Karakterizacija suvih ekstrakata cvasti smilja, *Helichrysum plicatum* DC. i ispitivanje njihove antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti. *Doktorski rad*. Farmaceutski fakultet, Beograd, 2013.

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 Pharmaceutica*, 45(4): 517-522; 1995.

Blekić, M., Jambrak, AR., Chemat, F.: Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3(1): 32-47; 2011.

Bojanić-Rebac, M., Rebac, M.: Mediteransko i ljekovito bilje. Izdavač: MIM tisak d.o.o., Jelsa, 2014.

Bojilov, DG., Manolov, SP., Ivanov, II., Mollova, SL.: Investigation of antioxidant activity of different extracts of *Helichrysum italicum* from Bulgaria. *Journal of International Scientific Publications*, 13: 1314-7269; 2019.

Brunner, G.: Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2): 21–33; 2005.

Bubalo, CM., Vidović, S., Redovniković, IR., Jokić, S.: Green Solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(9): 1631-1639; 2015.

Bubalo, CM., Vidović, S., Redovniković, IR., Jokić, S.: New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*,109: 52-73; 2018.

Buhler, DR., Miranda, C.: Antioxidant Activities of Flavonoids. Oregon State University: The Linus Pauling Institute, 2000.

Cao, D., Liu, Z., Verwilst, P., Koo, S., Jangjili, P., Kim, JS., Lin, W.: Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors. *Chemical Reviews*, 119(21): 11550; 2019.

Chao, S., Young, G., Oberg, C., Nakaoka, K.: Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(6): 444–449; 2008.

Charles, DJ., Simon, JE.: Volatile compounds of the curry plant. *HortScience*, 26(1): 69–70; 1991.

Chen, Q., Yao, S., Huang, X., Luo, J., Wang, J., Kong, L.: Supercritical fluid extraction of *Coriandrum sativum* and subsequent separation of isocoumarins by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 117(3): 504–8; 2009.

Chinou, IB., Roussis, V., Perdetzoglou, D., Tzakou, O., Loukis, A.: Chemical and antibacterial studies of two *Helichrysum* species of Greek origin[1]. *Planta Medica*, 63(2): 181-183, 1997.

Conti, B., Canale, A., Bertoli, A., Gozzini, F., Pistelli, L.: Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 107(6): 1455-1461, 2010.

Cossuta, D., Simándi, B., Vági, E., Hohmann, J., Prechl, A., Lemberkovics, É., Kéry, Á., Keve, T.: Supercritical fluid extraction of *Vitex agnus castus* fruit. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(2): 188–194; 2008.

Costa, P., Velasco, CV., Loureiro, JM., Rodrigues, AE.: Effect of cosmetic matrices on the release and odour profiles of the supercritical CO_2 extract of *Origanum majorana* L. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(4): 364–374; 2016.

Costa, P., Loureiro, JM., Teixeira, MA., Rodrigues, AE.: Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO_2 from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 77: 680–683; 2015.

Čagalj, M., Grgić, I., Zrakić, M., Ivanković, M.: Economic evaluation (efficiency) of investment in organically grown immortelle [*Helichrysum italicum* ssp. *italicum*] in Bosnia and Herzegovina. The first report from Mediterranean. *Journal of Central European Agriculture*, 20(1): 524-541, 2019.

Daniele, C., Coon, JT., Pittler, MH., Ernst, E.: *Vitex agnus-castus*: a systematic review of adverse events. *Drug Safety*, 28: 319-332; 2005.

Deanković, L.: Konopljika i žensko zdravlje. *Diplomski rad*. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018.

Djihane, B., Wafa, N., Elkhamssa, S., Pedro, HJ., Maria, AE., Mohamed Mihoub, Z.: 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 Pharmaceutical Journal*, 25(2): 780-787; 2017.

Dogan, Y., Ugulu, I., Durkan, N., Unver, MC., Mert, HH.: Determination of some ecological characteristics and economical importance of *Vitex agnus-castus*. *EurAsian Journal of BioSciences*, 5: 10-18; 2011.

Dorman, HJD., Deans, SG.: Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2): 308–316; 2000.

Drapeau, J., Fröhler, C., Touraud, D., Kröckel, U., Geier, M., Rose, A., Kunz, W.: Repellent studies with *Aedes aegypti* mosquitoes and human olfactory tests on 19 essential oils from Corsica, France. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(4): 160–169; 2009.

Dugoua, J-J., Seely, D., Perri, D., Koren, G., Mills, E.: Safety and efficacy of chaste tree (*Vitex agnus-castus*) during pregnancy and lactation. *The Canadian Journal of Clinical Pharmacology*, 15(1): e74-79; 2008.

Ferreira, SLC., SilvaJunior, MM., Felix, CSA., da Silva, DLF., Santos, AS., Neto, JHS., de Souza, CT., Cruz Junior, RA., Souza, AS.: Multivariate optimization techniques in food analysis − A review. *Food Chemistry*, 273(1): 3-8; 2019.

Filip, S.: Ekstrakcija bosiljka (*Ocimum basilicum*, Laminaceae) ugljendioksidom u superkritičnom stanju i modelovanje ekstrakcionog sistema. *Doktorski rad*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2014.

Floc'h, F., Mauger, F., Desmurs, J-R., Gard, A., Bagneris, F.; Carlton, B.: Coumarin in plant and fruits: implication in perfumery. *Perfumer and Flavorist*, 27(2): 32−36; 2002.

Fraternale, D., Flamini, G., Ascrizzi, R.: In Vitro anticollagenase and antielastase activities of essential oil of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don. *Journal of Medicinal Food*, 22(10): 1041-1046; 2019.

Ganapaty, S., Vidyadhar, KN.: Phytoconstituents and biological activities of *Vitex*- A review. *Journal of Natural Remedies*, 5(2): 75-95; 2005.

Garcia, D., Sanier, C., Macheix, JJ., D'Auzac, J.: Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* infected by *Microcyclus ulei* (P. Henn.) V. ARX and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber tree. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47(4): 213–223; 1995.

Gismondi, A., Di Marco, G., Canini, A.: *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil: Composition and potential antineoplastic effect. *South African Journal of Botany*, 133: 222-226; 2020.

Gnonlonfin, GJB., Sanni, A., Brimer, L.: Review scopoletin – a coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1):47–56; 2012.

Grdinić, V., Kremer, D.: Ljekovite biljke i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Izdavač: Hrvatska ljekarnička komora, Zagreb, 2009.

Guinoiseau, E., Lorenzi, V., Luciani, A., Muselli, A., Costa, J., Casanova, J., Berti, L.: Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. U: Microbial pathogens and strategies for combatingthem: science, technology and education, Urednik: A. Méndez-Vilas, str. 1073-1080, 2013.

Gulin, I.: Smilje (*Helichrysum italicum*) kao izvor eteričnog ulja. *Završni rad*. Agronomski fakultet, Zagreb, 2014.

Gutiérrez-del-Río, I., Fernández, J., Lombó, F.: Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(3): 309–315; 2018.

Haïdara, K., Zamir, L., Shi, Q-W., Batist, G.: The flavonoid casticin has multiple mechanism of tumor cytotoxicity action. *Cancer Letters*, 242(2): 180–190; 2006.

Hajdú, Z., Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., Zupkó, I., Falkay, G., Cossuta, D., Máthé, I.: Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytotherapy Research*, 21(4): 391–394; 2007.

Han, X., Beaumont, C., Stevens, N.: Chemical composition analysis and in vitro biological activities of ten essential oils in human skin cells. *Biochimie Open*, 5: 1–7; 2017.

Handa, SS., Khanuja, SPS., Longo, G., Rakesh, DD.: Extraction technologies for Medicinal and Aromatic Plants, International centre for science and high technology, Str. 43, Trieste 2008.

Harborne, JB.: The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4): 335-367; 1999.

Harborne, JB.: The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry (Knjiga). Plant, Cell & Environment, 5(6): 435−436; 1982.

Hellivan, P-J.: Immortelle's sustainable resurgence: New research into the chemistry and application of this everlasting natural. *Perfumer and Flavorist*, 34(5): 34-36,38–40; 2009.

Herrando-Moraira, S., Blanco-Moreno, JM., Sáez, L., Galbany-Casals, M.: Re-evaluation of the *Helichrysum italicum* complex (Compositae: Gnaphalieae): a new species from Majorca (Balearic Islands). *Collectanea Botánica*, 35: e009; 2016.

Hossein-Rashidi, B., Nemati, M.: Effects of *Vitex agnus-castus* extract on the secretory function of pituitary-gonadal axis and pregnancy rate in patients with premature ovarian aging (POA). *Journal of Herbal Medicine*, 10: 24–30; 2017.

Houdret, J.: Ljekovito bilje: uzgoj i uporaba. Izdavač: Dušević & Kršovnik, Rijeka, 2002.

Huang, Z., Shi, X-h., Jiang, W-j.: Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250: 2-26; 2012.

Huang, ZR., Lin, YK., Fang, JY.: Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 23:14(1): 540-554; 2009.

Hussein, MAA.: Effect of *Vitex agnus-castus* extract on some physiological parameters of mice (*Mus Musculus* L.). *The Medical Journal of Basrah University*, 25(2): 57-59; 2007.

Ilhan, S.: Essential oils from *Vitex agnus castus* L. leaves induces caspase-dependent apoptosis of human multidrug-resistant lung carcinoma cells through intrinsic and extrinsic pathways. *Nutrition and Cancer*, 73(4): 694-702; 2020.

Ivanovic, J., Ristic, M., Skala, D.: Supercritical CO_2 extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO_2 density and moisture content of plant material. *The Journal of Supercritical Fluids*, 57(2): 129-136; 2011a.

Ivanović, JZ.: Kinetika i optimizacija procesa izolacije biljnih ekstrakata sa antibakterijskim dejstvom. *Doktorska disertacija*. Univerzitet u Beogradu. Tehnološko-metalurški fakultet. Beograd; 2011.

Jamuna, S., Karthika, K., Paulsamy, S., Thenmozhi, K., Kathiravan, S., Venkatesh, R.: Confertin and scopoletin from leaf and root extracts of *Hypochaeris radicata* have anti-inflammatory and antioxidant activities. *Industrial Crops Products*, 70: 221–230; 2015.

Jarry, H., Spengler, B., Wuttke, W., Christoffel, V.: In vitro assays for bioactivity-guided isolation of endocrine active compounds in *Vitex agnus castus*. *Maturitas*, 5 (S1): S26–S36; 2006.

Jerković, I., Rajić, M., Marijanović, Z., Bilić, M., Jokić, S.: Optimization of supercritical CO_2 extraction of dried *Helichrysum italicum* flowers by response surface methodology: GC-MS profiles of the extracts and essential oil. *Separation Science and Technology*, 51(18): 2925–2931; 2016.

Jerković, I.: Fitoterapeutski pripravci i spojevi s protutumorskim djelovanjem. Skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Split; 2008.

Jokić, S., Jerković, I., Rajić, M., Aladić, K., Bilić, M., Vidović, S.: SC-CO_2 extraction of *Vitex agnus-castus* L. fruits: The influence of pressure, temperature and water presoaking on the yield and GC–MS profiles of the extracts in comparison to the essential oil composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, 123: 50-57; 2017.

Jokić, S., Nagy, B., Zeković, Z., Vidović, S., Bilić, M., Velić, D., Simándi, B.: Effects of supercritical CO_2 extraction parameters on soybean oil yield. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4): 693–699; 2012.

Jokić, S., Rajić, M., Bilić, B., Molnar, M.: Supercritical extraction of scopoletin from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don flowers. *Phytochemical Analysis*, 27(5): 290-295; 2016.

Jokić, S., Vidović, S., Aladić, K.: Supercritical Fluid Extraction of Edible Oils. In Handbook on Supercritical Fluids: Fundamentals, Properties and Applications. Editors: Jane Osborne. Nova Science Publishers, Inc., NY, USA, str. 205-228; 2014.

Jokić, S.: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkritičnim CO_2. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek; 2011.

Jones, PJH., Ntanios, FY., Raeini-Sarjaz, M., Vamstone, CA.: Cholesterol lowering efficacy of a sitostanol-containing phytosterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(6): 1144–1150; 1999.

Joshi, LS., Pawar, HA.: Herbal Cosmetics and Cosmeceuticals: An Overview. *Natural Products Chemistry & Research*, 3: 1000169; 2015.

Karalija, E., Dahija, S., Parić, A., Zeljković, SC.: Phytotoxic potential of selected essential oils against *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, an invasive tree. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15: 100219; 2020.

Karasartov, BS., Kurkin, VA., Zapesochnaya, GG.: Coumarins and flavonoids of the flowers of *Helichrysum italicum*. *Chemistry of Naural Compounds*, 28(5): 504-505; 1992.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M.: Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(4):550-557; 2006.

Katiraee, F., Mahmoudi, R., Tahapour, K., Hamidian, G., Emami, SJ.: Biological Properties of *Vitex agnus-castus* essential oil (phytochemical component, antioxidant and antifungal activity). *Biotechnology and Health Sciences*, 2(2): e26797; 2015.

Kazazic, M., Djapo, M., Ademovic, E.: Antioxidant activity of water extracts of some medicinal plants from Herzegovina region. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 4(2): 85-90; 2016.

King, JW.: Supercritical fluid extraction: Present status and prospects. *Grasas y Aceites*, 53(1): 8-21; 2002.

Kladar, VN., Anačkov, GT., Rat, MM., Srđenović, BU., Grujić, NN., Šefer, EI., Božin, BN.: Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties. *Chemistry & biodiversity*, 12(3): 419-431; 2015.

Komušanac, I.: Utjecaj postupka ekstrakcije na iskorištenje i kemijski sastav eteričnog ulja konopljike (*Vitex agnus castus* L.). Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2016.

Kosović, N., Dunjić, LJ.: Some indicators of the status and possibilities to improve the collection, purchase, and processing of medicinal and aromatic plants in the region of Herzegovina - Neretva canton in the Federation of Bosnia and Herzegovina. In: Lorbach, J., FAO seminar proceedings on harvesting of non-wood forest products. Izmir, Turkey; 2000.

Kovačević, N.: Osnovi farmakognozije, 3. izdanje. Izdavač: Srpska školska naklada, Beograd, 2004.

Kozarić, Z.: Začini i aromatično bilje. Izdavač: Gospodarski list, Zagreb, 2002.

Kremer, BP.: Ljekovito bilje. Izdavač: Begen, Zagreb, 2007.

Kuruüzüm-Uz, A., Ströch, K., Demirezer, LÖ., Zeeck, A.: Glucosides from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*, 63(8): 959–964; 2003.

Kustrak, D., Kuftinec, J., Blazević, N.: The composition of the essential oil of *Vitex agnus-castus*. *Journal of Essential Oil Research*, 6(4): 341 - 344; 1994.

Lake, BG.: Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 37(4): 423-453; 1999.

Latoui, M., Aliakbarian, B., Casazza, AA., Seffen, M., Converti, A., Perego, P.: Extraction of phenolic compounds from *Vitex agnus-castus* L. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4): 748–754; 2012.

Lauritzen, C., Reuter, HD., Repges, R., Böhnert, K-J., Schmidt, U.: Treatment of premenstrual tension syndrome with *Vitex agnus castus* controlled, double-blind study versus pyridoxine. *Phytomedicine*, 4(3): 183-189; 1997.

Leandro, LM., Vargas, FS., Souza Barbosa, PCS., Neves, JKO., da Silva, JA., da Veiga-Junior, VF.: Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules*, 17(4): 3866-3889; 2012.

Leonardi, M., Ambryszewska, KE., Melai, B., Flamini, G., Cioni, PL., Parri, F., Pistelli, L.: Essential-Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany- Italy). *Chemistry and Biodiversity*, 10(3): 343-355; 2013.

Liu, XC., Li, YP., Li, HQ., Deng, ZW., Zhou, L., Liu, ZL., Du, SS.: Identification of repellent and insecticidal constituents of the essential oil of *Artemisia rupestris* L. aerial parts against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. *Molecules*, 18(9): 10733-10746; 2013.

Lourenço, SC., Moldão-Martins, M., Alves, VD.: Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22): 4132; 2019.

Luque de Castro, MD., Priego-Capote, F.: Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16): 2383–2389; 2010.

Maggio, A., Bruno, M., Guarino, R., Senatore, F., Ilardi, V.: Contribution to a taxonomic revision of the sicilian *Helichrysum* Taxa by PCA analysis of their essential oil compositions. *Chemistry and Biodiversity*, 13(2): 151–159; 2016.

Maksimovic, S., Tadic, V., Ivanovic, J., Radmanovic, T., Milanovic, S., Stankovic, M., Zizovic, I.: Utilization of the integrated process of supercritical extraction and impregnation for incorporation of *Helichrysum italicum* extract into corn starch xerogel. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly,* 24(2): 191−200; 2018.

Maksimovic, S., Tadic, V., Skala, D., Zizovic, I.: Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry*, 138: 9-28, 2017.

Maksimovic, S., Kesic, Z., Lukić, I., Milovanovic, S., Ristic, M., Skala, D.: Supercritical fluid extraction of curry flowers, sage leaves, and their mixture. *The Journal of Supercritical Fluids*, 84: 1– 12; 2013.

Mancini, E., De Martino, L., Marandino, A., Scognamiglio, MR., De Feo, V.: Chemical composition and possible in vitro phytotoxic activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. *Molecules*, 16(9): 7725-7735; 2011.

Mari, A., Napolitano, A., Masullo, M., Pizza, C., Piacente, S.: Identification and quantitative determination of the polar constituentsin *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 96: 249–255; 2014.

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. *Journal of Essential Oil Research*, 15:2: 120-126; 2003.

Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Gonçalves, JM., Salgueiro, L., Maxia, A., Lai, R.: Extraction, separation and isolation of volatiles from *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) wild species of Sardinia, Italy, by supercritical CO_2. *Natural Product Research*, 24(6): 569–579; 2010.

Marongiu, B., Piras Porcedda, S.: Comparative analysis of the oil and supercritical CO_2 extract of *Artemisia arborescens* L. and *Helichrysum splendidum* (Thunb.) Less. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 20(5): 421-428, 2006.

Marto, J., Gouveia, LF., Chiari, BG., Paiva, A., Isaac, V., Pinto, P., Simões, P., Almeida, AJ., Ribeiro, HM.: The green generation of sunscreens: Using coffee industrial sub-products. *Industrial Crops and Products*, 80: 93–100; 2016.

Mastelic, J., Politeo, O., Jerkovic, I., Radosevic, N.: Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chemistry of Natural Compounds*, 41: 35-40; 2005.

Mastelić, J., Politeo, O., Jerković, I.: Contribution to the analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. - determination of ester bonded acids and phenols. *Molecules*, 13(4): 795-803; 2008.

Meena, AK., Singh, U., Yadav, AK., Singh, B., Rao, MM.: Pharmacological and phytochemical evidences for the extracts from plants of the genus *Vitex*–A review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2(1): 01-09; 2010.

Meier, B., Allemann, C., Kreuter, MH.: *Vitex agnus-castus* and the way or the drug to the clinical approved herbal medicinal product. Zeller AG Herbal Medicinal Product, Romanshorn, Switzerland, 2008.

Mekinić, IG., Skroza, D., Ljubenkov, I., Katalinić, V.: Insight into the presence of stilbenes in medicinal plants traditionally used in Croatian folk medicine. *Natural Product Communications*, 11(6): 833–835; 2016.

Melander, L.: Chaper 2 - Success factors for environmentally sustainable product innovation. *Innovation Strategies in Environmental Science*, 4: 33–67; 2020.

Mele, A., Lentz, H., Mele, A., Feizlmayr, E., Abazi, S., Bauer, R.: Extraction of rotundifuran and casticin from chaste tree fruits by near critical liquid carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 79: 123–126; 2013.

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. *Industrial Crops and Products*, 80: 242-250; 2016.

Mellou, F., Varvaresou, A., Papageorgiou, S.: Renewable sources: applications in personal care formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 41(6): 517-525; 2019.

Meyer-Warnod, B.: Natural essential oils: Extraction processes and application to some major oils. *Perfumer and Flavorist*, 9(2): 93-104, 1984.

Mićić, V., Jotanović, M., Lepojević, Ž., Aleksić, V., Pejović, B.: Pressure influence to extraction system *Helichrysum Italicum* – supercritical carbon dioxide. *Journal of Engineering & Processing Management*, 1(2): 26-31; 2009.

Milou, Y., Fontes, K., Tourel, C.: Cosmetic Composition comprising an essential oil, extracted from *Helichrysum italicum*. Patent US766454B2, 2010.

Mitra, P., Barman, PC., Chang, KS.: Coumarin extraction from *Cuscuta reflexa* using supercritical fluid carbon dioxide and development of an artificial neural network model to predict the coumarin yield. *Food and Bioprocess Technology*, 4: 737–44; 2011.

Moldão-Martins, M., Palavra, A., Beirão da Costa, ML., Bernardo-Gil, MG.: Supercritical CO_2 extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma. *The Journal of Supercritical Fluids*, 18(1): 25– 34, 2000.

Molnar, M., Jerković, I., Suknović, D., Rajs, BB., Aladić, K., Šubarić, D., Jokić, S.: Screening of six medicinal plant extracts obtained by two conventional methods and supercritical CO_2 extraction targeted on coumarin content, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity and total phenols content. *Molecules*, 22(3): 348; 2017.

Molnar, M., Čačić, M.: Biološka aktivnost derivata kumarina – pregledni rad. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3(2): 55-64; 2011.

Momoeda, M., Sasaki, H., Tagashira, E., Ogishima, M., Takano, Y., Ochiai, K.: Efficacy and safety of *Vitex agnus-castus* extract for treatment of premenstrual syndrome in Japanese patients: A prospective, open-label study. *Advances in Therapy*, 31: 362–373; 2014.

Montgomery, DC.: Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2005.

Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Lorusso, E., Avato, P.: Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Industrial Crops and Products*, 32(3): 639-649; 2010.

Mouahid, A., Dufour, C., Badens, E.: Supercritical CO_2 extraction from endemic Corsican plants; comparison of oil composition and extraction yield with hydrodistillation method. *Journal of CO_2 Utilization*, 20: 263–273; 2017.

Mujić, I., Jokić, S.: Ekstrakcija i ekstraktori biljnih sirovina. Izdavač: Studio HS internet, Osijek, 2018.

Naczk, M., Shahidi, F.: Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5): 1523-1542; 2006.

Nam, H., Kim, M-M.: Scopoletin has a potential activity for anti-aging via autophagy in human lung fibroblasts. *Phytomedicine*, 22(3): 362–368; 2015.

Nebrigić, V., Vujanović, M., Zengin, G., Mašković, P., Radojković, M.: Uticaj sušenja na biološku aktivnost ekstrakata smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don). Zbornik radova 2 "XXV SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI", str. 383-387; 2020.

Nian-Yian, L., Peng, WL., Mohd-Setapar, SH., Idham, Z., Yunus, MAC., Muhamad, II.: Application of Rubber (*Hevea Brasiliensis*) seeds oil extracted using supercritical carbon dioxide in cosmetics. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*, 69: 55–59; 2014.

Ninčević, T., Grdiša, M., Šatović, Z., Jug-Dujaković, M.: *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. *Industrial Crops and Products*, 138: 111487; 2019.

Ninčević, T.: Genetska i biokemijska raznolikost sredozemnog smilja (*Helichrysum italicum* /Roth/ G. Don). *Doktorska disertacija*. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu; 2020.

Niroumand, MC., Heydarpour, F., Farzaei, MH.: Pharmacological and Therapeutic Effects of *Vitex agnus-castus* L.: A Review. *Pharmacognosy Reviews*, 12(23): 103-114; 2018.

Norhuda, I., Jusoff, K.: Supercritical carbon dioxide (SC-CO_2) as a clean technology for palm kernel oil extraction. *Journal of Biochemical Technology*, 1(3): 75–78; 2009.

Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, MA., Crisafi, G., Germanò, MP., Alonzo, V.: Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6): 517-520; 2001.

Nostro, A., Cannatelli, MA., Crisafi, G., Musolino, AD., Procopio, F., Alonzo, V.: Modifications of hydrophobicity, *in vitro* adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5): 423-427; 2004.

Nostro, A., Cannatelli, MA., Musolino, AD., Procopio, F., Alonzo, V.: *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 35(3): 181–184; 2001.

Novak, J., Draxler, L., Göhler, I., Franz, CM.: Essential oil composition of *Vitex agnus-castus* -comparison of accessions and different plant organs. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2): 186-192; 2005.

Odak, I., Škorić, I., Grbavac, D., Ratković, A., Šagud, I.: Alteration in the chemical composition of immortelle, silver fir and prickly juniper essential oils induced by light. *Acta Chimica Slovenica*, 66(3): 681–685; 2019.

Oliva, A., Garzoli, S., Sabatino, M., Tadić, V., Costantini, S., Ragno, R., Božović, M.: Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. *Natural Product Research*, 34(3): 445-448; 2020.

Oliveira, AL., Pozza, LNL., Santos, DN., Kamimura, ES., Vicente, E., Cabral, FA.: Supercritical extraction of coumarin from guaco (*Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*) for pharmaceutical applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 83: 65–71; 2013.

Paolini, J., Desjobert, J-M., Costa, J., Bernardini, A-F., Castellini, CB., Cioni, P-L., Flamini, G., Morelli, I.: Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(5): 805-808; 2006.

Pavlić, B.: Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije. *Doktorska disertacija*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad; 2017.

Peyron, L., Acchiardi, J., Bruni, B., Rossi, JC., Granger, R.: Composition of *Helichrysum* Essential Oils. VIII. Congres International Des Huiles Essentielles, Cannes-Grasse, 421 – 424, 1980.

Pine, SH.: Organska kemija, Izdavač: Školska knjiga, Zagreb, 1994.

Pohajda, I., Dragun, G., Visković, LP.: Smilje. Ljekovito i aromatično bilje. Savjetodavna služba, Zagreb, 2015.

Poli, F., Muzzoli, M., Sacchetti, G., Tassinato, G., Lazzarin, R., Bruni, A.: Antioxidant activity of supercritical CO_2 extracts of *Helicrysum italicum*. *Pharmaceutical Biology*, 41(5): 379-383; 2003.

Politeo, O.: Sezonske varijacije kemijskog sastava i biološka aktivnost eteričnog ulja smilja, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. *Magistarski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb; 2003.

Radojković, M.: Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Moraceae*), sastav, delovanje i primena. *Doktorska disertacija*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki Fakultet. Novi Sad; 2012.

Rajić, M., Molnar, M., Bilić, M., Jokić, S.: The impact of extraction methods on isolation of pharmacologically active compounds from *Vitex agnus-castus* - a review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 5(4):15-21; 2016.

Rani, A., Sharma, A.: The genus *Vitex*: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14): 188-198; 2013.

Redzic, S.: Wild medicinal plants and their usage in traditional human therapy (Southern Bosnia and Herzegovina, W. Balkan). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(11): 1003-1027; 2010.

Reverchon, E., De Marco, I.: Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38(2): 146-166; 2006.

Ribeiro, AS., Estanqueiro, M., Oliveira, MB., Lobo, JMS.: Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics*, 2(2): 48-65; 2015.

Ribeiro, H., Marto, J., Raposo, S., Agapito, M., Isaac, V., Chiari, BG., Lisboa, PF., Paiva, A., Barreiros, S., Simões, P.: From coffee industry waste materials to skin-friendly products with improved skin fat levels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(3): 330-336; 2013.

Rice-Evans, CA., Miller, NJ., Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7): 933-956; 1996.

Rigano, D., Formisano, C., Senatore, F., Piacente, S., Pagano, E., Capasso, R., Borrelli, F., Izzo, AA.: Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3): 901-906; 2013.

Rodrigues, RF., Tashima, AK., Pereira, RMS., Mohamed, RS., Cabral, FA.: Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43(3): 375–382; 2008.

Rosa, A., Deiana, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, MP., Appendino, G., Dessí, MA.: Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated *α*-pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions*, 165(2), 117–126; 2007.

Rossi, P-G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A., Serra, DR., Gonny, M., Bolla, J-M.: Antibacterial action of essential oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research*, 19(2): 176–182; 2007.

Sağlam, H., Pabuçcuoğlu, A., Kıvçak, B.: Antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. extracts, *Phytotherapy Research*, 21(11): 1059-1060; 2007.

Sahena, F., Zaidul, ISM,, Jinap, S., Karim, AA., Abbas, KA., Norulaini, NAN., Omar, AKM.: Application of supercritical CO_2 in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 95(2): 240–253; 2009.

Sajfrtová, M., Sovová, H., Opleta, L., Bártlová, M.: Near-critical extraction of *β*-sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. *The Jounal of Supercritical Fluids*, 35(2): 111-118; 2005.

Sala, A., Recio, MC., Giner, RM., Máñez, S., Ríos, J-L.: New acetophenone glucosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with anti- inflammatory activity. *Journal of Natural Products*, 64(10), 1360–1362; 2001.

Sala, A., Recio, MC., Schinella, GR., Máñez, S., Giner, RM., Cerdá-Nicolás, M., Ríos, J-L.: Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*, 461(1): 53–61; 2003.

Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., Mete, E.: Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10): 2479–2483; 2009.

Satta, M., Tuberoso, CIG., Angioni, A., Pirisi, FM., Cabras, P.: Analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. *Journal of Essential Oil Research*, 11(6): 711-715; 1999.

Scarborough, J.: Theophrastus on herbals and herbal remedies. *Journal of the History of Biology*, 11: 353-385; 1978.

Schellenberg, R., Zimmermann, C., Drewe, J., Hoexter, G., Zahner, C.: Dose-dependent efficacy of the *Vitex agnus castus* extract Ze 440 in patients suffering from premenstrual syndrome. *Phytomedicine*, 19(14): 1325–1331; 2012.

Schellenberg, R.: Treatment for the premenstrual syndrome with *Agnus-castus* fruit extract: prospective, randomised, placebo controlled study. *British Medical Journal*, 322: 134-137; 2001.

Schipilliti, L., Bonaccorsi, IL., Ragusa, S., Cotroneo, A., Dugo, P.: *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* oil analysis by gas chromatography – carbon isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS): a rapid method of genotype differentiation?. *Journal of Essential Oil Research*, 28(3): 193–201; 2016.

Senatore, F., Porta, GD., Reverchon, E.: Constituents of *Vitex agnus-castus* L. essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 11(3): 179–182; 1996.

Sharif, KM., Rahman, MM., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, MHA., Sahena, F., Zaidul, ISM.: Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 124: 105–116; 2014.

Shaw, CY., Chen, CH., Hsu, CC., Chen, CC., Tsai, YC.: Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. *Phytotherapy Research*, 17(7): 823–825; 2003.

Sikora, E., Michorczyk, P., Olszańska, M., Ogonowski, J.: Supercritical CO_2 extract from strawberry seeds as a valuable component of mild cleansing compositions. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(6): 574-578; 2015.

Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S.: Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji. *Hemijska industrija*, 56(5): 179–190; 2002.

Skala, D., Žižović, I., Petrović, SS.: Etarska ulja-destilacija, ekstrakcija, izbor tehnologije i kvalitet. *Hemijska industrija*, 53: 123-139; 1999.

Sorensen, JM., Katsiotis, ST.: Variation in essential oil yield and composition of Cretan *Vitex agnus- castus* L. fruits. *Journal of Essential Oil Research*, 11(5), 599-605;1999.

Souto, EB., Durazzo, A., Nazhand, A., Lucarini, M., Zaccardelli, M., Souto, SB., Silva, AM., Severino, P., Novellino, E., Santini, A.: *Vitex agnus-castus* L.: Main Features and Nutraceutical Perspectives. *Forests*, 11(7): 761; 2020.

SpecialChem — The Universal Selection Source: Cosmetics Ingredients. Available online: https://cosmetics. specialchem.com/ (Pristupljeno travanj, 2021).

Stamenic, M., Zizovic, I., Eggers, R., Jaeger, P., Heinrich, H., Rój, E., Ivanovic, J., Skala, D.: Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 52(1): 125-133; 2010.

Staver, MM., Gobin, I., Ratkaj, I., Petrovic, M., Vulinovic, A., Dinarina-Sablic, M., Broznic, D.: *In vitro* antiproliferative and antimicrobial activity of the essential oil from the flowers and leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don growing in central Dalmatia (Croatia). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21 (1): 77 – 91; 2018.

Stepanović, B., Radanović, D., Turšić, I., Nenčević, N., Ivanec, J.: „Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja.“ Izdavač Jan Spider d.o.o., Pitomača, 2009.

Stiefel, C., Schubert, T., Morlock, GE.: Bioprofiling of cosmetics with focus on streamlined coumarin analysis. *ACS Omega*, 2(8): 5242−5250; 2017.

Stojković, D., Soković, M., Glamočlija, J., Džamić, A., Ćirić, A., Ristić, M., Grubišić, D.: Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-cas*tus L. fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry*, 128(4): 1017–1022; 2011.

Stupar, M., Ljaljević-Grbić, M., Džamić, A., Unković, N., Ristić, M., Vukojević, J.: Antifungal activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae) essential oil against fungi

isolated from cultural heritage objects. *Archives of Biological Sciences*, 66(4): 1539–1545; 2014.

Šćepanović, A., Krivokapić, S., Šćepanovic, V., Živković, V., Perović, S.: Chemical constituents and biological potential of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Montenegro. *Agriculture & Forestry*, 65(2): 53-58; 2019.

Talic, S., Odak, I., Bevanda, AM., Crnjac, N., Paštar, M.: *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Herzegovina: Volatile composition, variations during seasons, total polyphenols, acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity. *Croatica Chemica Acta*, 92(1): 69-77; 2019.

Talic, S., Odak, I., Lukic, T., Brkljaca, M., Bevanda, AM., Lasic, A.: Chemodiversity of *Helichrysum Italicum* (Roth) G. Don Subsp. *Italicum* essential oils from Bosnia and Herzegovina. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(03): 2492-2502; 2021.

Tanović, N., Hadžić, S., Mićijević, A.: Kvalitativne vrednosti eteričnog ulja smilja (*Helichrysum italicum*) u odnosu na razvojnu fazu. Zbornik radova 2 “XXV SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI”; str. 383-387; 2020.

Tatke, P., Rajan, M.: Comparison of conventional and novel extraction techniques for the extraction of scopoletin from *Convolvulus pluricaulis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 48(1): 27–31; 2014.

Tiaz, L., Zeiger, E.: Secondary metabolites and plant defense. In: Plant Physiology, 4th ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, str. 283–308 (Chapter 13), 2006.

Tucker, AO., DeBaggio, T.: The encyclopedia of herbs: A comprehensive reference to herbs of flavorand fragrance. *Timber Press*, Portland; 2009.

Tucker, AO., Maciarello, MJ., Charles, DJ., Simon, JE.: Volatile leaf oil of the curry plant [*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum*] and dwarf curry plant [subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman] in the North American herb trade. *Journal of Essential Oil Research*, 9(5): 583-585; 1997.

Tundis, R., Statti, GA., Conforti, F., Bianchi, A., Agrimonti, C., Sacchetti, G., Muzzoli, M., Ballero, M., Menichini, F., Poli, F.: Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don. (Asteraceae). *Natural Product Research*, 19(4): 379-387; 2005.

Tyagi, YK., Kumar, A., Raj, HG., Vohra, P., Gupta, G., Kumari, R.: Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(4): 413–420; 2005.

Tzanova, M., Grozeva, N., Gerdzhikova, M., Atanasov, V., Terzieva, S., Prodanova, R.: Biochemical composition of essential oil of Corsican *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, introduced and cultivated in South Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24(6): 1071–1077; 2018.

Tzeng, T-C., Lin, Y-L., Jong, T-T., Chang, C-MJ.: Ethanol modified supercritical fluids extraction of scopoletin and artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 56(1): 18–24; 2007.

Uehara, A., Andreani, S., Radulović, N., Baldovini, N.: Characterization of the odorant constituents of *Helichrysum italicum* essential oil. U: Book of Abstracts.49th International Symposium on Essential Oils (ISEO 2018) 16(1): 41; Posebno izdanje; 2018.

Usai, M., Foddai, M., Bernardini, F., Muselli, A., Costa, J., Marchetti, M.: Chemical composition and variation of the essential oil of wild Sardinian *Helichrysum Italicum* G. Don subsp. *Microphyllum* (Willd.) Nym from vegetative period to post-blooming. *Journal of Essential Oil Research*, 22(5): 373-380, 2010.

Viegas, DA., Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveir, R.: *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1): 54–65; 2014.

Vogt, O., Sikora, E., Ogonowski, J.: The effect of selected supercritical CO_2 plant extract addition on user properties of shower gels. *Polish Journal of Chemical Technology*, 16(4): 51-54; 2014.

Voinchet, V., Giraud-Robert, AM.: Utilisation de l´huile essentielle d´helichryse italienne et de l´huile végétale de rose musquée aprés intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytothérapie*, 5: 67-72; 2007.

Wang, L., Weller, CL.: Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6): 300–312; 2006.

Wang, L-H., Mei, Y-H., Wang, F., Liu, X-S., Chen, Y.: A novel and efficient method combining SFE and liquid–liquid extraction for separation of coumarins from *Angelica dahurica*. *Separation and Purification Technology*, 77(3): 397–401; 2011.

Weisskopf, M., Schaffner, W., Jundt, G., Sulser, T., Wyler, S., Tullberg-Reinert, H.: A *Vitex agnus-castus* extract inhibits cell growth and induces apoptosis in prostate epithelial cell lines. *Planta Medica*, 71(10): 910-916; 2005.

Weyerstahl, P., Marschall-Weyerstahl, H., Weirauch, M., Meier, N., Manteuffel, E., Leimner, J., Scholz, S.: Isolation and synthesis of compoundsJium the essential oil of *Helichysum italicum*. In: Progress in Essential Oil Reseanh. Edit., E.-J. Brunke, str. 177-195, Walter de Gruyter, Berlin 1986.

Wink, M.: Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1): 3-19; 2003.

Wołosik, K., Knaś, M., Zalewska, A., Niczyporuk, M., Przystupa, AW.: The importance and perspective of plant-based squalene in cosmetology. *Journal of Cosmetic Science*, 64(1): 59-66; 2013.

Xu, L., Zhan, X., Zeng, Z., Chen, R., Li, H., Xie, T., Wang, S.: Recent advances on supercritical fluid extraction of essential oils. *Africal Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(9): 1196-1211; 2011.

Yao, J-L., Fang, S-M., Liu, R., Oppong, MB., Liu, E-W., Fan, G-W., Zhang, H.: A Review on the terpenes from genus *Vitex*. *Molecules*, 21(9): 1179; 2016.

Zeković, Z., Vidović, S., Vladić, J., Radosavljević, R., Cvejin, A., Elgndi, MA., Pavlić, B.: Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids*, 95: 560–566; 2014.

Zeljković, ĆS., Šolić, ME., Maksimović, M.: Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. *Natural Product Research*, 29(19): 1874-1877, 2015.

Zizovic, I., Eggers, R., Heinrich, H., Jagger, P., Stamenic, M., Ivanovic, J., Skala, D.: Swelling of the plant material and SFE process optimization. in: Proceedings of the 11th Meeting on Supercritical Fluids, Barcelona, CD Proceedings #P NP 44; 2008.

Zoghbi, MGB., Andrade, EHA,, Maia, JGS.: The essential oil of *Vitex agnus-castus* L. growing in the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(4): 211–213; 1999.

Zorić, M., Ćorić, N., Jokić, S., Šubarić, D., Lončarić, M.: Prirodni dodatci prehrani kao nositelji nutritivne kvalitete, ljekovitog potencijala i održivosti proizvoda. *10. međunarodni znanstveno-stručni skup HRANOM DO ZDRAVLJA,* Osijek, str. 75 - 89; 2017.