

## **Izolácia a identifikácia silíc korenín**

MÁRIA TAKÁCSOVÁ - DANG MINH NHAT  
- NGUYEN DAC VINH - ALEXANDER PRÍBELA

**SÚHRN.** Prezентujú sa poznatky o účinných zložkách korenín. Pozornosť sa venuje izolácii silíc korenín destiláciou vodnou parou a extrakciou organickými rozpúšťadlami. Zároveň sú uvedené poznatky o zložení silíc niektorých korenín a metódy ich identifikácie. Účinné zložky korenín sa môžu uplatniť ako prírodné antioxidanty lipidov.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** koreniny, antioxidanty, silice, izolácia silíc, zloženie silíc

Koreniny sa už oddávna používajú na ochutenie jedla. Sú to produkty rastlinného pôvodu, ktoré pochádzajú z rôznych častí aromatických rastlín: z plodov (paprika, čierne korenie, kardamóm), semena (aníz, kmín, koriander, fenykel, horčica), pakoreňa alebo koreňa (zázvor), listov (petržlen, bobkový list, majorán, tymián), kôry (škorica), kvetov a kvetných častí (šafrán, klinčeky), cibule (cibuľa, cesnak) [1].

Mäkké časti rastlín používané pre korenenie nazývame bylinami a ostatné aromatické časti koreninami. Na rozdiel od bylín sú koreniny veľmi aromatické. Známe boli ich liečivé účinky, ale konzervačným účinkom (antimikrobiálny a antioxidačný účinok) sa dôkladne venovala pozornosť až v poslednom období, keďže vzniká tendencia konzumentov preferovať prírodné aditívne látky pred syntetickými aditívnymi látkami.

Výskumné práce viacerých autorov potvrdili ich vplyv na stabilitu lipidov a potraviny obsahujúce lipidy. Potvrdili tiež, že formy aplikácie korenín do potravín hrajú dôležitú úlohu, preto sa najčastejšie aplikovali koreniny vo forme silíc. Stabilizačný vplyv korenín na lipidy majú niektoré zložky korenín, ktoré je potrebné identifikovať.

---

Doc. Ing. Mária TAKÁCSOVÁ, CSc., Ing. Dang Minh NHAT, Ing. Nguyen Dac VINH, Prof. Ing. Alexander PRÍBELA, DrSc., Katedra sacharidov a konzervácie potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

## **Izolácia silíc korenín**

Silice sa získavajú mechanickým lisovaním, destiláciou s vodnou parou, extrakciou organickými rozpúšťadlami, prípadne kvapalným oxidom uhličitým.

Destilácia s vodnou parou bola použitá vo viacerých prácach o antioxidačnom účinku, ako aj o zložení silíc rôznorodých korenín.

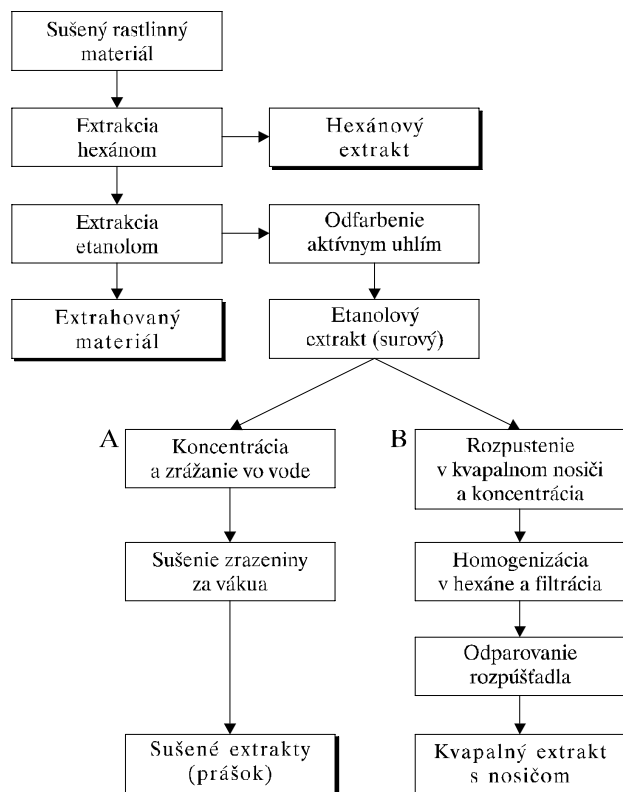
Antioxidačný účinok silíc šalvie a rozmarínu získaných destiláciou s vodnou parou dokázali viacerí autori [2,3]. Niektorí autori aplikovali silice muškátu, oregana a tymiánu, získané destiláciou s vodnou parou, do rôznych substrátov: vaječného žĺtka, kurčacej pečene, kurčacieho mäsa [4]. Všetky silice ukázali antioxidačný účinok. Skúmal sa aj antioxidačný účinok klinčeka in vivo [5]. Silica bola destilovaná s vodnou parou a ukázal sa jej ochranný účinok na nenasýtené mastné kyseliny v pečeni. Izolácia silíc destiláciou s vodnou parou bola použitá pri výskume zloženia silíc oregana, klinčeka, čierneho korenia, bobkového listu [6-9].

Pri mnohých výskumných prácach sa silice získavajú extrakciou kvapalným oxidom uhličitým. Táto technika umožňuje získať extrakt s vysokým obsahom účinných zložiek a používa sa hlavne na izoláciu silíc určených pre ďalšiu identifikáciu zložiek [3,8,10-14]. V niektorých prácach sa potvrdila aj možnosť využitia mikrovlnového zohrevu na extrakciu silíc [15].

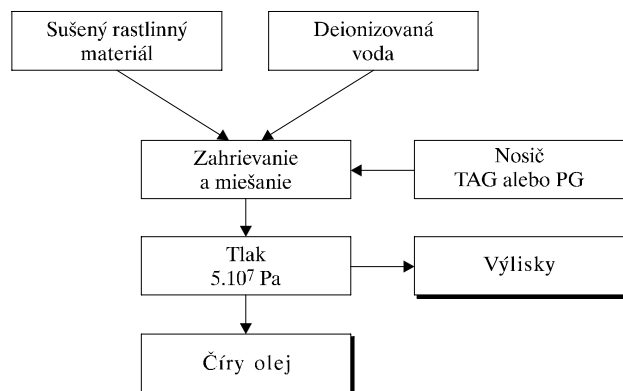
Silice bývajú najčastejšie izolované extrakciou organickými rozpúšťadlami. Tieto extrakty sa môžu aplikovať nielen v laboratórnych podmienkach, ale aj v priemysle. Extrakty korenín, hlavne rozmarínu, sú dodávané najmä vo forme práškov, pasty a kvapalín rôznych viskozít.

Pri extrakcii sa používa mnoho organických rozpúšťadiel. Zistilo sa, že rozmarín a šalvia majú silnejší antioxidačný účinok, ak sú extrahované polárnejšími rozpúšťadlami [16]. V súlade s týmto zistením sa v mnohých extrakčných procesoch široko aplikoval metanol [17-19]. Okrem metanolu sú vhodné pre extrakciu aj iné rozpúšťadlá, napr. etanol, acetón, éter a pod. [16,20-23]. Proces extrakcie antioxidantov z korenín, hlavne rozmarínu a šalvie s organickými rozpúšťadlami je schematicky uvedený na obr. 1. Proces A (obr. 1) poskytuje prášok rozmarínu takmer bez chuti, pričom proces B produkuje oranžový fluidný olej.

Pre komerčnú výrobu antioxidantov z korenín je extrakcia organickými rozpúšťadlami nevýhodná, pretože extrakčné procesy sú ekonomicky nákladné. Preto sa v poslednom čase vyvinula nová metóda na extrakciu silíc bez použitia organických rozpúšťadiel. Je to čistá mechanická extrakcia, ktorá poskytuje extrakt s vysokým obsahom antioxidantov. Jej cieľom je zjednodušenie procesu extrakcie prírodných antioxidantov, pričom sa nepou-



OBR. 1. Schéma procesu extrakcie antioxidantov organickým rozpúšťadlom [20].  
FIG. 1. The scheme of the extraction process of antioxidants with organic solvents [20].



OBR. 2. Schéma mechanickej extrakcie antioxidantov [20].  
TAG - triacylglycerol, PG - propylénglykol.  
FIG. 2. The scheme of the mechanical extraction of antioxidants [20].  
TAG - triacylglycerol, PG - propyleneglycol.

žívajú organické rozpúšťadlá. Produktom je kvapalný extrakt s vysokým obsahom antioxidantov pre priamu aplikáciu do potravín. Takýto mechanický proces vyžaduje piestový lis a kvapalný nosič ako extrahovadlo (obr. 2).

Kvapalný číry olej sa získa miešaním rastlinných materiálov s nosičom a nasledujúcim stlačením v piestovom lise. Dva hlavné nosiče sú triacylglycerol (TAG) pre lipofilné antioxidanty a propylénglykol (PG) pre hydrofilné antioxidanty. Tieto extrakty sú ľahko aplikovateľné do oleja či emulzie. Proces môže byť použitý na extrakciu antioxidantov, ktoré sa aplikujú priamo do oleja alebo tukov, niektorí autori odporúčali používať tento proces v priemysle [20,24].

### Identifikácia zložiek silíc

Koreniny obsahujú zložitú zmes rôznych organických zlúčenín v širokom koncentračnom zastúpení. Niektoré zložky sú zodpovedné za určité vlastnosti korenín (antioxidačný účinok, antibakteriálny účinok, farba, vôňa a pod.), preto je potrebná identifikácia takýchto zlúčenín.

Pretože ide o veľmi zložitú zmes mnohých zlúčenín, najvhodnejšou metódou pre svoju vysokú rozdeľovaciu schopnosť je kapilárna plynová chromatografia v spojení s ďalšími identifikačnými technikami, ako je hmotnostná spektrometria (MS), infračervená spektrometria (IRS) [25]. Viacerí autori túto techniku použili na charakterizáciu zloženia silíc rozmarínu, šalvie a tymiánu [26]. Výsledky sú uvedené v tab. 1. Zloženie silice bobkového listu sa zistilo plynovou chromatografiou [9]. Výsledky sú v tab. 2.

Použitím GC a GC-MS sa zistilo, že hlavné zložky bazalky sú linalool, (*E*)-metylcinamát a 1,8-cineol [27].

Pri skúmaní zloženia čínskeho čierneho korenia (*Zanthoxylum simulans*) sa použila plynová chromatografia a hmotnostná spektrometria [8]. Celkovo 43 zlúčenín bolo identifikovaných ako prchavé zložky, z toho je 20 terpénov, 10 alkoholov, 8 esterov a 5 iných zložiek. Hlavné prchavé zložky (>10 %) boli  $\beta$ -myrcén, limonén, 1,8-cineol a (*Z*)- $\beta$ -ocimén. Zloženie silíc 3 druhov oregana sa skúmalo tiež plynovou chromatografiou s MS [7]. Zistil sa vysoký obsah karvakrolu, tymolu,  $\gamma$ -terpinénu a *p*-cyménu.

Škorica (*Cinnamomum talama*) obsahuje 54,66 % linaloolu, 9,67 %  $\alpha$ -pinénu, 6,54 % cyménu, 4,45 %  $\beta$ -pinénu, 2,64 % limonénu a 16 iných zlúčenín [28]. Podobná práca bola publikovaná o zložení škorice z Indie [29]. Zistil sa tiež vysoký obsah linaloolu (60,75 %),  $\alpha$ -pinénu (10,54 %),  $\beta$ -pinénu (10,42 %), limonénu (3,21 %), kamfénu (3,06 %).

Tabuľka 1. Zloženie silíc tymiánu, rozmarínu a šalvie [26].  
 TABLE 1. The composition of essential oils from thyme, rosemary and sage [26].

Zložky <sup>1</sup>	Tymián <sup>2</sup>	Rozmarín <sup>3</sup>	Šalvia <sup>4</sup>
	[%]		
Cyklické terpény			
$\alpha$ -pinén	3,2	36,4	-
$\beta$ -pinén	0,4	3,11	3,4
limonén	2,6	2,52	-
felandré	0,2	4,17	6,2
$\alpha$ -terpinén	0,6	0,39	0,03
kamfén	0,2	10,87	-
Seskviterpény			
karyofylén	1,6	-	1,1
Fenoly			
tymol	25,65	1,94	-
Cyklické terpénové ketóny			
tujón	0,2	4,17	55,17
Alifatické alkoholy			
geraniol	0,2	4,17	0,5
linalool	2,8	6,40	32,10
Cyklické terpénové alkoholy			
borneol	6,9	0,44	0,5
Aromatické uhľovodíky			
<p>-</p> cymén	19,20	11,35	-

1 - components, 2 - thyme, 3 - rosemary, 4 - sage.

Zloženie dvoch druhov zázvoru z Indie a z Austrálie sa sledovalo použitím kombinácie GC-MS [30]. Výsledky ukázali rozdiely v zložení dvoch silíc. Hlavnými zložkami silice zázvoru z Indie sú seskviterpény, zingiberén,  $\alpha$ -farnezen,  $\beta$ -bisabolén a  $\beta$ -seskvifelandré, silica zázvoru z Austrálie obsahuje hlavne monoterpény, kamfén, felandré a ich deriváty: neral, geraniol a 1,8-cineol.

Popri mnohých výhodách má plynová chromatografia tiež niektoré nedostatky. Predovšetkým touto technikou nemožno rozdeliť neprchavé zložky korenín, ktoré sa vylúhujú pri extrakcii. Vysoké teploty chromatografickej kolóny môžu zmeniť štruktúru termolabilných zložiek, môže dochádzať k interakcii delenej látky s inými zlúčeninami a pod. Niektoré z týchto pro-

TABUĽKA 2. Zastúpenie niektorých dôležitých zložiek silice bobkového listu [9].  
TABLE 2. The presence of the important constituents of essential oil from laurel [9].

Zložka <sup>1</sup>	Koncentrácia <sup>2</sup> [%]	Zložka	Koncentrácia [%]
$\alpha$ -thujén	0,3	terpinén-4-ol	0,9
$\alpha$ -pinén	2,2	$\alpha$ -terpineol	1,2
kamfén	0,2	nerol	0,1
sabinén	11,8	linalylacetát	0,6
$\beta$ -pinén	2,4	bornylacetát	0,4
myrcén	0,2	eugenol	18,5
$\alpha$ -felandréen	0,2	$\alpha$ -kubenén	0,2
kar-3-én	0,1	$\alpha$ -kopaén	0,1
$\alpha$ -terpinén	0,4	metyleugenol	2,5
<i>p</i> -cymén	0,4	$\beta$ -elemén	0,6
limonén	0,8	$\beta$ -karyofylén	1,1
1,8-cineol	26,7	( <i>E</i> )-metylizoeugenol	0,1
$\gamma$ -terpinén	0,6	$\alpha$ -humulén	0,2
( <i>E</i> )-sabinén hydrát	0,4	eugenylacetát	0,1
terpinolén	0,2	$\alpha$ -selinén	0,1
linalool	18,5	$\beta$ -bisabolén	0,1
( <i>Z</i> )-sabinén hydrát	0,4	$\delta$ -kadinén	0,2
borneol	0,2	elemol	0,1

1 - component, 2 - concentration.

blémov možno riešiť aplikáciou vysokoúčinnnej kvapalnej chromatografie (HPLC), ktorá má prednosti v tom, že analyzované látky sa delia pri laboratórnej teplote, takže ani termolabilné zložky sa v procese analýzy nemenia [31].

Technika sa použila pri identifikácii zložiek tymiánu a šalvie [10,32]. HPLC bola použitá na izoláciu kyseliny karnozovej od fenolových diterpénov. Separované zlúčeniny boli identifikované <sup>13</sup>C-NMR <sup>1</sup>H-NMR, MS a IRS. Premena kyseliny karnozovej na karnozol a iné fenolové diterpény boli sledované s použitím HPLC [33].

Izolácia a identifikácia antioxidačných zložiek rozmarínu sa uskutočnila použitím HPLC, IRS, MS a NMR [18].

Antioxidačné zložky oleorezínu šalvie sa separovali stĺpcovou chromatografiou, HPLC a identifikovalo sa 6 fenolových zlúčenín infračervenou, hmotnostnou, a <sup>1</sup>H-NMR spektrometriou. Sú to karnozol, kyselina karno-

zová, rozmadial, rozmanol, epirozmanol a metylkarnozát [34]. Využitím HPLC sa izolovali fenolové diterpény z rozmarínu a jeho komerčných extraktov a potom sa skúmali ich antioxidačné účinky [35]. Izoláciu účinných zložiek pomocou HPLC a využitie  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  a MS na skúmanie štruktúry obsahových látok tymiánu, šalvie, klinčeka použili viacerí autori [36-38].

Z uvedeného prehľadu vyplýva, že pozornosť treba orientovať na izoláciu silíc a identifikáciu účinných zložiek širokého spektra korenín, a to predovšetkým takých, ktoré priaznivo ovplyvňujú nielen stabilitu lipidov, ale aj sensorickú hodnotu potravín.

*Zoznam použitých skratiek:*

FID	plameňový ionizačný detektor
MS	hmotnostná spektrometria
IRS	infračervená spektrometria
GC	plynová chromatografia
HPLC	vysoko-účinná kvapalinová chromatografia
NMR	jadrová magnetická rezonančná spektrometria
TAG	triacylglycerol

## Literatúra

1. CHÝLEOVÁ, L.: Koření a jeho použití v potravinářském průmyslu. [Závěčná etapová správa.] Praha, Výzkumný ústav potravinářského průmyslu - Středisko technických informací 1986. 44 s.
2. FARAG, R. S. - BADEI, A. Z. M. A. - HEWEDI, F. M. - EL-BAROTY, G. S. A.: Antioxidant activity of some spice essential oil on linoleic acid oxidation in aqueous media. *Journal of the American Oil Chemical Society*, 66, 1989, č. 6, s. 792-799.
3. SVOBODA, K. P. - DEANS, S. G.: A study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the british market: Their antioxidative properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 7, 1992, č. 2, s. 81-87.
4. DORMAN, H. J. - DEANS, S. G. - NOBLE, R. C.: Evaluation in vitro of plant essential oil as natural antioxidants. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 1995, č. 2, s. 645-651.
5. DEANS, S. G. - NOBLE, R. C. - HILTUNEN, R. - WURYANI, W. - PENSEZ, L. G.: Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L) merr. & perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid level in ageing mice. *Flavour and Fragrance Journal*, 10, 1995, č. 5, s. 323-328.
6. SIVROPOULOU, A. - PAPANIKOLAOU, E. - NIKOLAOU, C. - KOKKINI, S. - LANARAS, T. - ARSENAKIS, M.: Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1996, č. 5, s. 1202-1205.
7. MAROTTI, M. - PICCAGLIA, R. - GIOVANELLI, E.: Effects of variety and ontogenic stage on the essential oil composition and biological activity of fennel. *Journal of Essential Oil Research*, 6, 1994, č. 1, s. 57-62.

8. CHYAN, C. C. - MAU, J. L. - WU, C. M.: Characteristics of steamed-distilled oil and carbon dioxide extract of *Zanthoxylum simulans* fruits. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 44, 1996, č. 4, s. 1096-1099.
9. BORGES, P. - PINO, J. - SANCHEZ, E.: Isolation and chemical characterization of laurel leaf oil. Die Nahrung, 36, 1992, č. 5, s. 494-496.
10. TERNES, W. - GRONEMEYER, M. - SCHWARZ, K.: Determination of *p*-cymene-2,3 diol, thymol and carvacrol in different foodstuffs. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 201, 1995, č. 6, s. 544-547.
11. CHEN, C. C - ROSEN, R. T. - HO, C. T.: Chromatographic analysis of gingerol compounds in ginger extracted by liquid carbon dioxide. Journal of Chromatography, 360, 1986, č. 1, s. 163-173.
12. GERALD, D. - QUIRIN, K. W. - SCHWARZ, E.: CO<sub>2</sub> extracts from rosemary and sage. Food Marketing and Technology, 9, 1996, č. 5, s. 46-55.
13. OSZAGYAN, M.: Supercritical fluid extraction of volatile compounds from levandin and thyme. Flavour and Fragrance Journal, 11, 1996, č. 3, s. 157-165.
14. REN, M. - FUH, S.: Preparative-scale supercritical fluid extraction of essential oil from *Syzygium aromaticum* (clove). American Laboratory, 27, 1995, č. 18, s. 36-38, 40-41.
15. CHEN, S. S. - SPIRO, M.: Study of microwave extraction of essential oil constituents from plant materials. Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy, 29, 1994, č. 4, s. 231-241.
16. MADSEN, H. L. - BERTELSEN, G.: Spices as antioxidants. Trend in Food Science & Technology, 8, 1995, č. 6, s. 271-277.
17. ECONOMOU, K. D. - OREOPOULOU, V. - THOUMOPOULOS, C. D.: Antioxidant activity of some plant extracts of family labiatae. Journal of the American Oil Chemical Society, 68, 1991, č. 2, s. 109-113.
18. WU, J. W. - LEE, M. H. - HO, C. T. - CHANG, S. S.: Elucidation of the chemical structures of natural antioxidant isolated from rosemary. Journal of the American Oil Chemical Society, 59, 1982, č. 8, s. 339-345.
19. BANIAS, C. - OREOPOULOU, V. - THOUMOPOULOS, C. D.: The effect of primary antioxidants and synergists on activity of plant extract in lard. Journal of the American Oil Chemical Society, 69, 1992, č. 6, s. 520-524.
20. McDONALD, R. E. - MIN, D. B.: Food lipids and health. New York - Basel - Hongkong, Marcel Dekker, Inc. 1996. 480 s.
21. TAKÁCSOVÁ, M. - PRÍBELA, A. - FACTOROVÁ, M.: Study of the antioxidative effects of thyme, sage, juniper. Die Nahrung, 39, 1995, č. 3, s. 241-243.
22. VEKIARI, S. A. - OREOPOULOU, V. - TZIA, C.: Oregano flavonoids as lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemical Society, 70, 1993, č. 5, s. 483-487.
23. BASSIOUNI, S. S. - HASSANIEN, F. R.: Efficiency of antioxidants from natural sources in bakery products. Food Chemistry, 37, 1990, č. 3, s. 297-305.
24. AESCHBACH, R. - BÄCHLER, R. - ROSSI, P. - SANDOL, L. - WILL, H. J.: Mechanical extraction of plant antioxidants by means of oils. Fat Science and Technology, 96, 1994, č. 11, s. 441-443.
25. SRITHARAN, R. - JACOB, U. J.: Thin layer chromatographic analysis of essential oils from *Cinnamomum* species. Journal of Herbs, Spices and Medical Plants, 2, 1994, č. 2, s. 49-63.
26. FARAG, R. S. - SALEM, H. - BADEI, A. Z. M. A. - HASSANEIN, D. E.: Biochemical studies on the essential oils of some medical plants. Anstrich Mittel, 88, 1986, č. 2, s. 69-72.
27. OZEK, T.: Composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. cultivated in Turkey. Journal of Essential Oil Research, 7, 1995, č. 2, s. 202-205.



28. UPADHAYA, S. P. - KIRIHATA, M. - ICHIMOTO, I.: Cinnamon leaf oil from *Cinnamomum tamala* grown in Nepal. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology, *41*, 1994, č. 7, s. 512-514.
29. NATH, S. C. - HAZARIKA, A. K. - SINGH, R. S.: Essential oil of leaves of *Cinnamomum tala-*  
*ma* from North East India. Journal of Spices and Aromatic Crops, *3*, 1994, č. 1, s. 33-35
30. ERLER, J. - VOTROWSKY, O. - STROBEL, H. - KNOBLOCH, K.: Über ästerish öle des ingwer, *Zingiber officinalis roscoe*. Zeitschrift für Lebensmittel-Unterschung und -Forschung, *186*, 1988, č. 2, s. 231-234.
31. PRÍBELA, A. - PÍRY, J.: Možnosť využitia HPLC pri analýze silíc korenia. In: Aromatické látky v požívatinách. Zborník referátov z XI. celoštátneho sympózia v dňoch 24. a 25. novembra 1993 v Nitre. Bratislava, Slovenská technická univerzita 1994, s. 78-81.
32. CUVELIER, M. E. - BERSET, C. - RICHARD, H.: Separation of major antioxidants in sage by high performance liquid chromatography. Sciences des Aliments, *14*, 1994, č. 6, s. 811-815.
33. SCHWARZ, K. - TERNES, W.: Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. Zeitschrift für Lebensmittel-Unterschung und -Forschung, *195*, 1992, č. 2, s. 95-103.
34. CUVELIER, M. E. - BERSET, C. - RICHARD, H.: Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). Journal of Agriculture and Food Chemistry, *42*, 1994, č. 3, s. 655-669.
35. RICHHEIMER, S. L.: Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. Journal of the American Oil Chemical Society, *73*, 1996, č. 4, s. 507-514.
36. SCHWARZ, K. - ERNEST, H.: Evaluation of antioxidative constituents from thyme. Journal of the Science of Food and Agriculture, *70*, 1996, č. 2, s. 217-223.
37. MYINT, S.: Separation and identification of eugenol in ethanol extract of cloves by reversed-phase high performance liquid chromatography. Journal of the American Oil Chemical Society, *2*, 1995, č. 10, s. 1234-1233.
38. EHLERS, D. - HILMER, S. - BARTHOLOMAE, S.: HPLC analysis of supercritical CO<sub>2</sub> cinnamon and cassia extracts in comparison with cinnamon and cassia oil. Zeitschrift für Lebensmittel-Unterschung und -Forschung, *200*, 1995, č. 4, s. 282-288.

Do redakcie došlo 27.3.1998.

### Isolation and identification of spice essential oils

TAKÁCSOVÁ, M. - NHAT, D. M. - VINH, N. D. - PRÍBELA, A.:  
Bull. potrav. Výsk., *37*, 1998, p. 109-117.

SUMMARY. Knowledge on active constituents of spices is presented. The main deal is taken for isolation of spice essential oils by means of hydrodistillation and organic solvent extraction. Information about composition of spice essential oils and methods for their determining is also included. The active constituents of spices can be used as natural lipid antioxidants.

KEYWORDS: spices, antioxidant, essential oil, isolation of essential oil, essential oil composition