

Analiza hlapljivih spojeva iz uzoraka nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja

Magdalenić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:792877>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA IZ UZORAKA
NEAROMATIZIRANIH I AROMATIZIRANIH MASLINOVIH
ULJA

DIPLOMSKI RAD

KATARINA MAGDALENIĆ

Matični broj: 114

Split, listopad 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA IZ UZORAKA
NEAROMATIZIRANIH I AROMATIZIRANIH MASLINOVIH
ULJA

DIPLOMSKI RAD

KATARINA MAGDALENIĆ

Matični broj: 114

Split, listopad 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS FROM SAMPLES OF
NONFLAVORED AND FLAVORED OLIVE OILS**

DIPLOMA THESIS

KATARINA MAGDALENIĆ

Parental number: 114

Split, October 2020.

Sveučilište u Splitu
Kemijско–Tehnološki fakultet
Diplomski studij organske kemije i biokemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada: je prihvaćena na XXVIII. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović i ing. Edita Jelinčić

ANALIZA Hlapljivih spojeva iz uzoraka nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja

Katarina Magdalenić, 114

Sažetak:

Zbog svoje specifične arome i nutricionističkih benefita maslina (*Olea europea* L.) jedna je od najpopularnijih biljaka Dalmacije. Kako bi se poboljšala osjetilna i nutricionistička svojstva, već poznatom mirisu i okusu maslinova ulja, dodaju se nove arome. U aromatizaciji ulja najčešće se koriste ružmarin, timijan, origano i slične aromatične biljke te plodovi citrusa. U svrhu izolacije hlapljivih spojeva tri nearomatizirana maslinova ulja i tri maslinova ulja aromatizirana gorkom narančom, origanom i ružmarinom, podvrgnuta su hidrodestilaciji te mikroekstrakciji vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Svi uzorci hlapljivih spojeva, destilati i vršne pare, analizirani su veznim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Glavni spojevi u destilatu maslinovog ulja, uzorak 1, su nezasićena masna kiselina, oleinska kiselina, aldehid nonanal te (*E*)- i (*Z*)- izomeri nezasićenog alifatskog aldehida deka-2,4-dienala. U destilatu uzorka 2 ističe se nezasićeni C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal i oleinska kiselina. Glavni spojevi destilata uzorka 3 su oleinska kiselina i etil-oleat. C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal nije identificiran u uzorcima 1 i 3, dok je C₆ alkohol heksan-1-ol identificiran u sva tri destilata, ali s malim udjelima. Navedeni spojevi su nositelji arome koja se opisuje kao „zelena“. Glavni sastojci vršnih para uzorka 1 i 2 su C₆ spojevi (*E*)-heks-2-enal, heksanal te heksan-1-ol. Uzorak 2 sadrži još i oleinsku kiselina. Vršne pare uzorka 3 se dosta razlikuju. Tu prevlada ester butanske kiseline, etil-butanoat i etanol. C₆ aldehidi (*E*)-heks-2-enal i heksanal u uzorku 3 nisu identificirani, već C₆ alkohol heks-3-en-1-ol. U destilatu maslinovog ulja aromatiziranog gorkom narančom ističe se monoterpeni ugljikovodik limonen. Glavni spojevi destilata maslinovog ulja aromatiziranog origanom su također monoterpeni. Najveći udio zauzima fenol timol te ugljikovodici *p*-cimen i limonen. Destilat maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom sadrži monoterpeni timol, limonen, 1,8-cineol, *p*-cimen, kamfor te α -pinen. Glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog gorkom narančom su limonen i triterpeni ugljikovodik skvalen. Najistaknutiji spojevi vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog origanom su monoterpeni limonen, *p*-cimen i timol. Kao i u prethodnom i u ovom uzorku identificiran je triterpeni ugljikovodik skvalen. Uzorak vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom karakterizira visoki udio skvalena te oleinska kiselina.

Ključne riječi: maslinovo ulje, aromatizirana maslinova ulja, hlapljivi spojevi, vodena destilacija, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 70 stranica, 38 slika, 7 tablica, 26 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Vesna Sokol	član
3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić	član-mentor

Datum obrane: 16. listopada 2020.

Rad je pisan u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-Tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

University of Split
Faculty of chemistry and technology
Graduate study of organic chemistry and biochemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XXVIII.

Mentor: Ani Radonić, PhD, associate professor

Technical assistance: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof. and Edita Jelinčić, ing

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS FROM SAMPLES OF NONFLAVORED AND
FLAVORED OLIVE OILS**
Katarina Magdalenić, 114

Abstract:

Due to its specific aroma and valuable nutritional benefits, olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the most popular plants in Dalmatia. In order to improve the sensory and nutritional properties, various aromas are added to the olive oils. Rosemary, thyme, oregano and various *Citrus* fruits are most often used in the aromatization of oils. For the purpose of isolating volatile compounds, three non-flavored olive oils and three olive oils flavored with bitter orange, oregano and rosemary, were subjected to hydrodistillation and solid phase microextraction method (HS-SPME). All volatile compound samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The main compounds in the olive oil distillate, sample 1, are unsaturated fatty acid, oleic acid, aldehyde nonanal and (*E*)- and (*Z*)-isomers of deca-2,4-dienal. In the sample 2 distillate, unsaturated C₆ aldehyde (*E*)-hex-2-enal and oleic acid stand out. The main compounds of sample 3 distillate are oleic acid and ethyl oleate. C₆ aldehyde (*E*)-hex-2-enal, was not identified in samples 1 and 3, while C₆ alcohol hexan-1-ol was identified in all three distillates, but with small proportions. These compounds are carriers of so-called "green" aromas. The main constituents of headspace vapours of samples 1 and 2 are C₆ compounds (*E*)-hex-2-enal, hexanal and hexan-1-ol. Sample 2 also contains oleic acid. The headspace vapors of sample 3 are different with ethyl butanoate and ethanol as main compounds. The C₆ aldehydes (*E*)-hex-2-enal and hexanal in sample 3 were not identified, but the C₆ alcohol hex-3-en-1-ol was. In the distillate of olive oil flavored with bitter orange the monoterpene limonene stands out. The most prominent compounds of oregano flavored olive oil distillate are also monoterpenes. The largest share takes phenol thymol, and hydrocarbons *p*-cymene and limonene. The rosemary flavored olive oil distillate contains monoterpenes thymol, limonene, 1,8-cineole, *p*-cymene, camphor and α -pinene. The main ingredient of the headspace vapors of bitter orange flavored olive oil is limonene, as well as the triterpene squalene. The most prominent compounds of the headspace vapors of oregano flavored olive oil are monoterpenes limonene, *p*-cymene and thymol. As in the previous sample, the triterpene squalene was identified too. The sample of headspace vapors of rosemary flavored olive oil is characterized by an extremely high content of squalene followed by oleic acid.

Keywords: olive oil, aromatized olive oils, volatile compounds, hydrodistillation, HS-SPME, GC-MS

Thesis contains: 70 pages, 38 figures, 7 tables, 26 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović – PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Vesna Sokol – PhD, associate prof. | member |
| 3. Ani Radonić – PhD, associate prof. | supervisor |

Defence date: October 16th, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is disposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić tijekom srpnja 2020. godine.

***„Čovjek samo srcem dobro vidi.
Ono bitno, očima je nevidljivo.“***
Antoine de Saint-Exupéry

Zahvaljujem u prvom redu izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na stručnim savjetima, susretljivosti, razumijevanju i riječima potpore pri izradi ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću i ing. Editi Jelinčić na pomoći i beskrajnom strpljenju pri nekim ključnim dijelovima eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem također svojim dragim kolegama i prijateljima na nesebičnoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog studiranja.

Posebno HVALA ipak pripada mojoj majci Steffi, kojoj ujedno i posvećujem ovaj diplomski rad i bez koje sve što sam postigla ne bi bilo moguće. HVALA joj što je vjerovala u mene i kada ja sama to nisam. Neizmjerno joj HVALA i što je bila uz mene u svim, sretnim i teškim trenucima.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti profil hlapljivih spojeva uzoraka nearomatiziranih maslinovih ulja i maslinovih ulja aromatiziranih gorkom narančom, origanom i ružmarinom.
- Izolirati hlapljive spojeve iz uzoraka nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja korištenjem metode hidrodestilacije u modificiranoj aparaturi po Clevenger-u te mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).
- Analizirati uzorke hlapljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).
- Usporediti dobivene rezultate, istaknuti prednosti i nedostatke pojedine metode izolacije radi utvrđivanja najpogodnije metode za određivanje profila hlapljivih spojeva nearomatiziranih i aromatiziranih uzoraka maslinovih ulja.

SAŽETAK

Zbog svoje specifične arome i nutricionističkih benefita maslina (*Olea europea* L.) jedna je od najpopularnijih biljaka Dalmacije. Kako bi se poboljšala osjetilna i nutricionistička svojstva, već poznatom mirisu i okusu maslinova ulja, dodaju se nove arome. U aromatizaciji ulja najčešće se koriste ružmarin, timijan, origano i slične aromatične biljke te plodovi citrusa. U svrhu izolacije hlapljivih spojeva tri nearomatizirana maslinova ulja i tri maslinova ulja aromatizirana gorkom narančom, origanom i ružmarinom, podvrgnuta su hidrodestilaciji te mikroekstrakciji vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Svi uzorci hlapljivih spojeva, destilati i vršne pare, analizirani su veznim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Glavni spojevi u destilatu maslinovog ulja, uzorak 1, su nezasićena masna kiselina, oleinska kiselina, aldehid nonanal te (*E*)- i (*Z*)- izomeri nezasićenog alifatskog aldehida deka-2,4-dienala. U destilatu uzorka 2 ističe se nezasićeni C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal i oleinska kiselina. Glavni spojevi destilata uzorka 3 su oleinska kiselina i etil-oleat. C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal nije identificiran u uzorcima 1 i 3, dok je C₆ alkohol heksan-1-ol identificiran u sva tri destilata, ali s malim udjelima. Navedeni spojevi su nositelji arome koja se opisuje kao „zelena“. Glavni sastojci vršnih para uzorka 1 i 2 su C₆ spojevi (*E*)-heks-2-enal, heksanal te heksan-1-ol. Uzorak 2 sadrži još i oleinsku kiselina. Vršne pare uzorka 3 se dosta razlikuju. Tu prevlada ester butanske kiseline, etil-butanoat i etanol. C₆ aldehidi (*E*)-heks-2-enal i heksanal u uzorku 3 nisu identificirani, već C₆ alkohol heks-3-en-1-ol. U destilatu maslinovog ulja aromatiziranog gorkom narančom ističe se monoterpeni ugljikovodik limonen. Glavni spojevi destilata maslinovog ulja aromatiziranog origanom su također monoterpeni. Najveći udio zauzima fenol timol te ugljikovodici *p*-cimen i limonen. Destilat maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom sadrži monoterpeni timol, limonen, 1,8-cineol, *p*-cimen, kamfor te α -pinen. Glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog gorkom narančom su limonen i triterpeni ugljikovodik skvalen. Najistaknutiji spojevi vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog origanom su monoterpeni limonen, *p*-cimen i timol. Kao i u prethodnom i u ovom uzorku identificiran je triterpeni ugljikovodik skvalen. Uzorak vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom karakterizira visoki udio skvalena te oleinska kiselina.

Ključne riječi: maslinovo ulje, aromatizirana maslinova ulja, hlapljivi spojevi, vodena destilacija, HS-SPME, GC-MS

SUMMARY

Due to its specific aroma and valuable nutritional benefits, olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the most popular plants in Dalmatia. In order to improve the sensory and nutritional properties, various aromas are added to the olive oils. Rosemary, thyme, oregano and various *Citrus* fruits are most often used in the aromatization of oils. For the purpose of isolating volatile compounds, three non-flavored olive oils and three olive oils flavored with bitter orange, oregano and rosemary, were subjected to hydrodistillation and solid phase microextraction method (HS-SPME). All volatile compound samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The main compounds in the olive oil distillate, sample 1, are unsaturated fatty acid, oleic acid, aldehyde nonanal and (*E*)- and (*Z*)- isomers of deca-2,4-dienal. In the sample 2 distillate, unsaturated C₆ aldehyde (*E*)-hex-2-enal and oleic acid stand out. The main compounds of sample 3 distillate are oleic acid and ethyl oleate. C₆ aldehyde (*E*)-hex-2-enal, was not identified in samples 1 and 3, while C₆ alcohol hexan-1-ol was identified in all three distillates, but with small proportions. These compounds are carriers of so-called "green" aromas. The main constituents of headspace vapours of samples 1 and 2 are C₆ compounds (*E*)-hex-2-enal, hexanal and hexan-1-ol. Sample 2 also contains oleic acid. The headspace vapors of sample 3 are different with ethyl butanoate and ethanol as main compounds. The C₆ aldehydes (*E*)-hex-2-enal and hexanal in sample 3 were not identified, but the C₆ alcohol hex-3-en-1-ol was. In the distillate of olive oil flavored with bitter orange the monoterpene limonene stands out. The most prominent compounds of oregano flavored olive oil distillate are also monoterpenes. The largest share takes phenol thymol, and hydrocarbons *p*-cymene and limonene. The rosemary flavored olive oil distillate contains monoterpenes thymol, limonene, 1,8-cineole, *p*-cinnamom, camphor and α -pinene. The main ingredient of the headspace vapors of bitter orange flavored olive oil is limonene, as well as the triterpene squalene. The most prominent compounds of the headspace vapors of oregano flavored olive oil are monoterpenes limonene, *p*-cymene and thymol. As in the previous sample, the triterpene squalene was identified too. The sample of headspace vapors of rosemary flavored olive oil is characterized by an extremely high content of squalene followed by oleic acid.

Keywords: olive oil, aromatized olive oils, volatile compounds, hydrodistillation, HS-SPME GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Maslina	2
1.2. Građa i kemijski sastav ploda masline	4
1.3. Najvažnije sorte maslina u Hrvatskoj	6
1.4. Maslinovo ulje	11
1.4.1. Kemijski sastav maslinovog ulja	12
1.4.1.1. Uljna (osapunjiva) frakcija maslinova ulja	12
1.4.1.2. Neuljna (neosapunjiva) frakcija maslinova ulja	15
1.5. Aromatizirana maslinova ulja	22
1.5.1. Hlapljivi spojevi u aromatiziranim maslinovim uljima	22
1.5.1.1. Terpeni	23
1.5.1.2. Fenilpropanski derivati	25
1.5.1.3. Ostali spojevi	25
1.6. Agrumi (lat. <i>Citrus</i>)	26
1.6.1. Gorka naranča (<i>Citrus aurantium</i> L.)	26
1.7. Ljekovito i aromatično bilje	28
1.7.1. Origan (<i>Origanum vulgare</i> L.)	28
1.7.2. Ružmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	29
1.8. Metode izolacije hlapljivih spojeva	31
1.8.1. Destilacija	31
1.8.1.1. Hidrodestilacija	32
1.8.1.2. Vodeno-parna destilacija	33
1.8.1.3. Destilacija vodenom parom	34
1.8.2. Ekstrakcija	35
1.8.2.1. Ekstrakcija etanolom	36
1.8.2.2. Ekstrakcija organskim otapalima izuzev etanola	36
1.8.3. Sorpcijske tehnike	37
1.8.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi	37
1.9. Analiza hlapljivih spojeva	39
1.9.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa	40
2. EKSPERIMENTALNI DIO	41
2.1. Materijal	41

2.2.	Kemikalije i aparatura	41
2.3.	Izolacija hlapljivih spojeva	42
2.3.1.	Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom.....	42
2.3.2.	Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).....	44
2.4.	GC-MS analiza hlapljivih spojeva	46
3.	REZULTATI	48
3.1.	GC/MS analiza hlapljivih spojeva	48
4.	RASPRAVA.....	57
4.1.	Hlapljivi spojevi nearomatiziranih maslinovih ulja	57
4.2.	Hlapljivi spojevi aromatiziranih maslinovih ulja.....	61
5.	ZAKLJUČCI	65
6.	LITERATURA	67
7.	POPIS SLIKA	69

UVOD

Zbog svoje specifične arome i vrijednih nutricionističkih benefita maslina (*Olea europea* L.) jedna je od najpopularnijih biljaka Dalmacije. Prema nekim istraživačima maslinu su prvi počeli uzgajati stanovnici srednje Azije prije otprilike 6000 godina pr. Kr. Stanovnici juga Male Azije maslinu su prenijeli u Grčku, da bi kolonijalnim djelovanjem Grčke prešla u druge krajeve Mediterana, pa tako i na obale Jadrana. Ipak, najstariji zapisi o samoj biljci zapravo se nalaze u vjerskoj knjizi, Bibliji. Na više od stotinjak mjesta njezini „autori“ spominju stablo, ali i ulje masline. Nadalje, Antika je također za sobom ostavila veliki trag o maslini. Mnogi pisani zapisi, ali i kipovi, freske i arhitektonski ostaci svjedoče o tome kako su Grci i Rimljani smatrali ovu biljku predstavnicom mira, pobjede, ljubavi, strpljenja, plodnosti, postojanosti i mudrosti. Na području Hrvatske najstarije stablo, staro oko 1700 godina, nalazi se u Kaštel Štafiliću.¹

Danas, u moderno doba, mnogi znanstveni radovi maslinu i njezine proizvode stavljaju u fokus takozvane „funkcionalne hrane“. Dokazano je kako maslinovo ulje ima povoljan učinak u vidu antioksidativne, protuupalne, antimikrobne, antiteratogene i antitumorske aktivnosti. Osim toga, dokazano je kako maslinovo ulje ima povoljan učinak i na usporavanje procesa starenja te jačanja imunološkog sustava.¹

U kemijskom pogledu plod masline sadrži 40-50 % vode, 13-28 % ulja, 8-12 % ugljikohidrata, 2-3 % fenolnih spojeva, oko 1,5 % proteina, pigmente, mineralne tvari te vitamine i organske kiseline. Maslinovo ulje koje je ujedno i glavni proizvod dobiven od ploda sadrži pak oko 95 % zasićenih i nezasićenih masnih kiselina s 12 do 24 ugljikova atoma koje su sadržane u acilglicerolima, zatim vodu, sterole, tokoferole, fosfolipide, fenolne spojeve, terpenke alkohole, voskove, pigmente i hlapljive spojeve koji su ujedno i glavni nositelji arome maslinovog ulja¹. Upravo hlapljivi spojevi maslinovog ulja će predstavljati središnju temu ovog diplomskog rada.

U najnovije industrijsko doba posebnu pozornost privlače aromatizirana maslinova ulja. Već poznatom mirisu i okusu maslinova ulja dodaju se razne aromatične biljke kako bi se poboljšala osjetilna i nutricionistička svojstva, ali osim toga i produžio vijek valjanosti proizvoda. U aromatizaciji ulja najčešće se koriste ružmarin, naranča, limun, timijan, origano i slične aromatične biljke te njihovi plodovi. Ujedno, tako aromatizirana ulja ljubiteljima nude široku paletu novih okusa.

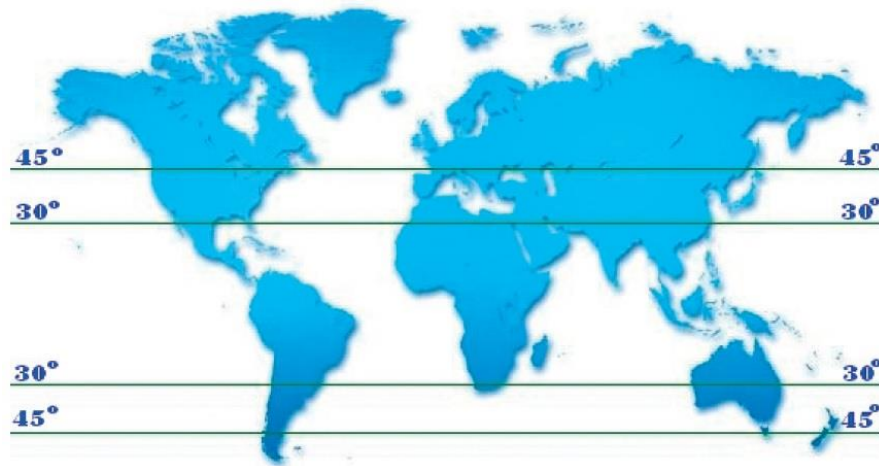
1. OPĆI DIO

1.1. Maslina

Maslina (*Olea europea* L.) je višegodišnja biljka čiji se plodovi mogu jesti izravno. Prema takvoj definiciji maslina je voće. Ona pripada porodici Oleaceae, a ujedno i zajednici česmине ili crnike čije je prirodno stanište područje Mediterana. Ova biljka raste kao zimzeleno stablo sa širokom krošnjom, a ovisno o samoj sorti može narasti do visine od tri pa sve do 20 metara. U agronomskom i ekonomskom pogledu visina joj se zbog same berbe održava na optimalnih pet metara. Starenjem stabla kora debla od glatko zelene prelazi u kvrgavo sivu. Listovi ove biljke u načelu su uski te zeleni s gornje, a bijeli s donje strane. U cvatu stablo masline ima također bijele cvjetove grozdastog oblika (slika 1). Podneblja u kojima uspijeva su klimatski sušna ili polusušna gdje se temperatura ne spušta ispod 0 °C. Takva su područja mediteranske klime između 30° i 45° na sjevernoj i južnoj polutci gdje su zime blage, a ljeta vruća (slika 2).¹



Slika 1. Slikoviti prikaz stabljike i ploda masline, *Olea europea* L.



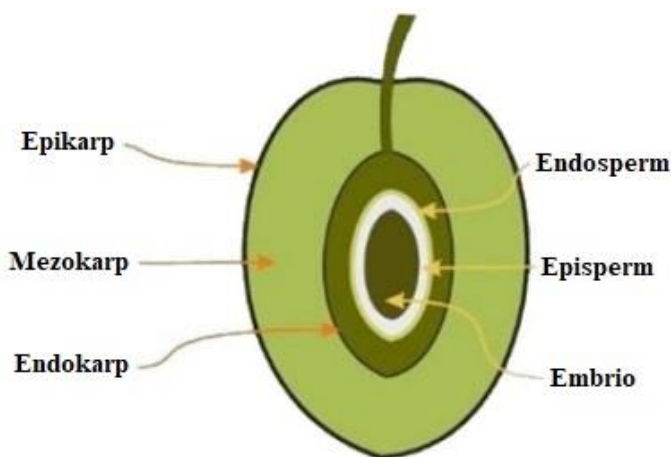
Slika 2. Prikaz areala rasprostranjenosti masline

Kad je o uzgoju masline riječ ona raste sporo. U prvih sedam godina odvija se rast i razvoj biljke. U tom razdoblju biljka donosi neznatne količine plodova. Nakon sedme godine biljka počinje davati značajniju količinu ploda masline, a taj se prinos postupno povećava svake godine. Optimalna proizvodnja masline je između 35. i 150. godine starosti. Procjenjuje se kako je danas na području Mediterana od ukupnog broja nasada čak oko 95 % maslina. Sorte maslina mogu se podijeliti prema načinu oplodnje. Tako postoje tri vrste maslina, one koje su autofertilne i mogu se same oploditi tj. samoplodne, zatim one koje su djelomično autofertilne i one koje su autosterilne i ne mogu se same oploditi. U Hrvatskoj je najrasprostranjenija sorta *Oblica* koja je djelomično autofertilna.¹

1.2. Građa i kemijski sastav ploda masline

Stablo masline cvjeta u mjesecu svibnju i lipnju. Ipak, samo dio cvjetova pretvorit će se u plod, a razlog tome je što većina njih otpada u ranoj fazi cvata. Plod masline razvija se od lipnja do rujna, kada se smatra da je potpuno zreo. Nakon faze sazrijevanja plod je spreman za berbu i daljnju obradu sve do ulja.²

Zreli plod masline je bobica najčešće raznih dimenzija, ali uglavnom okruglastog ili ponekad duguljastog oblika koja sadrži tri glavna dijela, a to su pokožica, pulpa i koštica koja u svojoj unutrašnjosti sadrži još i sjemenku. Agronomski nazivi ovih dijelova su redom **epikarp**, **mezokarp** i **endokarp** (slika 3).



Slika 3. Slikoviti prikaz građe ploda masline

Pokožica ili **epikarp** koja čini od 1,5 do 3,5 % težine ploda je tek tanki sloj koji je načinjen uglavnom od ugljikohidrata pektina i celuloze te voskova. Uloga epikarpa je zaštita ploda od gubitka vlage za vrućih i sušnih dana te od raznih nametnika i bolesti.

Pulpa ili **mezokarp** sa 78 do 80 % težine zauzima najveći dio u plodu. To je uljasta tvorevina koja je sačinjena od nepravilnih stanica i vlaknastih struktura koje su u svojoj osnovi građene od celuloze i lignina. Spojevi masline koji su topljivi u vodi nalaze su u vakuolama stanice, dok su ulja sadržana u citoplazmi. S obzirom da je plod masline u začetku dozrijevanja zelene boje potrebno je reći kako isti u stanicama mezokarpa sadržava i klorofil. Tijekom sazrijevanja količina klorofila se postupno smanjuje. Kada je o kemijskim spojevima riječ, mezokarp najvećim dijelom sadrži vodu, zatim ulje, ugljikohidrate, minerale, vitamine, proteine, vlakna i pigmente.

Karakteristični spojevi ploda masline su zapravo fenolni spojevi, tanin, lignin, antocijani, flavanoidi i u najvećoj mjeri glikozid oleuropein koji imaju izrazito pozitivan učinak na zdravlje.

Osim gore navedenih klasa kemijskih spojeva u pulpi se mogu naći još aminokiseline, od kojih najčešće asparaginska kiselina, alanin, arginin, cistein, glicin, glutaminska kiselina, histidin, izoleucin, lizin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin, triptofan i valin te enzimi koji pripadaju klasi dušikovih spojeva. Od u vodi netopljivih tvari zanimljivi su karotenoidi, a od u vodi topljivih tvari tu su polisaharidi, polialkoholi i organske kiseline poput limunske i jabučne kiseline.¹

Sjemenku koja se nalazi u samom središtu ploda masline obavija koštica ili **endokarp**. Uloga koštice je očuvati sjemenku od, kako vanjskih tako i unutarnjih, promjena. Stanice endokarpa tijekom sazrijevanja očvrstnu i pretvaraju se u drvo, a tkivo endokarpa je na izgled svjetlije od tkiva pulpe. Te dvije činjenice idu u prilog tome kako je u endokarpu s obzirom na pulpu sadržano tek 20 do 30 % ulja različitog kemijskog sastava. Koštice su upravo jedno od sredstva raspoznavanja sorti maslina jer svaka od njih ima različiti oblik i veličinu te karakterističnu površinu. U tablici 1 dan je ukupni pregled kemijskih spojeva u plodu masline te u pojedinim dijelovima ploda.

Tablica 1. Pregled kemijskog sastava ploda, pulpe, koštice i sjemenke masline¹

SASTOJAK %	PLOD	PULPA	KOŠTICA	SJEMENKA
voda	45 – 55	50 – 60	10	30
ulje	13 – 28	15 – 30	0,7	27
dušični spojevi	1,5 – 2	2 – 4	3,3	10
nedušični spojevi	18 – 24	3 – 7	/	/
celuloza	5 – 8	3 – 6	79	29
pepeo	1 – 2	1 – 2	4	1,5

1.3. Najvažnije sorte maslina u Hrvatskoj

Postoji mnogo sorti maslina koje se međusobno razlikuju u prvom redu po obliku i veličini samog stabla, zatim po obliku, veličini i boji listova te boji, veličini, obliku i sastavu ploda. Osim toga sorte maslina razlikuju se i po rodnosti, otpornosti na bolesti, štetnike i klimatske uvjete. Znanstvena disciplina koja se bavi istraživanjem sorti maslina naziva se **elajografija**. Sam naziv potječe od grčkih riječi *έλαια* što znači maslina i *γράφω* što u prijevodu znači pisati. Kada se govori o terminu "sorta" on predstavlja istovjetne jedinice određene vrste koje nastaju vegetativnim razmnožavanjem najboljih populacija. Hrvatska je po uzgoju maslina podijeljena u šest regija, a to su Istra, Hrvatsko primorje i Kvarnerski otoci, sjeverna Dalmacija, srednja Dalmacija, južna Dalmacija i unutrašnjost Dalmacije.¹

Na području sjeverne Dalmacije sorte koje se uzgajaju su Oblica, Karbunčela, Drobnica i Oštrica, dok su u unutrašnjosti najzastupljenije Oblica i Istarska Bjelica. U srednjoj Dalmaciji kultivirane sorte su **Oblica**, **Levantinka**, **Drobnica**, **Lastovka** i **Sitnica**. Na području južne Dalmacije domaće sorte su Oblica, Lastovka, Bjelica, Drobnica, Murgulja i Sitnica.³ S obzirom da Split geografski pripada području srednje Dalmacije u nastavku je dan pregled najvažnijih autohtonih sorti upravo tog kraja.

Oblica je maslina koja slovi za najrašireniju i gospodarski najvažniju sortu koja se na području Hrvatske uzgaja više od 1500 godina. Struka procjenjuje kako se u našim krajevima uzgaja oko tri milijuna stabala. S obzirom na toliku raširenost uvrštena je na Sortnu listu Republike Hrvatske. Ova sorta masline razvija srednje bujno stablo, a krošnja joj se rasprostire poput kruga koji nalikuje na kišobran. List je srednje veličine, dugačak i širok, eliptičnog oblika valovite površine i sivomaslinaste boje. Za sušnog razdoblja listovi se uvijaju kako bi se spriječio gubitak vode. U cvatu, čija je prosječna dužina 3,5 cm, na jednom se mjestu može naći 10 do 35 cvjetova. Plod ove sorte upečatljivo je okrugao i krupan, a njegova masa varira od 2,5 pa sve do 14,5 g (slika 4). Sadržaj ulja s obzirom na područje i uvjete uzgoja varira između 18 i 21 %. Može se reći kako je njezina mana nejednoliko sazrijevanje, stoga se za vrijeme berbe još može na stablu osim potpuno zrelih ljubičastih i crnih plodova naći i na poluzrele zelene te žute plodove. S druge strane njezine prednosti su vrlo visoka otpornost prema suši, visok postotak uzgoja na siromašnim tlima te vrlo dobro podnošenje jakih naleta vjetrova. S obzirom na način razmnožavanja Oblica je djelomično samoplodna.³



Slika 4. Oblica

Levantinka je sorta masline koja razvija vrlo bujno stablo s okruglom krošnjom, a njezini listovi su veliki, široki i dugački te blago uvijeni. Karakteristična boja lista nije jednoznačna, njegovo lice je tamnozeleno, dok je naličje bjelkaste boje. Cvat je nešto manji nego kod Oblice, a u prosjeku je to oko 2,5 cm s oko dvadesetak cvjetova. Plod Levantinke je srednje krupan, eliptičnog oblika blago uvijen prema vrhu. Prosječna masa bobice je oko 4,5 g (slika 5). Za vrijeme zrenja bobice su nakupljene u grozdove. Plodovi zrenjem mijenjaju boju od zelene sve do crveno-ljubičaste i na kraju gotovo crne boje. Ova sorta masline ograničena je na područje srednje i južne Dalmacije, a najveća populacija Levantinke nalazi se na otoku Šolti. Upravo zbog te činjenice ova sorta se još naziva i *Šoltankom*. Također je uvrštena na Sortnu listu Republike Hrvatske, a prema procjenama godišnje se proizvede nekoliko tisuća sadnica. Gospodarski je vrlo značajna zbog redovite i obline rodosti te dobre otpornosti prema bolestima i velike otpornosti prema vjetrovima. S druge pak strane zahtijeva plodna tla te nije otporna na sušu. Plod ove masline sadrži oko 20 % ulja vrlo dobre kvalitete.³



Slika 5. Levantinka

Lastovka je autohtona sorta masline koja se uzgaja na području srednje i južne Dalmacije. Najviše stabala je na otoku Korčuli i to na području Vele Luke, što predstavlja oko 80 % ukupne populacije te sorte masline. Uvrštena je na Sortnu listu Republike Hrvatske, a struka procjenjuje kako je godišnja proizvodnja između 50 000 i 70 000 sadnica. Ime Lastovka dobila je po izgledu grančice i ploda koji podsjećaju na krila lastavice (slika 6). Iako ime asocira na otok Lastovo, na njemu se ona ne uzgaja. Neki istraživači smatraju kako najstarija stabla ove sorte imaju do 300 godina. Gospodarski je ova sorta vrijedna zbog visokog udjela i odlične kvalitete ulja.³



Slika 6. Lastovka

Stabla ove sorte srednjeg su rasta s vrlo bujnom i piramidalnom krošnjom. List je za razliku od Oblice i Levantinke sitan, uzak i kratak, kopljastog izgleda i tamnozeleno boje. Stablo joj cvate obilno s 20 do 25 cvjetova u cvatu. Plod je srednje krupan, duguljast, eliptičnog oblika prosječne mase od tri grama. Ponekad ako se manji broj cvjetova pretvorio u plod, tada plodovi mogu postići masu i do 5,5 g. Bobica ove sorte je intenzivno zelene boje koja u konačnici prelazi u crnu. Lastovka je autofertilna sorta, zbog čega rađa redovito i obilno. Udio ulja u plodu kreće se oko 24 % što ju čini domaćom sortom s najvećim udjelom ulja. Ulje je izrazito zelene boje i pikantnog okusa, izuzetne kvalitete. Lastovka je od svih sorti najotpornija na sušu, a s druge strane je osjetljiva na niske temperature i bolesti. Zanimljivo je spomenuti kako je ova sorta, kupažirana s Oblicom i Drobnicom, prepoznatljiv proizvod otoka Korčule gdje se ove tri sorte uzgajaju u konsocijaciji. Takvo ulje osebujnog je mirisa, boje i okusa.³

Nadalje, **Drobnica** je sorta masline koja se uzgaja na cijelom Jadranu, ali poseban areal na kojem ipak ima najviše stabala je područje Zadra, otoka Korčule i poluotoka Pelješca. Kao i Oblica, Levantinka i Lastovka, i Drobnica se također nalazi na Sortnoj listi Republike Hrvatske, a sinonim koji se često može čuti je **Mastrinka**. Uzgaja se isključivo za preradu u ulje koje je izuzetne kvalitete s izraženim pikantnim okusom i gorčinom. Stablo ove sorte je srednje bujno s tamnozelenim listovima koji su sitni, kratki, dosta uski i šiljasti (slika 7). U cvatu se može naći oko 12 cvjetova koji proizvode veliku količinu polena, a upravo ta tvar služi kao dobar oprašivač za druge sorte maslina.³



Slika 7. Drobnica

Plod Drobnice je sitnijeg eliptičnog oblika s prosječnom masom od 2,5 g. S početka zrenja ima zelenu boju koja tijekom procesa zrenja prelazi u ljubičastu, a potom u crnu boju. Sadržaj ulja u plodu je oko 23 % što ju svrstava u sami vrh po količini ulja koje se iz nje može dobiti. Kao prednost ove sorte može se istaknuti visoka otpornost na razne bolesti, no nedostatak joj je vrlo sitan plod što može otežavati sami proces berbe.

Sitnica je još jedna u nizu autohtonih sorti koja je uvrštena na Sortnu listu Republike Hrvatske. Najviše se uzgaja na poluotoku Pelješcu u okolici Stona. Neki istraživači navode kako je ova maslina na Pelješcu obitavala prije 350 godina. Ono što ju čini karakterističnom je veliki broj cvjetova koji u konačnici ne razvijaju plod, a potom i činjenica da sami plodovi kasno i neujednačeno sazrijevaju. Zbog toga se ova sorta najviše koristi za preradu u ulje, kojega u plodu ima oko 17 %. Sitnica raste sa srednje bujnom i rastresenom krošnjom. Njezin list je srednje veličine, svijetlozelene boje, kratak i širok (slika 8). Zreli plod, koji je eliptičnog oblika i crne boje, može dosegnuti masu od oko 1,7 g. Sitnica je sorta koja pokazuje srednju otpornost na napade štetočina.³



Slika 8. Sitnica

1.4. Maslinovo ulje

Ubrzani način života čovječanstvo je doveo do razvoja mnogih bolesti. Takav način vratio nas je na sam početak civilizacije kada su ljudi hranu ujedno koristili i kao lijek. Mnoga znanstvena istraživanja dokazala su višestruko pozitivan utjecaj maslinova ulja kako na krvožilni sustav i hipertenziju tako i na sprječavanje procesa starenja, raznih upala u tijelu i nastanka tumora. Zbog nepobitnih dokaza o biološkoj aktivnosti maslina se sve češće naziva „**funkcionalnom hranom**“. Osim dobrobiti za zdravlje, maslinovo ulje danas je također i neizbježan sastojak mnogih kozmetičkih proizvoda. Upravo to su glavni razlozi zbog kojeg se znanstvenici sve više okreću proučavanju masline i njenih proizvoda, a industrija sve većoj proizvodnji kvalitetnih ulja.

Ulje masline nastaje u samom plodu ove biljke procesom **lipogeneze** ili inolacije koji traje od njegova formiranja te cijelo vrijeme zrenja. Lipogeneza je proces sinteze masnih kiselina i triacilglicerola (triglicerida) iz glukoze ili drugih supstrata kako u biljnim i životinjskim vrstama tako i unutar ljudskog organizma. U samom plodu masline količina ulja uvelike ovisi o sorti, stupnju zrelosti te o načinu uzgoja i klimatskim uvjetima. Kada plod masline dosegne najveći stupanj zrelosti, povećanje udjela ulja u njemu više nije posljedica stvaranja ulja procesom lipogeneze već posljedica gubitka vode unutar bobice pri čemu se smanjuje kakvoća i kvaliteta ulja.¹ Prema **Pravilniku o uljima od ploda i komine masline (izdanje: NN 7/2009)** maslinova ulja se razvrstavaju u nekoliko kategorija od kojih su za industriju i potrošače najvažnije ekstra djevičansko i djevičansko maslinovo ulje.

Ekstra djevičansko maslinovo ulje je ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, a koje sadrži najviše 0,8 g slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 g ulja i koje ima druga svojstva sukladna onima, koja su predviđena za ovu kategoriju ulja.

Djevičansko maslinovo ulje je ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, a koje sadrži najviše dva grama masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 g ulja i koje ima druga svojstva sukladna onima, koja su predviđena za ovu kategoriju ulja.

Pravilnik definira i tehnološke postupke koji se primjenjuju u proizvodnji navedenih maslinovih ulja: „*Za proizvodnju ekstra djevičanskog maslinovog ulja i djevičanskog maslinovog ulja koriste se plodovi stabla masline (*Olea europea L.*) koji*

se podvrgavaju isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima, u uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja te bez dodataka pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja. Ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje može se podvrgnuti isključivo postupcima pranja, centrifugiranja, dekantacije i/ili filtracije.“

Da bi plod došao do ulja mora proći kroz dugačak proces prerade koji uključuje nekoliko faza, a one su sljedeće:

- branje plodova,
- čišćenje i pranje,
- mljevenje,
- mijesenje tijesta,
- odvajanje tekućeg od čvrstog dijela tijesta postupcima prešanja, centrifugiranja i perkolacije,
- filtriranje ulja,
- pakiranje u ambalažu,
- skladištenje i zbrinjavanje otpada.

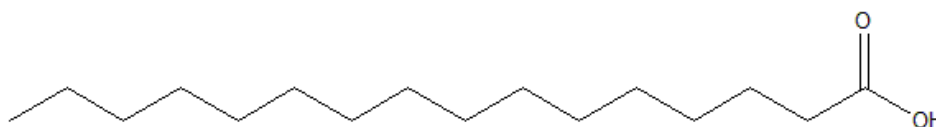
1.4.1. Kemijski sastav maslinovog ulja

Maslinovo ulje sadrži dva osnovna dijela, a to su uljna (osapunjiva) i neuljna (neosapunjiva) frakcija. U uljnoj frakciji glavni spojevi, koji sačinjavaju između 98,5 do 99,5 % ulja, pripadaju skupinama **acilglicerola, slobodnim masnim kiselinama i fosfolipidima**. S druge strane glavni spojevi neuljne frakcije su **ugljikovodici, steroli, tokoferoli, fenoli, triterpenski alkoholi, pigmenti, voskovi, hlapljivi spojevi i ostali** s udjelom od 0,5 do 1,5 %.¹ Navedeni spojevi maslinovom ulju daju jedinstvenu i prepoznatljivu aromu.

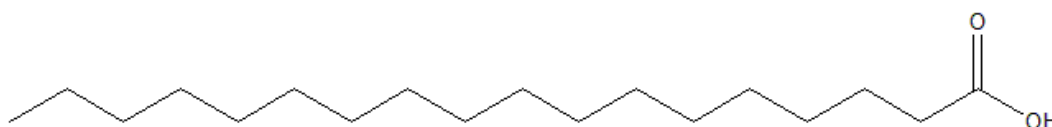
1.4.1.1. Uljna (osapunjiva) frakcija maslinova ulja

Kako je već spomenuto uljna frakcija je jedna od dvije frakcije maslinovog ulja, a s udjelom preko 98 % sačinjava ujedno i najveću frakciju maslinovog ulja. Najznačajniji spojevi ove frakcije su acilgliceroli, masne kiseline i fosfolipidi.

Masne kiseline sadržane su u triacilglicerolima s 95 %. Masne kiseline građene su od jedne karboksilne (-COOH) skupine i dugog alifatskog ugljikovodičnog lanca. Može se dakle reći kako su masne kiseline karboksilne kiseline dugog, u prirodi najčešće ravnog, lanca.⁴ U maslinovom ulju prevladavaju masne kiseline koje sadrže od 12 do 24 ugljikova atoma u lancu, no ipak su najzastupljenije one sa 16 i 18 ugljikovih atoma. Masne kiseline u maslinovom ulju dolaze s parnim brojem C atoma, a to je posljedica toga što svi oni potječu od acetil-CoA, odnosno C₂ građevne jedinice kao preteče. Izuzeci od parnog broja ugljikovih atoma svakako postoje, a to su u slučaju maslinova ulja heptadekanska (C_{17:0}) i heptadecenska kiselina (C_{17:1}). Osim navedenoga, potrebno je naglasiti kako se u maslinovom ulju nalaze zasićene, ali i nezasićene masne kiseline. Od zasićenih kiselina svojim udjelima najzastupljenije su palmitinska ili heksadekanska (C_{16:0}) sa 7,5 do 20 % (slika 9) i stearinska ili oktadekanska kiselina (C_{18:0}) s udjelom od 0,5 do 5 % (slika 10).

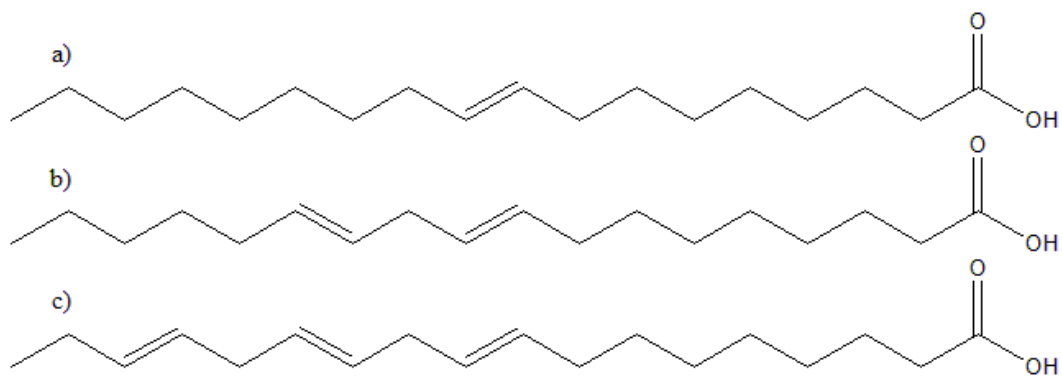


Slika 9. Strukturna formula palmitinske (C_{16:0}) kiseline



Slika 10. Strukturna formula stearinske (C_{18:0}) kiseline

Od nezasićenih masnih kiselina, koje sadrže jednu ili više dvostrukih veza u lancu, najzastupljenije su oleinska ili okta-9-enska kiselina (C_{18:1}) s 55 do 83 %, linolna ili oktadeka-9,12-dienska kiselina (C_{18:2}) te α -linolenska ili oktadeka-9,12,15-trienska kiselina (C_{18:3}) (slika 11). Linolna i α -linolenska kiselina ujedno su i esencijalne masne kiseline. One su neophodne za normalno funkcioniranje ljudskog organizma, ali ih on sam ne može sintetizirati iz drugih masnih kiselina, već ih je potrebno unositi putem hrane ili takozvanih "dodataka prehrani".⁴



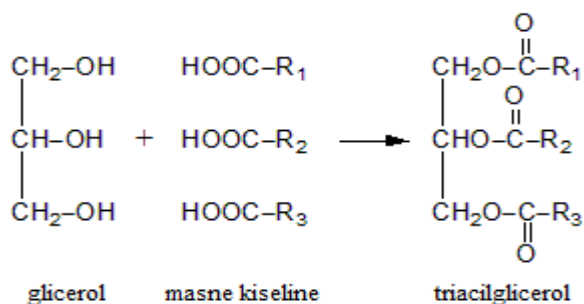
Slika 11. Strukturne formule a) oleinske, b) linolne i c) α -linolenske kiseline

Maslinovo ulje od ostalih biljnih ulja različitim čine udjeli masnih kiselina. Pa tako ono visoke kakvoće sadrži oko 16 % zasićenih masnih kiselina, 70 do 80 % oleinske kiseline te 8 do 10 % esencijalnih masnih kiselina.¹ U tablici 2 dan je prikaz udjela masnih kiselina prisutnih u maslinovom ulju.

Tablica 2. Udjeli masnih kiselina usvojeni od strane Međunarodnog vijeća¹

NAZIV MASNE KISELINE	UDIO, %
oleinska kiselina	55,0 – 83,0
palmitinska kiselina	7,5 – 20,0
linolna kiselina	3,5 – 21,0
stearinska kiselina	0,5 – 5,0
palmitoleinska kiselina	0,3 – 3,5
α -linolenska kiselina	$\leq 0,9$
miristinska kiselina	$\leq 0,1$
arahinska kiselina	$\leq 0,6$
behenska kiselina	$\leq 0,2$
lignocerinska kiselina	$\leq 0,2$
heptadekanska kiselina	$\leq 0,3$
heptadecenska kiselina	$\leq 0,3$
gadoleinska kiselina	$\leq 0,4$
laurinska kiselina	nije definirano

Masnoće, pa onda i ulja, su općenito definirana kao esteri trovalentnog alkohola glicerola i masnih kiselina tj. **gliceridi** ili **acilgliceroli**. Zavisno o broju esterificiranih hidroksilnih (-OH) skupina u glicerolu nastaju mono-, di- i triacilgliceroli (slika 12). Ukoliko su sve tri masne kiseline na glicerolu iste onda se takav acilglicerol naziva jednostavnim, no ukoliko su različite onda je to mješoviti acilglicerol.

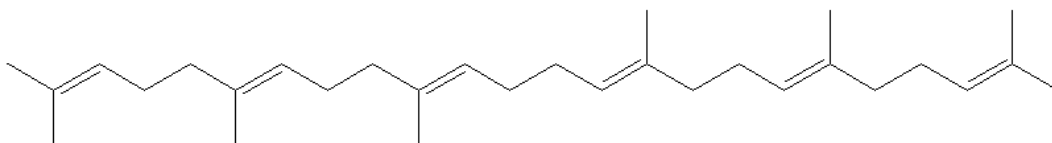


Slika 12. Shematski prikaz reakcije esterifikacije

Kada je riječ o **fosfolipidima** njihova količina u maslinovom ulju ovisi o nekoliko čimbenika. U prvom redu su to sorta masline i način prerade, a zatim i starost ulja. Najzastupljeniji fosfolipidi su fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol, fosfatidilkolin i fosfatidilserin. Udio fosfolipida u maslinovim uljima kreće se od 40 do 135 mg/kg ulja, a upravo njima se pripisuje antioksidacijsko djelovanje.¹

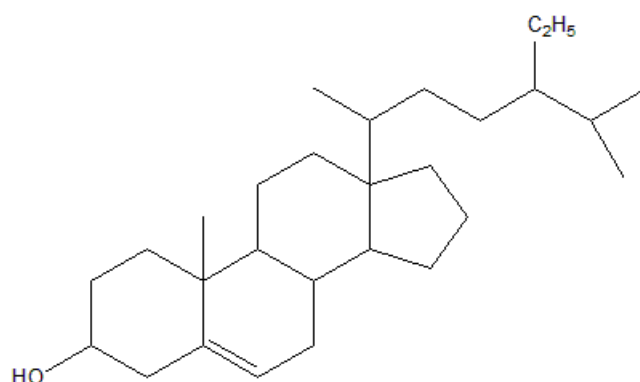
1.4.1.2. Neuljna (neosapunjiva) frakcija maslinova ulja

Prema mnogim analizama pokazalo se kako najveći dio neuljne frakcije sačinjavaju **ugljikovodici** s udjelom od 50 do 60 %. Njihova količina kreće se od 150 do 800 mg/100 g ulja.¹ Najzastupljeniji ugljikovodik je skvalen (slika 13) koji sačinjava oko 90 % ove frakcije što je 200 do 7500 mg/kg ovisno o sorti i načinu prerade. Skvalen je preteča u biosintezi kolesterola, fitosterola i steroidnih hormona. Osim ovog ugljikovodika u ovoj se frakciji također mogu naći diterpenski i triterpenski alkoholi.¹



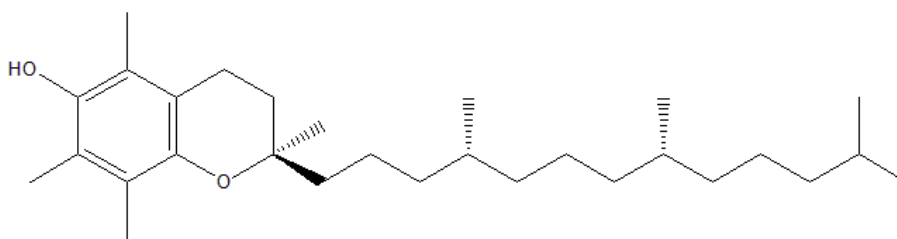
Slika 13. Strukturna formula skvalena

Steroli ili steroidni alkoholi pripadaju skupini prirodnih organskih spojeva koji se nazivaju steroidi, a čija je zajednička strukturna karakteristika ciklopetanofenantrenska jezgra. Prekursor u njihovoj biogenezi je acetil-CoA, dok je središnji međuprodukt skvalen. Po svojoj kemijskoj naravi oni su visokomolekularni ciklički alkoholi.⁴ Najzastupljeniji sterol je β -sitosterol (slika 14) čiji udio u djevičanskom maslinovom ulju može dosegnuti 90 % što je od 1000 do 2000 mg/kg. Nakon njega slijede avenasterol i kampestenol.¹ Kao i svih ostalih spojeva, tako i količina sterola u maslinovom ulju varira u ovisnosti o sorti, klimatskim uvjetima, načinu prerade i skladištenju. Čak oko 25 % sterola može biti izgubljeno u procesu rafinacije. Stoga je parametar koji se najčešće koristi kod određivanja čistoće, kvalitete i autentičnosti maslinovih ulja upravo udio sterola. Kako je rečeno, dio sterola se gubi u procesu rafinacije, pa je njihov udio u rafiniranim maslinovim uljima manji nego što je to kod djevičanskih maslinovih ulja. Veći udjeli sterola dobar su indikator prisutnosti sojinog ulja u maslinovom.



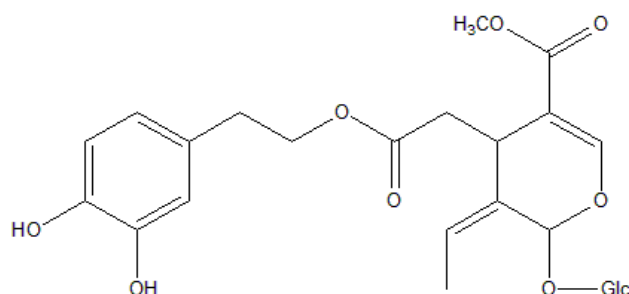
Slika 14. Strukturna formula β -sitosterola

U nizu neosapunjivih spojeva nalaze se i **tokoferoli**, vitamini skupine E. Njihova najznačajnija uloga u živom organizmu je zaštita stanične membrane od oksidacijskog stresa uzrokovanog stvaranjem radikala uslijed razgradnje masnih kiselina.⁴ Ovoj skupini pripadaju četiri spoja, a to su α -, β -, γ - i δ -tokoferol i sva četiri su prisutna u maslinovom ulju. Ipak najveći udio od 55 do 370 mg/kg zauzima α -tokoferol (slika 15). Za razliku od ostalih biljnih ulja maslinovo ne sadrži veliku količinu tokoferola, a jedan od razloga je taj što se jedan dio gubi sazrijevanjem ploda. Drugi razlog tome je proces rafiniranja ulja gdje je gubitak oko 50 %. Od spomenutih tokoferola, α -tokoferol ima najjače vitaminsko, a δ -tokoferol najjače antioksidacijsko djelovanje.¹



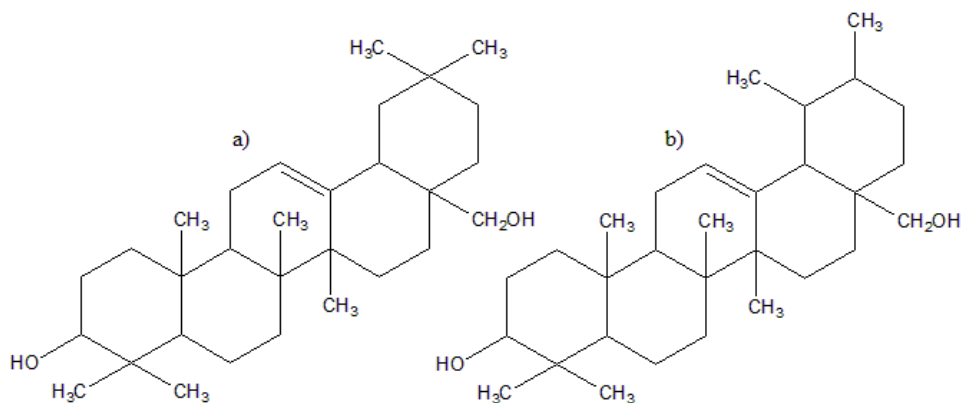
Slika 15. Strukturna formula α -tokoferola

Najznačajniji antioksidansi koji pridonose stabilnosti ulja tj. sprječavaju oksidacijske promjene su **fenoli**. Osim toga upravo je sadržaj fenola u maslinovom ulju pokazatelj njegove kakvoće pa se tako djevičanska maslinova ulja odlikuju visokim sadržajem fenolnih spojeva. Često korišten naziv za ove spojeve u literaturi je polifenoli koji predstavljaju kompleksne smjese vrlo različite kemijske strukture. Upravo je količina i sastav ovih spojeva, koji ulju daju okus gorčine, važan podatak na temelju kojega se određuje sorta, stupanj zrelosti, područje uzgoja, a u konačnici i način prerade. U maslinovom ulju udio polifenola kreće se od 40 pa sve do 1000 mg/kg. Po svojim fizikalnim karakteristikama fenolni spojevi u maslinovom ulju su hidrofilni, a dijele se na fenolne kiseline, fenolne alkohole, flavonoide, sekoiridoide i lignane.¹ Najzastupljeniji spoj hidrofilnih fenolnih spojeva predstavnik je skupine sekoiridoida, a to je oleuropein (slika 16). Udio oleuropeina za života bobice masline nije jednak. Plod sadrži najviše oleuropeina za vrijeme samog rasta. Za vrijeme zrenja dok je plod zelene boje njegova količina počinje se smanjivati, a u fazi kada plod poprimi crnu boju količina oleuropeina je na minimumu. U toj zadnjoj fazi akumuliraju se antocijani koji pripadaju skupini flavonoida. Struka naprednim metodama prerade maslina za cilj ima smanjivanje količine oleuropeina u ulju, a taj proces naziva se odgorčavanje.



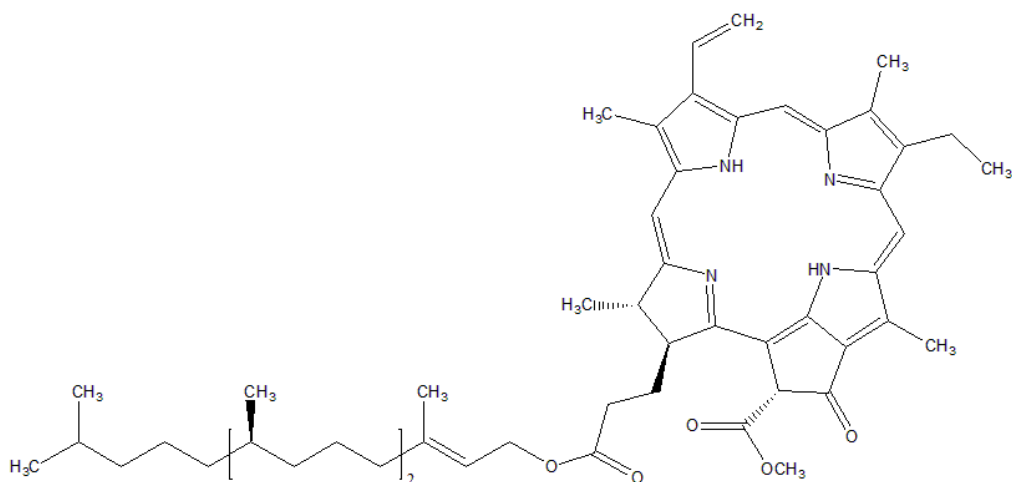
Slika 16. Strukturna formula oleuropeina

Najpouzdaniji spojevi u maslinama koji služe za razlikovanje ulja dobivenih mehaničkim postupcima od ulja dobivenih ekstrakcijom otapalima su **triterpenski alkoholi**. Dva najzastupljenija spoja ove skupine su eritrodiol i uvaol (slika 17). Oni nemaju dokazani utjecaj na zdravlje, no služe kao sortno obilježje.¹



Slika 17. Strukturna formula a) eritrodiola i b) uvaola

Boja maslinova ulja varira između zelene i žute za što su zaslužne dvije skupine **pigmenata**, klorofili i karotenoidi. Količina im ovisi o sorti, zrelosti, načinu prerade i skladištenju. Od klorofila u maslinovom ulju nalaze se klorofil-a i klorofil-b, te feofitin-a i b.¹ U procesu dozrijevanja molekula klorofila-a gubi atom magnezija, a posljedica je prelazak klorofila-a u stabilniji oblik feofitin-a. Ova reakcija odvija se tijekom prerade i skladištenja ulja što u konačnici feofitin-a (slika 18) čini najzastupljenijim klorofilnim pigmentom u maslinovom ulju. Kada su izloženi svjetlu klorofili ubrzavaju proces oksidacije, no u mraku djeluju kao antioksidacijska sredstva.¹

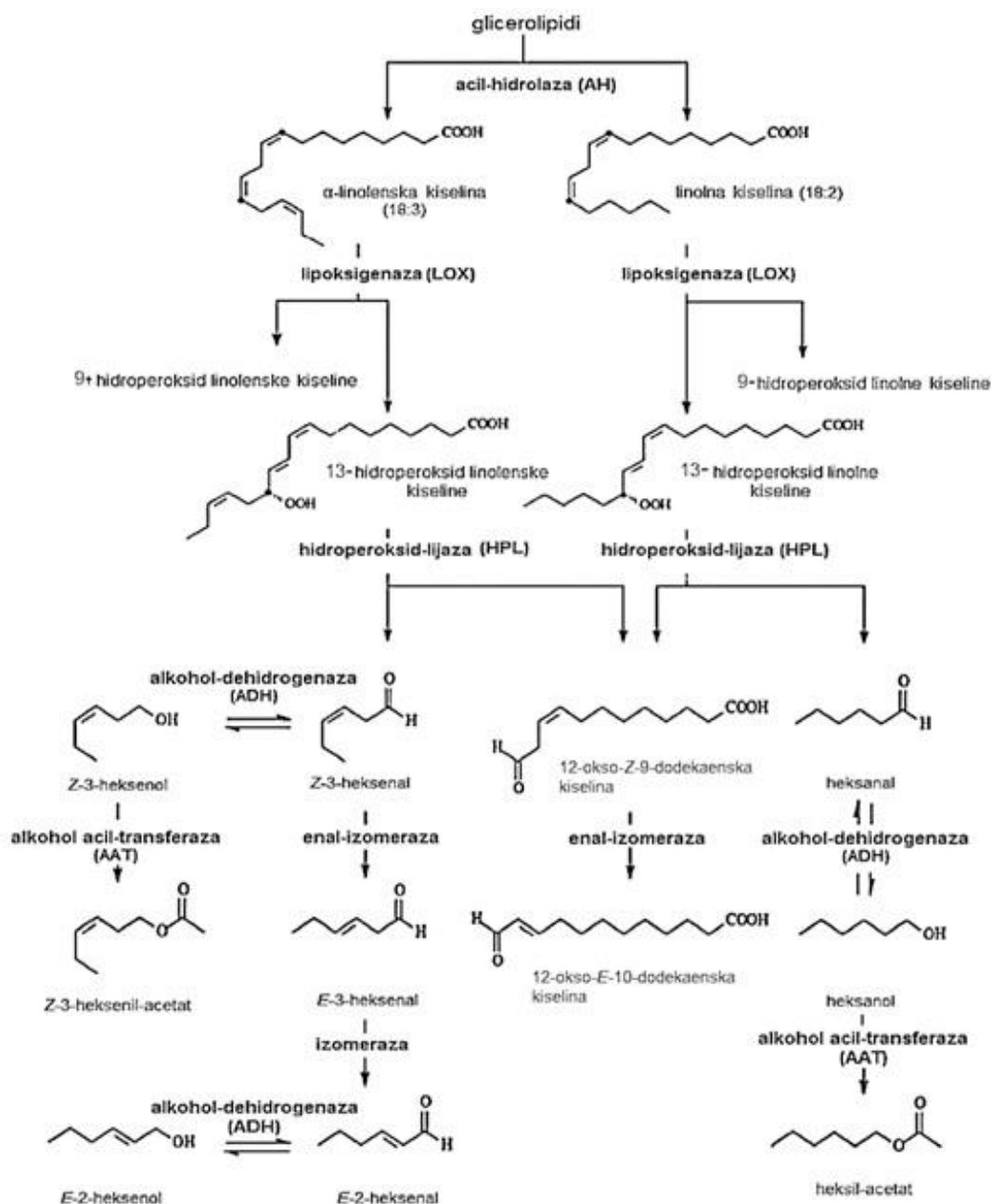


Slika 18. Strukturna formula feofitina

Druga skupina pigmenata maslinovog ulja su karotenoidi. U prirodi vrlo rasprostranjena grupa koju sačinjava oko 600 različitih spojeva. Neophodni su u procesu fotosinteze s obzirom da djeluju kao "hvatači" potencijalno opasnih kisikovih slobodnih radikala, a osim toga upravo oni "guše" pobuđeno stanje klorofila. Prema svojim strukturnim karakteristikama karotenoidi su tetraterpeni sačinjeni od osam izoprenskih jedinica (C₅ jedinica) s tri do čak 15 dvostrukih veza.⁴ Upravo dvostruke veze osiguravaju njihove glavne karakteristike, a to su intenzivna obojenost i vrlo dobro antioksidacijsko djelovanje. Najzastupljeniji karotenoidi u maslinovom ulju su lutein, β -karoten i likopen.

Daljnja komponenta neuljne frakcije maslinovog ulja su **voskovi**. Pojednostavljeno se definiraju kao smjese estera viših masnih kiselina s 14 do 36 ugljikovih atoma i viših monohidroksi alkohola koji sadrže 16 do 36 ugljikovih atoma i jednu -OH skupinu. Najveći dio voskova koji se nalaze u maslinovom ulju esteri su oleinske ili palmitinske kiseline. Voskovi ne sačinjavaju veliki udio djevičanskih maslinovih ulja, njihove količine su uglavnom ispod 150 mg/kg.¹

Na posljetku, potrebno je opisati i skupinu zaslužnu za izrazito prepoznatljivu aromu maslinovog ulja, a to su **hlapljivi spojevi**. U djevičanskim maslinovim uljima identificirano je preko 250 različitih hlapljivih spojeva koji pripadaju različitim klasama. Identificirani su ugljikovodici, alkoholi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, esteri, eteri, a zatim i derivati furana, tiofena te piranoni, tioli i pirazini. Od velike količine različitih spojeva njih 67 doprinosi karakterističnom mirisu, a njih 20 aromi maslinovog ulja. Najzastupljeniji spojevi su C₅ i C₆ hlapljivi spojevi. Od C₆ hlapljivih spojeva potrebno je izdvojiti aldehide heksanal, (*E*)-heks-2-enal i (*Z*)-heks-3-enal koji se reduciraju u alkohole heksan-1-ol i (*Z*)-heks-3-en-1-ol, a koji se u konačnici transformiraju u estere heksil-acetat i (*Z*)-heks-3-enil-acetat. Ulje dobiveno iz plodova ubranih u optimalnom stupnju zrelosti i obrađeno pravilnim tehnikama ekstrakcije sadrži uglavnom hlapljive spojeve koji nastaju razgradnjom linolne i α -linolenske kiseline lipoksigenaznim putem (slika 19).⁵



Slika 19. Shematski prikaz nastanka hlapljivih spojeva lipoksigenaznim putem

Lipoksigenazni put je niz biokemijskih reakcija koje se javljaju tijekom prerade plodova maslina u ulje. U prvom stupnju dolazi do oštećenja tkiva ploda masline pri čemu se oslobađaju enzimi lipoksigenaznog puta. Acil-hidrolaza (AH) prvi je enzim u lipoksigenaznom putu čija je zadaća oslobađanje kiselina iz glicerolipida. Zatim slijedi reakcija oksidacije dvostruko i višestruko nezasićenih masnih kiselina do

hidroperoksida uz pomoć enzima lipoksigenaze (LOX). U idućem koraku enzim hidroperoksid-liaza (HPL) cijepa hidroperoksid pri čemu kao rezultat reakcije nastaju aldehidi sa šest do devet ugljikovih atoma. U zadnjem koraku oslobođeni aldehidi se reduciraju do alkohola uz enzima alkohol-dehidrogenaze (ADH) koji u zadnjem koraku lipoksigenaznog puta djelovanjem enzima acil-transferaze (AAT) prelaze u estere.⁶

Lipoksigenaznim putem uglavnom nastaju spojevi koji stvaraju pozitivna senzorska svojstva djevičanskog maslinovog ulja. Za voćnu aromu odgovorni su već spomenuti (*E*)-heks-2-enal i (*Z*)-heks-3-enal, (*Z*)-heks-3-en-1-ol, (*Z*)-heks-3-enil-acetat te (*Z*)-pent-2-en-1-ol dok su za gorak okus zaslužni 3-metilbutil-acetat, 2-metilpent-4-enal i (*E*)-heks-2-enal. No, neprikladnim skladištenjem, osim boje, mijenjaju se i senzorska svojstva ulja. Takva negativna senzorska svojstva indikator su dotrajalosti proizvoda. Negativna svojstva definiraju se kao izostanak C₆ spojeva aldehida, ketona i estera. U literaturi se često takva svojstva navode kao pljesnivo, vlažno, octikavo, užeglo i upaljeno. Najčešći spojevi odgovorni za navedene negativne senzorske karakteristike su okt-1-en-3-ol, (*E*)-hept-2-enal, okt-1-en-3-on, heksanal, oktanal, octena kiselina, etil-acetat, etil-butanoat, butil-acetat, etil-propanoat i mnogi drugi.⁷

1.5. Aromatizirana maslinova ulja

Kako u zadnje vrijeme maslinovo ulje, kao prepoznatljiv proizvod Mediterana pa i Dalmacije, dobiva sve veću pažnju u industrijskoj proizvodnji tako se sve češće poseže za doradom točnije aromatizacijom već poznate arome. Glavni cilj aromatizacije s jedne strane je udovoljavanje visokim standardima potrošača, a s druge udovoljavanje onim potrošačima kojima okus nearomatiziranog maslinovog ulja nije drag.

Tijekom vremena proizvođači aromatiziranih maslinovih ulja, uglavnom manje manufakture, razvijali su različite tehnike aromatizacije. Jedan od najčešćih načina je jednostavno miješanje ekstrakata aromatičnih biljaka s maslinovim uljem, dok je drugi najčešći način maceracija tj. dodavanje aromatičnih biljaka u ulje. Potrebno je napomenuti kako obje od navedenih tehnika mogu imati i negativne učinke na konačni proizvod kao što su zamucenje, pretjerana aromatizacija ili ekstrakcija nepoželjnih sastojaka poput voskova ili gorčine. Osim ovih primjenjuju se i tehnike kod kojih se plodovima masline ili u maslinovu pastu u procesu drobljenja ili malaksacije izravno dodaje aromatizirani biljni materijal. Kao i prethodno spomenute tehnike i ova ima svojih mana, a jedna od njih je prilagođavanje količine aromatizirane biljke zbog nehomogene raspodjele njezinog ploda, lišća i drvenih dijelova u koraku drobljenja. Jedna od vrlo popularnih biljaka koje se danas koriste u aromatizaciji maslinovog ulja svakako je ružmarin koji ima pozitivan učinak na zdravlje, značajan nutritivni potencijal te antimikrobni, antidiijabetički i antioksidativni učinak.⁸

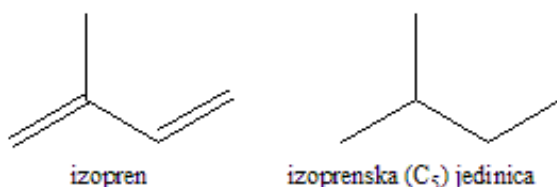
1.5.1. Hlapljivi spojevi u aromatiziranim maslinovim uljima

Kemijski spojevi moraju zadovoljiti nekoliko osnovnih kriterija kako bi se mogli detektirati kao miris u receptorskim stanicama. Prvi uvjet je dovoljna hlapljivost za prodiranje u područje zraka u blizini područja osjeta njuha, slaba topljivost u vodi kako bi tvari prošle kroz sluznicu i njušne stanice, zatim topljivost u lipidima budući da su njušne dlačice izgrađene prvenstveno od lipida. Na kraju je važno reći kako minimalna koncentracija tvari mora biti određeno vrijeme u kontaktu s receptorima.⁹

Hlapljive komponente mogu se podijeliti prema građi u tri glavne skupine, a to su: **terpeni (izoprenoidi), fenilpropani i ostali spojevi.**

1.5.1.1. Terpeni

Naziv terpeni potječe od terpentina, hlapljive tekućine koja se dobiva destilacijom smole drveta bora. Terpeni ili terpenoidi su velika i strukturno vrlo raznolika grupa prirodnih organskih spojeva čiji je osnovni strukturni element spoj od pet ugljikovih atoma, **2-metilbuta-1,3-dien**, trivijalnog imena **izopren** (slika 20.).



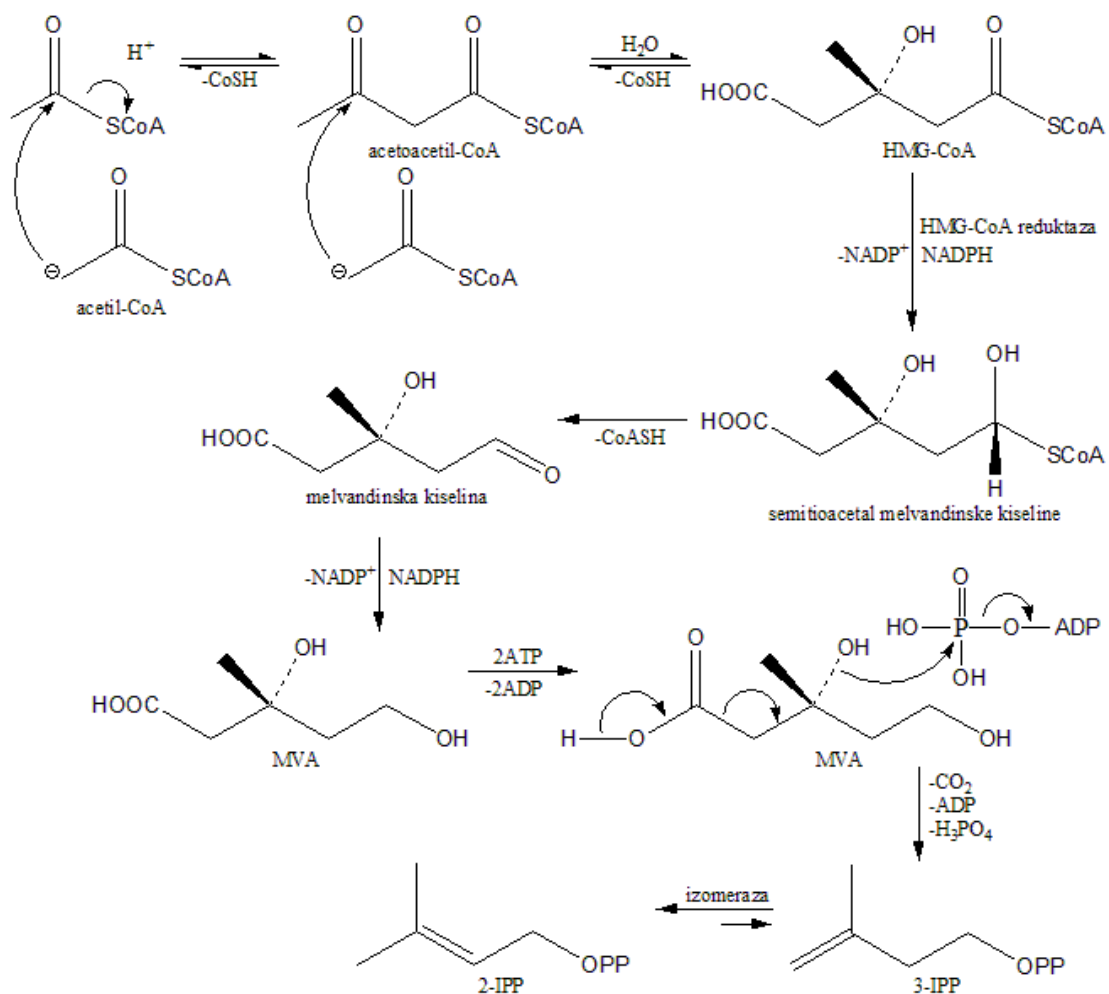
Slika 20. Strukturna formula izoprena i izoprenske jedinice

Pravilni terpeni sastoje se od izoprenskih jedinica povezanih po načelu "glava na rep". Prema takozvanom izoprenskom pravilu koje je ustanovio Otto Wallach 1881. razgranati dio jedne C₅ jedinice povezuje se na nerazgranati dio druge C₅ jedinice. Terpeni mogu biti i nepravilni, a njihove C₅ jedinice ne povezuju se po načelu „glava na rep“.¹⁰ U Tablici 3 prikazana je uobičajena podjela terpena koja se temelji na broju ugljikovih atoma, odnosno izoprenskih jedinica. Osim po broju ugljikovih atoma pravilni terpeni se mogu podijeliti i prema svojoj građi na acikličke, monocikličke, bicikličke i tricikličke.

Tablica 3. Podjela terpenoida prema broju izoprenskih jedinica⁴

NAZIV	BROJ C ATOMA	BROJ IZOPRENSKIH JEDINICA
semiterpenoidi	5	1
monoterpenoidi	10	2
seskviterpenoidi	15	3
diterpenoidi	20	4
sesterterpenoidi	25	5
triterpenoidi	30	6
tetraterpenoidi	40	8
politerpenoidi	5n	n

Terpeni pripadaju skupini prirodnih lipida čiji osnovni strukturni element, izopren, nije uključen u njihovu biosintezu već biokemijski aktivne C₅ jedinice koje su prema kemijskoj građi difosfatni (piruvatni) esteri i to su 2-izopentenil-pirofosfat (2-IPP) ili dimetilalil-pirofosfat (DMAPP) i 3-izopentenil-pirofosfat (3-IPP). 2-IPP i 3-IPP nastaju biosintezom iz mevalonske kiseline (MVA). Terpeni su dakle produkti **mevalonskog biosintetskog puta** čiji je ishodni spoj acetil-CoA, a središnji međuprodukt mevalonska kiselina (slika 21). Biosinteza počinje vezanjem dviju molekula acetil-CoA u acetoacetyl-CoA. Dalje se na acetoacetyl-CoA veže još jedna molekula acetil-CoA pri čemu nastaje tioester β -hidroksi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Redukciju tioestera do mevalonske kiseline preko semitioacetala omogućava enzim HMG-CoA reduktaza. MVA se zatim transformira u fosforiliranu izoprensku jedinicu u seriji reakcija koje su inicirane fosforilacijom primarne alkoholne skupine nakon čega slijedi dekarboksilacija koja daje 3-IPP. 3-IPP se dalje izomeriza u 2-IPP.¹⁰



Slika 21. Biosinteza 2-IPP i 3-IPP u mevalonskom biosintetskom putu

1.5.1.2. Fenilpropanski derivati

Prirodni organski spojevi koji sadrže fenilni prsten s jednim bočnim propanskim lancem nazvani su fenilpropanski derivati (fenilpropanoidi). No, svima je zajedničko jedno, a to je da se svi izvode iz cimetine kiseline. Fenilpropanski derivati se dijele na fenilpropanske kiseline, fenilpropene i kumarine. Posebnu grupu fenilpropanskih derivata čine spojevi čiji je bočni lanac ili skraćen ili eliminiran. U tu skupinu pripadaju fenilkarboksilne kiseline i jednostavni fenoli.⁹

1.5.1.3. Ostali spojevi

U ovu skupinu najčešće se ubrajaju lančani ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom. Osim toga tu su i spojevi s dušikom i sumporom. Neka eterična ulja izoliraju se iz biljaka koje sadrže glukozinolate. Tijekom procesa destilacije glukozinolati se razgrađuju u produkte s dušikom i sumporom. Upravo ti produkti prema kemijskom sastavu mogu biti različite klase spojeva, a uključuju tiocijanate, izotiocijanate, nitrile i mnoge druge.

1.6. Agrumi (lat. *Citrus*)

Agrumi ili citrusi su biljke iz reda Sapindoliki (lat. *Sapindales*) i porodice Rutaceae koja potječe iz područja jugoistočne Azije gdje vlada tropska klima. Porodica Rutaceae broji 160 rodova i oko 2070 različitih vrsta. Uključuje drvenasto grmlje, drveće i nekoliko zeljastih trajnica. Biljke iz porodice agruma za vrijeme cvata uglavnom imaju cvjetove s pet bijelih latica, a zreli plodovi prekriveni su poprilično debelom kožom.^{11,12}

Agrumi se odlikuju intenzivnim i karakterističnim mirisima za koje su zaslužna eterična ulja sadržana unutar debele kože, a često i unutar samog mesa ploda. Agronomski i ekonomski važni citrusi su **limun** (*Citrus limon* L.), **limeta** (*C. aurantiifolia* L.), **slatka naranča** (*C. sinensis* L.), **gorka naranča** (*C. aurantium* L.), **mandarina** (*C. reticulata* L.), **grejp** (*C. paradisi* L.), **četrun** (*C. medica* L.) i **pomelo** (*C. maxima* L.).

1.6.1. Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.)

Plodovi gorke naranče (slika 22) dobar su izvori **limonena** i **alifatskih aldehida**, a osim toga utvrđena je prisutnost biogenih **amina** i **flavanona**. Upravo zbog te činjenice *C. aurantium* koristi se za liječenje bolesti poput anksioznosti, karcinoma pluća i prostate te gastrointestinalnih poremećaja i pretilosti.¹³ Od cvijeta gorke naranče proizvodi se eterično ulje, **neroli**, pa se osim u ljekovite upotrebljava i u kozmetičke svrhe. Uzgaja se pretežno na Mediteranu, a u Hrvatskoj se može naći na području Dubrovnika, otoka Korčule, Mljeta, Hvara i Visa.

Nadalje, u ekstraktu gorke naranče identificiran je protoalkaloid *p*-sinefrin koji se koristi u proizvodima za mršavljenje. Od davnina ljudi su koristili pripravke biljke *Ephedra sinica* iz porodice Ephedraceae kao suplemente za mršavljenje. Ti pripravci sadrže alkaloid efedrin, stoga je nekontrolirana upotreba takvih pripravaka dovela do niza smrtnih slučajeva, a svi su se povezivali s prekomjernim dozama. Od 2004. godine Američka agencija za hranu i lijekove (*U.S. Food and Drug Administration*) zbog niza smrtnih slučajeva zabranila je korištenje pripravaka od biljke *Ephedra sinica*. Znanstvenici su zamjenu za Ephedru našli u gorkoj naranči jer sadrži daleko sigurniji *p*-

sinefrin, alkaloid tipa fenil-etanolamina, koji je kemijski sličan adrenergičkim agensima i služi kao sredstva za suzbijanje apetita



Slika 22. Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.)

1.7. Ljekovito i aromatično bilje

Svjetska zdravstvena organizacija WHO (*World Health Organization*) definirala je aromatične biljke kao "*...vrstu bilja čiji jedan ili više biljnih dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može koristiti u terapijske svrhe ili kemijsko-farmaceutske sinteze.*" Osim toga WHO definirala je i biljne lijekove i to na sljedeći način: "*Biljni lijekovi uključuju bilje, biljne materijale, biljne pripravke i gotove biljne proizvode koji kao aktivne sastojke sadrže dijelove biljaka i/ili drugi biljni materijal i/ili njihove kombinacije.*" S druge strane prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji aromatično bilje definirano je i kao "*...vrsta bilja koje sadrži jednu ili više aktivnih tvari posebnog mirisa ili okusa, koje se koriste za spravljanje mirisa, kozmetičkih proizvoda, napitaka, aroma za živežne namirnice.*"¹⁴

S obzirom na sve veće težnje ka zdravijem načinu života i u farmaceutici se sve više poseže za aktivnim tvarima biljnog podrijetla pa je tako više od polovice aktivnih tvari u lijekovima i kozmetici prirodnog i to pretežno biljnog podrijetla. Biljne vrste koje se ubrajaju u ljekovite ili aromatične su raznih rodova i porodica, one mogu biti jednogodišnje ili trajnice, a osim toga rastom mogu biti grmolike ili drvenaste, s plodovima ili bez njih. U Hrvatskoj se prema nekim podacima uzgaja oko 150 ljekovitih vrsta na oko 2500 hektara, a među njima najveći udio zauzima kamilica.

1.7.1. Origano (*Origanum vulgare* L.)

U narodu još poznat pod nazivom mravinac ili divlji mažuran, origano pripada porodici Lamiaceae ili usnača. Origano je samonikla, višegodišnja, mediteranska biljka karakteristične opore arome. Origano je začinska biljka, a kao začim se upotrebljava nadzemni dio biljke, točnije tamnozeleni listovi osušeni i mljeveni. Za vrijeme cvata, od srpnja do rujna, na vrhu stabljike visoke između 50 i 80 cm oblikuju se skupine od sedam do devet bijelih, žutih, ružičastih ili ljubičastih cvjetova dugih oko 4,5 cm. Plod je sitan, žuto-smeđ, ovalan i nepravilnog oblika (slika 23).¹⁵ Cijela biljka ima vrlo ugodan miris zahvaljujući eteričnom ulju sadržanom najvećim dijelom u listovima biljke, a čiji je udio tek 0,8-1,5 %. Glavni spojevi eteričnog ulja origana su **karvakrol**, **β -bisabolen** i nešto manjim udjelom **linalol**.¹⁶



Slika 23. Origano (*Origanum vulgare* L.)

Eterično ulje dobiveno destilacijom biljke upotrebljava se kao mirisna komponenta u kozmetičkim proizvodima, kao sastojak prehrambenih aroma i u aromaterapiji. Djelovanje eteričnog ulja je hipotenzivno, vazodilatirajuće, umirujuće, antialergijsko, antivirusno, protuupalno, analgetičko. Primjenjuje se kod umirivanja tegoba uzrokovanih stresom i nervozom te liječenja tahikardije, hipertireoze i neuralgije. Origano se također primjenjuje i kod tegoba probavnog i dišnog sustava, reumatskih tegoba te za jačanje imunostava.¹⁴

1.7.2. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ružmarin je grmolika zimzelena biljka rasprostranjena na čitavom Mediteranu pa tako i na hrvatskoj obali i otocima. Može izrasti i do tri metra u visinu. Njezini uski i kožnati listovi dugački oko tri centimetra s gornje strane su tamnozeleni, a s donje sivobijele boje (slika 24). Za vrijeme cvata razvija svijetloplave cvjetove. Miris ružmarina je jak i kamforast, a okus svježih listova je gorak i ljut. Svoju aromatičnost ova biljka također duguje eteričnim uljima, a njihova količina i kvaliteta ovise uvelike o klimatskim uvjetima. Spomenuto eterično ulje najčešće se dobiva destilacijom listova, a u kemijskom pogledu sadrži najveći udio **α -pinena**, **1,8-cineola**, **kamfena**, **kamfora** i ***p*-cimena**.¹⁴



Slika 24. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Eterično ulje ružmarina upotrebljava se također u kozmetičke svrhe, ali i kao začin u aromaterapiji. Djeluje kao analgetik, stimulirajuće kod kronične iscrpljenosti te potiče rast kose. Osim toga pokazuje pozitivan učinak kod liječenja reumatskih bolova, grčeva i zubobolje te ublažavanja mišićne napetosti. Visoki udio kamfora u eteričnom ulju ružmarina može štetno djelovati na trudnice, malu djecu i osobe koje boluju od epilepsije.

1.8. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi su nepolarne molekule, s obzirom na tu fizikalnu karakteristiku oni su netopljivi ili slabo topljivi u vodi. Upravo na toj činjenici počivaju sve metode izolacije hlapljivih spojeva iz bilja. Najjednostavnija metoda izolacije je **prešanje**, a osim te metode primjenjuju se još metode **destilacije i ekstrakcije**.¹⁷

Kako bi se sam proces izolacije aromatičnih spojeva odvio što efikasnije potrebno je dobro poznavati biljni materijal i njegove spojeve. Vrlo često spojevi od interesa nisu prisutni u visokim koncentracijama nego upravo suprotno, prisutni su u tragovima. Upravo zato pri odabiru najpogodnije metode izolacije treba odabrati onu koja će osigurati izdvajanje spojeva koji sačinjavaju izvornu aromu aromatične biljke. U detaljnim istraživanjima potrebno je provesti nekoliko različitih ekstrakcijskih tehnika jer na taj način se kao rezultat može dobiti detaljan profil arome.⁹

1.8.1. Destilacija

Destilacija je postupak kod kojega se, pojednostavljeno govoreći, tekuća smjesa zagrijava i prevodi u paru, a potom se ta ista para hladi i kondenzira. Može se ukratko reći kako je svrha destilacije zapravo razdvajanje tekućih smjesa na temelju njihova vrelišta.

Kod izolacije eteričnog ulja iz aromatičnog bilja destilacijom zagrijava se smjesa biljnog materijala i vode i/ili vodene pare. Hlapljive organske tvari, koje se ne miješaju s vodom, isparavaju zajedno s vodenom parom na temperaturi nižoj od temperature vrelišta vode. Ovu pojavu objašnjava **Daltonov zakon parcijalnih tlakova** koji kaže: *„...tlak para iznad heterogene smjese jednak je zbroju parcijalnih tlakova pojedinih komponenata za datu temperaturu, bez obzira na sastav smjese“*. To znači da se svaka tvar prisutna u sustavu ponaša kao čista tvar. Kako je prema navedenom zakonu ukupni tlak para iznad heterogene otopine veći od parcijalnih tlakova pojedine komponente, a temperatura vrelišta označava upravo onu temperaturu pri kojoj je tlak para otopine dosegnuo vanjski tlak, to u konačnici znači kako će se tlak smjese izjednačiti s vanjskim tlakom pri nižoj temperaturi, s obzirom da je ukupni tlak smjese zbroj parcijalnih tlakova. Navedeno za posljedicu ima da je vrelište heterogene smjese niže od vrelišta bilo koje komponente.⁹

Kako je već rečeno, destilacija je proces koji se provodi pri povišenim temperaturama, a upravo to je glavni nedostatak ove metode. Naime, pri visokim temperaturama u smjesi mogu nastati spojevi koji izvorno nisu prisutni u biljnom materijalu iz kojeg se izoliraju hlapljivi spojevi. Takvi spojevi nazivaju se artefaktima. Osim toga postoji opasnost od hidrolize hlapljivih spojeva, najčešće estera, uslijed prisustva velike količine otapala tj. vode i blago kiselog pH. No, destilacija ima i prednosti, jedna od njih je da ekstrakt ne sadrži nehlapljive tvari koje vriju na vrlo visokim temperaturama, a osim toga destilacijom je omogućeno koncentriranje uzorka što pruža mogućnost detekcije tvari koje su sadržane u tragovima.

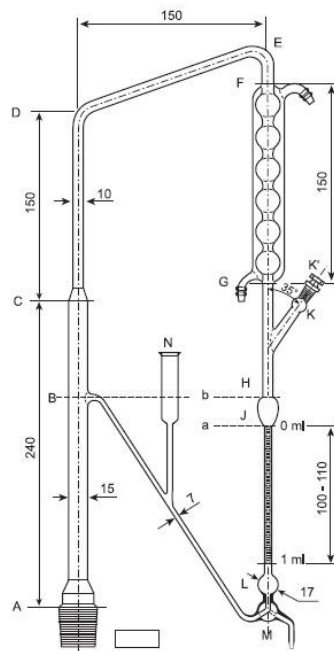
S obzirom na razvoj znanosti, tehnika i metoda, danas se u kemiji koristi nekoliko vrsta destilacija u svrhu izolacije hlapljivih spojeva, a to su:

- vodena destilacija (hidrodestilacija),
- vodeno-parna destilacija,
- destilacija vodenom parom (parna destilacija).

Navedene vrste destilacija temelje se na istim fizikalnim zakonima, a razlikuju se u načinu kontakta biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.

1.8.1.1. Hidrodestilacija

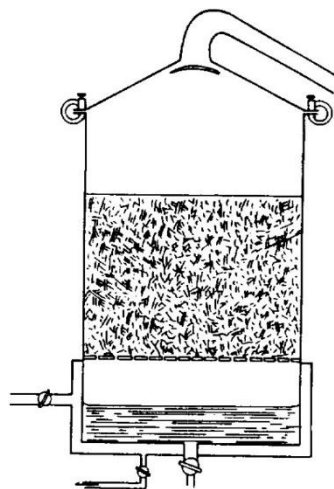
Najstarija, najjednostavnija, ali i najskuplja vrsta destilacije je vodena destilacija. Zasniva se na **direktnom kontaktu** usitnjenog biljnog materijala i vode na temperaturi vrenja. Može se reći kako se biljni materijal pri ovoj vrsti destilacije "kuha" u vodi. Pare koje pri tome nastaju zajedno s hlapljivim komponentama aromatičnog bilja, hlade se i sakupljaju u spremnike. Dobivene frakcije, voda i eterično ulje, se naknadno odvajaju. Smjesa biljnog materijala, tj. aromatične biljke i vode zagrijava se direktno plamenom ispod tikvice za destilaciju ili kotla, no moguće je zagrijavanje i unutarnjim grijanjem spiralnim cijevima grijača. U industriji, zbog svoje visoke cijene, vodena destilacija se gotovo i ne koristi. Umjesto tog postupka sve više je u upotrebi metoda parne destilacije. Ipak, hidrodestilacija se koristi za izolaciju aromatičnih spojeva u laboratoriju. Neke od standardnih aparatura koje se koriste u laboratoriju su aparatura po Europskoj Farmakopeji (slika 25), aparatura po Unger-u, aparatura po Clavenger-u i njihove modifikacije.⁹



Slika 25. Aparatura za destilaciju prema Europskoj Farmakopeji 5.0 (shematski prikaz s dimenzijama u mm)

1.8.1.2. Vodeno-parna destilacija

Kod vodeno-parne destilacije biljni materijal **nije u direktnom doticaju** s vodom već sa zasićenom vodenom parom niskog tlaka. Biljni materijal se postavlja na perforiranu podlogu koja se nalazi na određenoj udaljenosti od dna kotla ispunjenog vodom (slika 26).

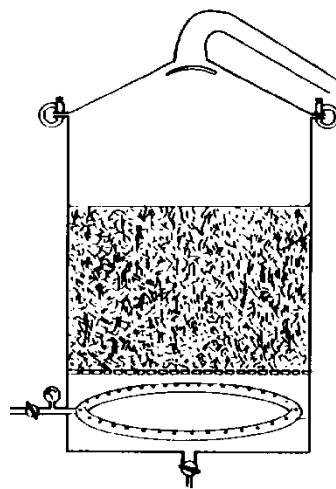


Slika 26. Kotao za vodeno-parnu destilaciju biljnog materijala

Vodena para stvara se u kotlu izravnim ili neizravnim zagrijavanjem kao i kod hidrodestilacije. Proizvedena vodena para prolazi kroz otvore perforirane ploče i sa sobom odnosi hlapljive spojeve iz biljnog materijala ka vrhu kotla. Od tuda se odvede zajedno s vodenom parom u kondenzator gdje se ukapljaju hlađenjem te sakupljaju u posebnim posudama. Za jednoličan prolaz para kroz biljni materijal i što veće iskorištenje procesa važno je da biljni materijal ne bude previše usitnjen. Također para nikad ne smije biti pregrijana. Ova metoda se pretežito koristi u industrijskom mjerilu, dok se u laboratoriju koristi za izolaciju manje osjetljivih eteričnih ulja.⁹

1.8.1.3. Destilacija vodenom parom

Od svih destilacija u industrijskim pogonima najčešće korištena je parna destilacija. Osobito je pogodna za izolaciju eteričnih ulja iz svježeg biljnog materijala te za izolaciju endogeno lokaliziranih eteričnih ulja. Kod ove destilacije, kao i kod vodeno-parne, biljni materijal **nije u direktnom kontaktu** s vrijućom vodom. Vodena para stvara se u odvojenom generatoru u čiju svrhu se najčešće koriste metalni kotlovi. Sustavom cijevi pregrijana vodena para povišenog tlaka dovodi se u kotao s biljnim materijalom (slika 27). Vodena para iznosi eterično ulje iz biljnog materijala u kondenzator gdje se pare ukapljuju, a potom se ulje odjeljuje od vode u separatoru. Parna destilacija je izrazito pogodna za izolaciju eteričnih ulja jer umanjuje nastajanje artefakata.⁹



Slika 27. Kotao za parnu destilaciju eteričnih ulja

1.8.2. Ekstrakcija

Za biljni materijal koji sadrži male količine hlapljivih sastojaka, sastojke dobro topljive u vodi te za cvjetove koji sadrže vrlo fine mirisne sastavnice često je destilacija neprikladna metoda izolacije pa se kod takvih materijala koriste tehnike ekstrakcije. Općenito govoreći ekstrakcija je postupak odjeljivanja tvari iz biljnih materijala na temelju različite topljivosti u ekstrakcijskom sredstvu, organskom otapalu, koje se s tom otopinom ne miješa. Temelji se na različitoj topljivosti tvari u dva otapala koja se ne miješaju. Taj princip opisuje **Nernst-ov zakon raspodjele** prema izrazu:

$$K = c_1 / c_2$$

gdje je K koeficijent razdiobe, a c_1 i c_2 su ravnotežne koncentracije iste tvari u dva različita otapala. Faktori koji mogu imati utjecaj na proces ekstrakcije su temperatura, veličina čestica, gibanje otapala i pH-vrijednost. Da bi se proces ekstrakcije olakšao potrebno je usitniti biljni materijal jer tada ekstrakcijski proces ovisi isključivo o temperaturi što onda pogoduje topljivosti. Otapala pogodna za ekstrakciju biraju se prema kriteriju polarnosti i temperaturi vrenja. Osim toga potrebno je da budu nezapaljiva, neotrovnna, inertna za tvari koje se ekstrahiraju i jeftina. U upotrebi su najčešće dietil-eter, pentan, izopentan, diklormetan, smjesa pentana i diklormetana, petrol-eter, benzen i etanol. S obzirom na otapalo najprimjenjivanija je i najjednostavnija metoda ekstrakcije hlapljivim nevodnim otapalima, koja se može podijeliti na:

- ekstrakciju etanolom,
- ekstrakciju organskim otapalima izuzev etanola.

S obzirom na vrstu faze iz koje se izdvajaju hlapljivi aromatični spojevi, ekstrakcije se mogu podijeliti u dvije skupine, a to su:

- ekstrakcija tekuće-tekuće koja može biti:
 - diskontinuirani proces, naziva se još i izmućkavanje, a izvodi se u lijevku za odjeljivanje,
 - kontinuirani proces koji se izvodi u komercijalno dostupnim ekstraktorima različite izvedbe,

- ekstrakcija čvrsto-tekuće, gdje se ekstrakcija organske tvari iz čvrste faze može izvesti zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim hladilom ili ekstrakcijom kao što je aparatura po Soxhletu.

1.8.2.1. Ekstrakcija etanolom

Za izolaciju aromatičnih spojeva iz suhog biljnog materijala najpogodnija je ekstrakcija etanolom. Ova vrsta ekstrakcije ne koristi se za izolaciju spojeva iz svježeg materijala zbog visokog udjela vode. Za ovakvu ekstrakciju često je potrebno jako dugo vremena, ponekad i do nekoliko mjeseci. Osim toga postupak je vrlo skup te se upravo zbog te dvije činjenice vrlo rijetko koristi. Za razliku od ekstrakcije s ostalim organskim otapalima, etanol se u ovom slučaju ne uklanja. Tako dobivena alkoholna otopina aromatičnih spojeva naziva se **tinktura**, a koristi se u farmaciji gdje se na ovaj način ekstrahiraju farmakološki aktivne tvari iz prirodnog, najčešće biljnog materijala.⁹

1.8.2.2. Ekstrakcija organskim otapalima izuzev etanola

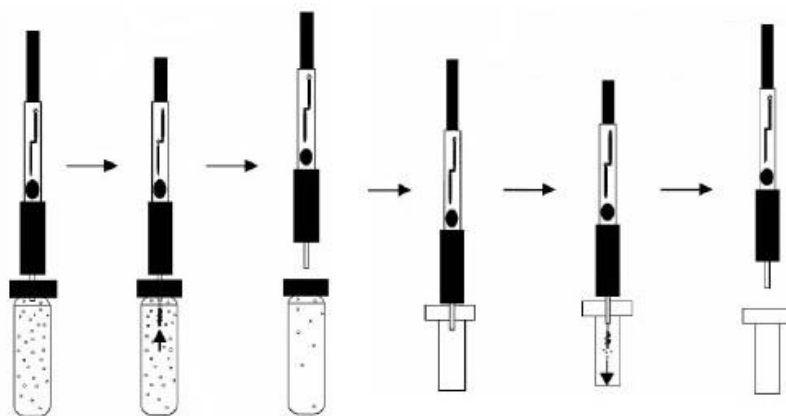
Najpogodnija vrsta ekstrakcije za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala ili vodenih otopina nakon destilacije je ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima, a najčešće su to dietil-eter, pentan, izopentan, diklormetan, smjesa pentana i diklormetana, petrol-eter i benzen. Najjednostavnija izvedba ove metode ekstrakcije je potapanje biljnog materijala u organskim otapalima koja ekstrahiraju hlapljive sastojke. Nakon procesa ekstrakcije, koji se odvija određenim periodom vremena, slijedi dekantiranje i/ili filtriranje kako bi se iz otapala uklonio sav biljni materijal, a potom je potrebno ukloniti otapalo nekom od destilacijskih metoda. Kako u praksi ne postoji idealan proces, tako i ova vrsta ekstrakcije ima svoje nedostatke. Jedan od njih je mogući gubitak hlapljivih spojeva za vrijeme otparavanja otapala, stoga se tom koraku treba pristupiti s oprezom. Ovako dobiveni ekstrakti su zbog zaostalih visokomolekulskih spojeva često polutvrde konzistencije i nazivaju se **konkrete**. Daljnja obrada konkreta najčešće se provodi ekstrakcijom s apsolutnim etanolom čime se uklanjaju visokomolekulski spojevi. Konačan produkt navedenog procesa je **apsolut**.

1.8.3. Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike pokazuju prednosti u vidu brze ekstrakcije hlapljivih spojeva bez korištenja otapala, a osim toga ne zahtijevaju prethodnu koncentraciju aromatičnih spojeva. Ove tehnike temelje se na raspodjeli organskih komponenata između vodene ili parne faza i tankog polimernog filma. Sorpcijske tehnike uključuju mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME), headspace sorpcijsku ekstrakciju (eng. *headspace sorptive extraction*, HSSE) i sorpcijsku ekstrakciju na miješajućem štapiću (engl. *stir bar sorptive extraction*, SBSE).²⁰

1.8.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) često se koristi za analizu aromatičnih spojeva. Ova tehnika koristi tanko vlakno, duljine 1 do 2 cm prekriveno polimernim filmom za adsorpciju hlapljivih spojeva iz uzorka aromatičnog bilja. Izvedba sustava je vrlo jednostavna. Vlakno je smješteno unutar igle koja se nalazi u SPME držaču za uzorkovanje i desorpciju (slika 28).



Slika 28. Shematski prikaz uzorkovanja HS-SPME tehnikom

Uzorkovanje se provodi tako da se SPME bočica, takozvana vijala, napuni uzorkom do određene visine te se potom hermetički zatvori septom. Vlakno se potom kroz iglu uvodi u prostor iznad uzorka ili se uranja u tekuće uzorke. Nakon određenog vremena uzorkovanja, koje uključuje i zagrijavanje uzorka, hlapljive tvari koje su

isparile i ispunile prostor iznad uzorka unutar vijale se adsorbiraju na vlakno. Vlakno se zatim uvlači natrag u iglu i desorbira izravnim injektiranjem u plinski kromatograf. SPME vlakno se obnavlja zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa 5 do 15 min. Vlakna koja se koriste u HS-SPME analizi mogu biti različita pa je tako danas na tržištu dostupan veliki broj različitih vlakana, polarnih, nepolarnih i mješovitih.²⁰

Prednosti ove tehnike su brzina i jednostavna upotreba, za analizu se ne koristi otapalo, a osim toga opisana tehnika je dobra za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju nepoželjnih mirisa. Jedan od glavnih nedostataka ove tehnike je što je aromatični profil hlapljivih spojeva ovisan o vrsti, debljini i dužini vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja. Osim toga, neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve, a najbolji rezultati za usporedbu se dobivaju upotrebom istog vlakna na svim uzorcima.

1.9. Analiza hlapljivih spojeva

Organska analiza eteričnih ulja tj. hlapljivih spojeva aromatičnog bilja, započinje određivanjem osnovnih fizikalnih i kemijskih vrijednosti. No, to daje tek djelomičan uvid u sastav eteričnog ulja dobivenog iz biljnog materijala. Na osnovu takvih podataka može se zaključiti samo koja klasa spojeva je sadržana u samom ulju. Daljnji tijek analize uključuje korištenje instrumentnih metoda analize. Danas je u tom pogledu najprimjenjivija metoda plinske kromatografije (engl. *gas chromatography*, GC). Uređaj za plinsku kromatografiju sastoji se od nekoliko dijelova, a to su: injekcijski blok, kolone sa stacionarnom ili nepokretnom fazom koja se nalazi u prostoru kontrolirane temperature tj. termostatu, zatim detektora, pojačala signala i računala. Preduvjet za valjanost GC analize u prvom redu je hlapljivost i stabilnost analiziranih spojeva na temperaturi rada kolone. Unutar kromatografske kolone nalazi se nepokretna faza sustava, koja je tekućina nanosena na kruti adsorbens, kod punjenih kolona, ili vezana za stijenke kapilare kod kapilarnih kolona. Pokretnu ili mobilnu fazu predstavlja plin nositelj, najčešće su to helij, dušik i neon, koji mora biti inertan kako u sustavu ne bi došlo do popratnih neželjenih reakcija.⁹

Dio sustava za kromatografiju je i detektor, koji služi za detekciju sastojaka koji se eluiraju s kolone. Postoje razne varijante detektora, a neki od njih su:

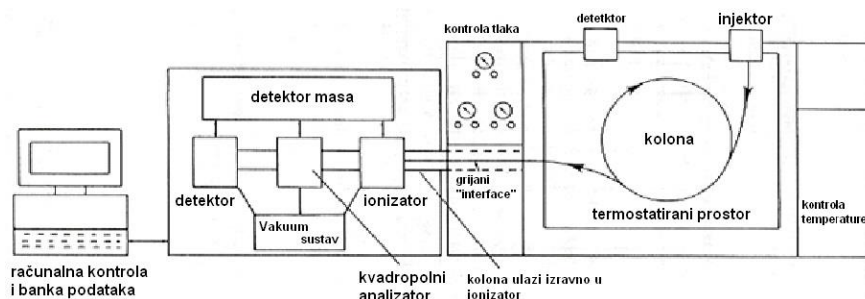
- plameno-ionizacijski detektor,
- detektor toplinske vodljivosti,
- plameno-fotometrijski detektor,
- foto-ionizacijski detektor,
- detektor apsorpcije elektrona,
- spektrometar masa.

Masena spektrometrija (engl. *mass spectroscopy*, MS) je spektroskopska analitička metoda koja pruža najveći broj podataka koji su potrebni za identifikaciju i određivanje strukture organskih spojeva. Kod ove metode molekule se u prvom koraku ioniziraju, pri čemu se ioni razdvajaju prema omjeru mase i naboja. Spektar masa karakterističan je za svaku pojedinu tvar. Prednost spektrometrije masa je njena visoka osjetljivost i točnost.²¹

1.9.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Vežanjem plinskog kromatografa i spektrometra masa u jedan sustav stvorena je pouzdana metoda analize koja pruža mogućnost za vrlo precizno određivanje hlapljivih spojeva. Plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) je analitička tehnika izrazito pogodna za razdvajanje i strukturnu analizu hlapljivih spojeva uz korištenje minimalne količine uzorka.⁹ Plinska kromatografija vrlo je precizna metoda za kvantizaciju smjesa, ali je nepouzdana za kvalitativno određivanje. Spektrometrija masa je pak vrlo pogodna za kvalitativnu analizu zbog čega služi kao osjetljiv detektor plinskom kromatografu. Njihovom kombinacijom može se postići osjetljivost instrumenata u redu pikogramskih i femtogramskih količina uzoraka.²² Osnovne komponente GC-MS uređaja (slika 29) su:

- boca s plinom nositeljem,
- injektor,
- peć s kromatografskom kolonom,
- maseni detektor,
- računalo.



Slika 29. Shematski prikaz vezanog GC-MS sustava

GC-MS analiza sastoji se od nekoliko koraka. Prvi korak je injektiranje uzorka u injektor kromatografa gdje se isti prevodi u plinovito stanje. Potom uzorak nošen inertnim plinom nositeljem ulazi u kromatografsku kolonu gdje dolazi do procesa odjeljivanja sastojaka smjese. Nakon elucije, odijeljeni sastojci nošeni plinom nositeljem odlaze u detektor, spektrometar masa, gdje se isti detektiraju. Identifikacija nepoznatog spoja provodi se usporedbom masenog spektra s masenim spektrima poznatih tvari.⁹

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

NAZIV: Maslina (*Olea europea* L.)

CARSTVO: *Plantae*

RED: *Lamiales*

PORODICA: *Oleaceae*

ROD: *Olea*

VRSTA: *Olea europea*

U eksperimentalnom radu korištena su tri nearomatizirana ulja (**uzorak 1:** Jelsa, Hvar; **uzorak 2:** Svirče, Hvar; **uzorak 3:** Postira, Brač) i tri aromatizirana maslinova ulja proizvedena u uljari Anzulović, Hvar. Od aromatiziranih maslinovih ulja u ovom radu korištena su:

- maslinovo ulje aromatizirano gorkom narančom,
- maslinovo ulje aromatizirano origanom,
- maslinovo ulje aromatizirano ružmarinom.

2.2. Kemikalije i aparatura

Pri izradi ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- pentan, pro analysis (p.a.), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska,
- dietil-eter, pro analysis (p.a.), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska,
- natrijev klorid, pro analysis (p.a.), *Fluka Chemie*, Švicarska.

Pri izradi ovog završnog rada korištene su sljedeće aparature:

- analitička vaga Ohaus model EX125D, *Ohaus*, SAD,
- modificirana aparatura za vodenu destilaciju po Clevenger-u, *Deotto lab d.o.o.*, Zagreb, Hrvatska,
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) s rozim SPME vlaknom s polimernim adsorbensom divinilbenzen/polidimetilsiloksan (DVB/PDMS), *Supelco*, SAD,

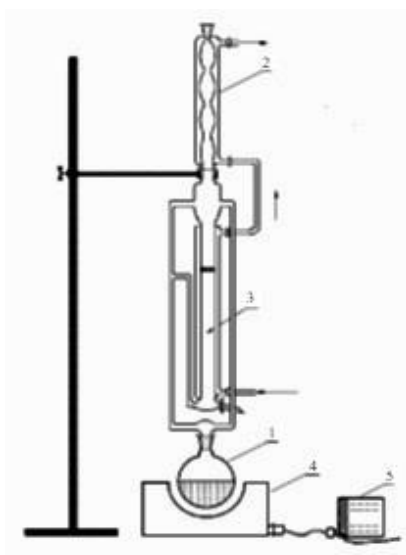
- magnetska miješalica model EKT 3001, s termostatom model MR Hei-Standard, *Heidolph*, Njemačka,
- magnetska miješalica model IKA RCT, s termostatom, *IKA*, Njemačka,
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa, *Agilent Technologies*, SAD: plinski kromatograf model 8890 i spektrometar masa model 5977E.

2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi iz uzoraka nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja izolirani su pomoću dvije metode. Jedna od njih je metoda vodene destilacije ili hidrodestilacije, a druga korištena metoda je mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Vodenom destilacijom dobiveni su destilati u kojima su sadržani hlapljivi spojevi, dok su mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni uzorci hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršnim parama.

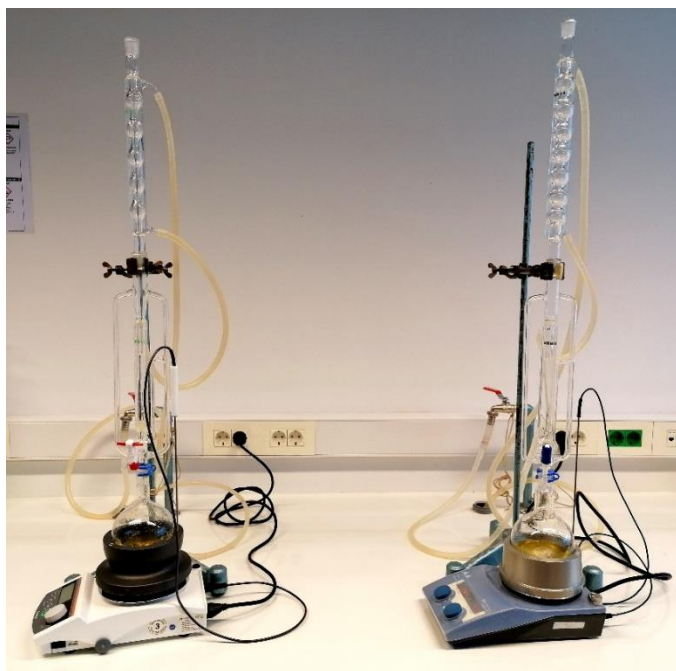
2.3.1. Izolacija hlapljivih spojeva vodenom destilacijom

Izolacija hlapljivih spojeva iz nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja izvedena je metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevenger-u (slika 30).



Slika 30. Shematski prikaz modificirane aparature za vodenu destilaciju po Clevenger-u: 1-tikvica s okruglim dnom, 2-vodeno hladilo po Allihn-u, 3-središnji dio aparature za destilaciju, 4-kalota, 5-otpornik promjenjive struje

U tikvice s okruglim dnom od 1000 mL stavljeno je po 15 g uzoraka aromatiziranih i nearomatiziranih maslinovih ulja. U svaku od tikvica dodana je i destilirana voda tako da je ukupna količina smjese ispunila polovinu tikvice. Osim toga u tikvice je stavljen i magnetski štapić u svrhu miješanja. Tako pripravljene smjese postavljene su u kalote za zagrijavanje. Na tikvice je potom okomito postavljena staklena aparatura po Clevenger-u. U središnju cijev aparature ulivena je destilirana voda i smjesa otapala pentana i dietil-etera u volumnom omjeru 1:2. Smjesa pentana i dietil-etera u ovom sustavu predstavlja takozvani trap. On u ovakvim aparatutama služi za ekstrakciju hlapljivih spojeva, a upravo zbog toga uvelike je smanjena mogućnost njihovog gubitka. Gubitci se javljaju zbog djelomične topljivosti lako hlapljivih spojeva u vodi. Kao zadnji dio na staklenu aparaturu po Clevenger-u postavljeno je vodeno hladilo po Allinh-u (slika 31). Ukupno je postavljeno šest istovjetnih aparatura.



Slika 31. Aparatura za hidrodestilaciju

Nakon postavljanja i provjere sigurnosti aparature, kroz gumene cijevi uspostavljen je odgovarajući protok vode kako bi kondenzacija para bila što uspješnija. Nakon toga je pokrenuto zagrijavanje pomoću magnetske miješalice. Za vrijeme destilacije hlapljivi spojevi maslinova ulja isparavali su i uzdizali se zajedno s vodenom parom kroz bočne cijevi aparature sve do hladila. Potom su se dolaskom do hladila, gdje je temperatura niža nego što je temperatura para, hlapljivi spojevi kondenzirali. Nakon

kondenzacije isti su se sakupljali u središnjoj cijevi aparature, točnije u trapu. Opisani proces hidrodestilacije provodio se dva sata. Nakon završetka procesa destilacije, aparatura je ohlađena te je s nje uklonjeno hladilo. Trap iz središnje cijevi aparature, odnosno organski ekstrakt, odijeljen je od vodenog sloja pomoću pipete, a potom je prebačen u bočice za čuvanje. U bočice je dodan NaCl kako bi se osiguralo da u destilatu nema zaostale vode. Potom je smjesa pentana i dietil-etera uparena čime je dobiven destilat lako hlapljivih spojeva aromatiziranih i nearomatiziranih uzoraka maslinova ulja. Šest uzoraka spremljeno je u hermetički zatvorene vijale.

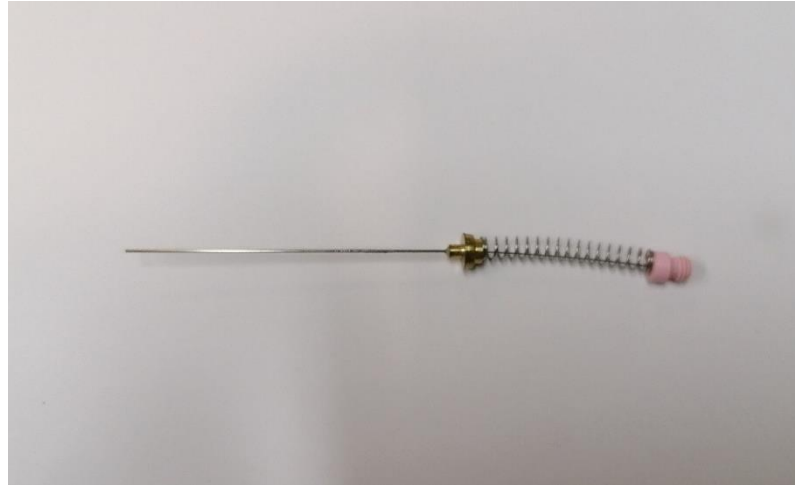
2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME)

Uzorci za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi, po 2 g uzoraka nearomatiziranih i aromatiziranih maslinovih ulja, stavljeni su u staklene vijale volumena 20 mL. Osim uzoraka ulja u vijale je stavljen i 1 g NaCl te magnetski štapić nakon čega su bočice hermetički zatvorene teflonskom septom. Svaka od vijala stavljena je u vodenu kupelj zagrijanu na 60 °C. Vodena kupelj zagrijavana je preko magnetske miješalice (slika 32). Nakon termostatiranja u trajanju od 15 minuta hlapljivi spojevi su isparili u prazni prostor iznad uzorka, takozvani *headspace* prostor.



Slika 32. Aparatura za ručnu mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi

Za mikroekstrakciju vršnih para korišteno je rozo vlakno čiji je adsorpcijski sloj polimerni film sastava polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB), debljine 65 μm (slika 33). Prije ekstrakcije vlakno je kondicionirano, a prema uputama proizvođača kondicioniranje je vršeno 30 minuta na temperaturi od 250 °C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa.



Slika 33. Vlakno s adsorpcijskim slojem PDMS/DVB (rozo vlakno)

Nakon procesa kondicioniranja u prazni prostor iznad uzorka uvedena je SPME igla s vlaknom. U tom trenutku započeta je adsorpcija hlapljivih spojeva koja je trajala 40 minuta. Nakon adsorpcije SPME vlakno vraćeno je u iglu, izvučeno iz vijale s uzorkom i odmah umetnuto u GC-MS injektor gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u kromatografskoj (GC) koloni u trajanju od 7 minuta pri temperaturi od 250 °C.

2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MS). Pri tome je korišten vezani sustav GC-MS proizvođača *Agilent Technologies* (SAD). Uređaj se sastoji od plinskog kromatografa 8890 i spektrometra masa 5977E. Uz to aparatura sadrži i računalo s odgovarajućim softverskim programom (slika 34).



Slika 34. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Analize uzoraka izvršene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača *Agilent Technologies* (kemijski sastav je 5 % difenila i 95 % dimetilpolisiloksana; dimenzije 30 m x 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze iznosi 0,25 μm). Plin nositelj je helij protoka od 1 mm/min. Omjer cijepanja je 1:50, temperatura injektora iznosila je 250 °C, temperatura detektora 280 °C, a energija ionizacije 70 eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 3,5 min na 70 °C, potom 70 do 200 °C brzinom od 3 °C/min i zadržavanje od 20 min na 200 °C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja već poznatih tvari iz eteričnih ulja ili smjesa hlapljivih spojeva prethodno analiziranih GC-MS sustavom u Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu. Osim navedenoga identifikacija je provedena i usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz

komercijalnih biblioteka masenih spektara Wiley 9 (*Wiley MS library*) i NIST14 (*National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD*) i/ili usporedbom masenih spektara iz literature. Za svaki od šest analiziranih uzoraka, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje (TIC),
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najbliži spektru nepoznate komponente koja je predstavljena pikom na kromatogramu ukupne ionske struje,
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

Postotni sastav hlapljivih spojeva uzoraka je izračunat iz površine pikova na kromatogramu koristeći metode normalizacije bez korekcijskih faktora.

3. REZULTATI

3.1. GC/MS analiza hlapljivih spojeva

Izolacija hlapljivih spojeva iz triju nearomatiziranih maslinovih ulja i triju maslinovih ulja aromatiziranih gorkom narančom, origanom i ružmarinom provedena je na dva načina, vodenom destilacijom u aparaturi po Clevenger-u te mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Destilati nearomatiziranih uzoraka maslinova ulja analizirani su direktnim injektiranjem u kromatografsku kolonu. Za mikroekstrakciju vršnih para korišteno je vlakno presvučeno polimernim slojem polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) koje je nakon adsorbiranja hlapljivih spojeva također umetnuto u plinski kromatograf u svrhu desorpcije istih. Na taj način dobiveno je šest uzoraka destilata i šest uzoraka vršnih para. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Rezultati analiza prikazani su tablicama 4 do 7, a kemijski spojevi nađeni u uzorcima nearomatiziranih maslinovih ulja i maslinovih ulja aromatiziranih gorkom narančom, origanom i ružmarinom poredani su po redosljedju eluiranja, odnosno retencijskom vremenu ili vremenu zadržavanja, iz kolone HP-5MS. Maseni udio izražen u postocima, %, predstavlja udio površine tog pika u ukupnoj površini svih pikova. Značenje simbola u tablicama je:

t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

/ – spoj nije identificiran u uzorku

tr. – spoj prisutan u tragovima (< 0,1 %)

* – točan izomer nije određen

^a – identifikacija usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley 9 i/ili NIST14 biblioteka masenih spektara

uzorak 1 – Jelsa, otok Hvar

uzorak 2 – Svirče, otok Hvar

uzorak 3 – Postira, otok Brač

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u destilatima nearomatiziranih maslinovih ulja

Redni Broj	Naziv spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3
1.	(<i>E</i>)-heks-2-enal	3,5	/	21,9	/
2.	(<i>E</i>)-heks-2-en-1-ol	3,6	tr.	/	/
3.	heksan-1-ol	3,7	1,5	4,5	0,4
4.	ksilen ^a	4,2	0,2	0,4	/
5.	heptanal	4,3	0,2	0,3	/
6.	(<i>E</i>)-hept-2-enal ^a	5,5	0,4	0,3	/
7.	benzaldehyd	5,7	/	0,3	0,3
8.	heksanska kiselina	5,9	0,5	/	/
9.	1-okten-3-ol	6,1	0,3	/	/
10.	butil-butanoat	6,5	/	/	0,2
11.	etil-heksanoat	6,6	/	/	0,3
12.	hepta-2,4-dienal*	6,6	1,0	/	/
13.	oktanal	6,8	0,2	/	/
14.	hepta-2,4-dienal*	7,0	0,6	/	/
15.	<i>p</i> -cimen	7,5	0,3	/	/
16.	limonen	7,6	0,6	/	0,2
17.	benzil-alkohol	7,7	0,2	1,0	/
18.	β -ocimen*	8,2	0,7	1,6	0,8
19.	(<i>E</i>)-okt-2-enal	8,5	0,2	/	/
20.	γ -terpinen	8,6	0,2	/	/
21.	oktan-1-ol	8,9	0,4	/	0,3
22.	nonanal	10,2	6,9	4,6	1,0
23.	4,8-dimetilnona-1,3,7-trien*	10,7	0,8	2,0	0,7
24.	4-etilfenol	12,5	0,3	/	0,9
25.	dec-1-en ^a	12,8	0,3	/	/
26.	nonan-1-ol ^a	12,8	/	/	1,2
27.	heks-3-enil-2-metilpropanoat* ^a	13,4	/	/	0,3
28.	heksil-butanoat ^a	13,7	/	/	0,3

29.	metil-salicilat	13,8	0,3	0,7	/
30.	etil-oktanoat	13,9	/	/	0,4
31.	heptadekan	14,0	0,8	/	/
32.	4-vinilfenol	14,6	/	/	0,4
33.	3,4-dimetilbenzaldehyd ^a	14,6	0,3	/	/
34.	dec-2-enal*	16,5	0,7	/	1,3
35.	nonanska kiselina	16,9	1,9	0,8	1,3
36.	deka-2,4-dienal*	17,9	3,7	1,0	0,4
37.	deka-2,4-dienal*	18,8	4,3	1,0	0,7
38.	etil-3-fenilpropanoat	20,2	/	/	0,2
39.	cikloizosativen ^a	20,9	1,1	1,9	1,8
40.	α -kopaen	21,3	5,6	12,7	10,7
41.	tetradekan	22,3	0,3	/	/
42.	ciklododekan ^a	24,0	/	0,7	/
43.	etil-cinamat	24,9	/	/	0,6
44.	eremofilen	25,8	1,4	1,0	1,3
45.	α -murolen	26,3	2,6	5,0	5,5
46.	α -farnezen*	26,6	2,0	2,7	1,8
47.	δ -kadinen	27,2	0,3	0,5	0,4
48.	nerolidol	28,8	0,3	/	0,5
49.	α -elemen ^a	32,1	0,3	0,5	/
50.	etil-miristat	37,2	/	/	0,8
51.	metil-palmitat	41,5	0,7	/	0,9
52.	palmitinska kiselina	42,7	4,2	2,8	9,1
53.	etil-palmitat	43,8	1,1	/	5,2
54.	metil-linoleat	46,9	/	/	0,3
55.	metil-oleat	47,1	1,0	/	2,1
56.	oleinska kiselina	48,6	39,0	8,9	30,8
57.	etil-linoleat	49,5	1,2	/	3,1
58.	etil-oleat	49,8	2,4	/	11,5
59.	skvalen	50,4	4,6	/	/
60.	etil-stearat	51,0	/	/	0,5
Ukupno identificirano		95,9	75,7	98,5	

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama nearomatiziranih maslinovih ulja

Redni Broj	Naziv spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3
1.	etanol	1,5	/	2,3	10,5
2.	acetaldehid ^a	1,5	/	2,9	/
3.	octena kiselina	1,6	5,0	5,2	4,7
4.	etil-acetat	1,7	2,9	3,3	3,6
5.	butan-1-ol	1,9	/	/	3,3
6.	pentan-2-on	2,0	2,5	2,0	/
7.	pentan-3-on	2,1	1,2	1,9	/
8.	metil-butanoat	2,2	/	/	2,8
9.	butanska kiselina	2,5	/	/	5,0
10.	(Z)-pent-2-en-1-ol	2,5	/	1,0	/
11.	heksanal	2,8	8,8	4,8	/
12.	etil-butanoat	2,8	/	/	45,7
13.	heks-3-enal ^{*a}	3,4	/	0,5	/
14.	(E)-heks-2-enal	3,5	11,2	44,9	/
15.	heks-3-en-1-ol*	3,5	/	/	5,7
16.	(E)-heks-2-en-1-ol	3,6	tr.	tr.	tr.
17.	heksan-1-ol	3,7	8,3	12,8	2,7
18.	(E)-hept-2-enal ^a	5,5	1,8	/	/
19.	5-etil-2(5H)furanon	5,6	/	1,8	/
20.	butil-butanoat	6,6	/	/	2,2
21.	hepta-2,4-dienal ^{*a}	6,6	5,8	/	/
22.	etil-heksanoat	6,7	/	/	2,7
23.	dekan ^a	6,8	1,9	/	/
24.	<i>p</i> -cimen	7,5	1,4	/	/
25.	limonen	7,7	3,1	/	/
26.	β -ocimen*	8,2	4,0	2,4	3,9
27.	nonanal	10,2	3,6	1,2	/
28.	2-feniletanol	10,5	/	/	2,0

29.	4,8-dimetilnona-1,3,7-trien*	10,7	1,9	1,3	1,9
30.	α -kopaen	21,3	/	1,4	3,2
31.	oleinska kiselina	48,4	28,7	/	/
Ukupno identificirano		92,1	89,7	99,9	

Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u destilatima aromatiziranih maslinovih ulja

Redni Broj	Naziv spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			Naranča	Origano	Ružmarin
1.	(<i>E</i>)-heks-2-en-1-ol	3,6	/	tr.	0,3
2.	heksan-1-ol	3,7	0,1	0,1	/
3.	α -tujen	4,9	0,3	0,9	0,7
4.	α -pinen	5,1	2,3	0,9	7,0
5.	kamfen	5,4	/	0,1	3,9
6.	sabinen	6,1	1,8	0,5	0,3
7.	β -pinen	6,2	6,5	2,1	3,3
8.	oktan-3-on ^a	6,3	/	/	0,2
9.	β -mircen	6,5	4,3	1,8	1,7
10.	hepta-2,4-dienal*	6,6	/	0,1	/
11.	oktanal	6,8	0,2	/	/
12.	felandren	6,9	/	0,2	/
13.	δ -3-karen	7,1	/	0,1	0,2
14.	α -terpinen	7,3	/	1,0	0,3
15.	<i>p</i> -cimen	7,6	/	13,1	8,4
16.	limonen	7,7	68,9	11,6	13,4
17.	1,8-cineol	7,8	/	/	10,9
18.	β -ocimen*	8,3	0,5	0,2	0,2
19.	γ -terpinen	8,6	3,5	5,4	4,5
20.	(<i>Z</i>)-sabinen-hidrat	8,9	/	0,5	0,3
21.	oktan-1-ol	9,0	0,2	/	/
22.	α -terpinolen	9,7	0,3	0,3	0,2
23.	linalol	10,1	2,0	0,5	0,6
24.	nonanal	10,2	0,3	0,8	0,4
25.	4,8-dimetilnona-1,3,7-trien*	10,7	0,1	0,2	/
26.	(<i>Z</i>)-limonen-oksid	11,4	0,3	/	/
27.	(<i>E</i>)-limonen-oksid	11,5	0,3	/	/
28.	kamfor	11,8	/	/	7,5
29.	citronelal	12,1	0,1	/	/

30.	borneol	12,6	/	0,2	4,7
31.	terpinen-4-ol	13,1	/	1,4	0,6
32.	α -terpineol	13,6	0,4	0,5	1,2
33.	dodekan	14,0	0,1	/	/
34.	dekanal	14,2	0,5	/	/
35.	2-etilheksil-acetat ^a	14,5	0,1	/	/
36.	nerol	15,2	0,2	/	/
37.	metil-timil-eter ^a	15,5	/	0,4	/
38.	(Z)-citral	15,7	0,4	/	/
39.	metil-karvakrol-eter ^a	15,8	/	0,2	/
40.	timokinon	16,6	/	0,7	/
41.	(E)-citral	16,9	1,1	/	/
42.	dec-2-enal*	17,4	/	0,1	/
43.	bornil-acetat	17,7	/	/	1,9
44.	timol	17,9	/	44,2	20,9
45.	karvakrol	18,5	/	5,0	1,5
46.	deka-2,4-dienal*	18,8	0,1	0,4	/
47.	α -kopaen	21,3	0,1	0,2	0,3
48.	β -burbonen	21,7	/	0,1	/
49.	(E)-kariofilen	23,1	0,3	1,5	2,1
50.	(E)- α -bergamoten	23,8	0,3	0,2	/
51.	α -humulen	24,5	/	0,3	/
52.	α -amorfen ^a	25,4	/	0,1	/
53.	germakren D	25,6	0,2	/	/
54.	eremofilen	25,8	0,1	0,2	/
55.	α -murolen	26,4	/	0,1	/
56.	α -farnezen*	26,6	/	/	0,7
57.	β -bisabolen	26,7	0,6	1,4	/
58.	δ -kadinen	27,3	/	0,2	/
59.	kariofilen-oksid	29,5	/	0,2	/
Ukupno identificirano			96,5	98,0	98,2

Tablica 7. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama aromatiziranih maslinovih ulja

Red. Broj	Naziv spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			Naranča	Origano	Ružmarin
1.	etanol	1,5	/	0,2	/
2.	octena kiselina	1,6	/	0,4	/
3.	heksanal	2,8	/	0,2	0,1
4.	(<i>E</i>)-heks-2-enal	3,5	/	0,9	0,1
5.	(<i>E</i>)-heks-2-en-1-ol	3,6	/	0,3	0,1
6.	α -tujen	4,9	/	1,20	0,1
7.	α -pinen	5,1	0,7	1,0	1,0
8.	kamfen	5,4	/	/	0,4
9.	sabinen	6,0	0,5	0,4	/
10.	okt-1-en-3-ol	6,1	/	0,3	/
11.	β -pinen	6,2	2,2	1,8	0,4
12.	oktan-3-on ^a	6,3	/	/	0,1
13.	β -mircen	6,4	2,3	3,4	0,5
14.	α -terpinen	7,2	/	1,0	/
15.	<i>p</i> -cimen	7,5	2,0	21,1	2,3
16.	limonen	7,6	72,3	32,4	3,2
17.	1,8-cineol	7,7	/	/	1,9
18.	β -ocimen*	8,2	0,3	/	0,1
19.	γ -terpinen	8,6	1,2	6,8	1,0
20.	(<i>Z</i>)-sabinen-hidrat	8,9	/	0,6	0,1
21.	α -terpinolen	9,7	/	tr.	/
22.	linalol	10,0	0,8	0,4	0,2
23.	nonanal	10,2	/	tr.	0,1
24.	kamfor	11,8	/	/	1,1
25.	borneol	12,6	/	/	0,5
26.	terpinen-4-ol	13,1	/	/	0,1
27.	α -terpineol	13,6	/	/	0,2
28.	timokinon	16,1	/	0,5	/

29.	(<i>E</i>)-citral	16,9	0,6	0,3	/
30.	bornil-acetat	17,6	/	/	0,4
31.	timol	17,8	/	13,7	1,7
32.	karvakrol	18,2	/	0,7	0,1
33.	(<i>E</i>)-kariofilen	23,1	/	/	0,2
34.	oleinska kiselina	48,4	/	1,9	8,4
35.	skvalen	50,4	15,6	9,9	54,8
36.	neidentificirani CH	51,9	/	/	20,8
Ukupno identificirano			98,5	99,4	79,2

4. RASPRAVA

Maslina (*Olea europea* L.) zbog svoje specifične arome i velike nutricionističke vrijednosti jedna je od najpopularnijih biljaka Dalmacije. Osim toga, smatra se najstarijom kultiviranom biljkom na području Mediterana. Danas mnogi znanstveni radovi maslinu i njezine proizvode stavljaju u fokus takozvane „funkcionalne hrane“. Dokazano je kako maslinovo ulje ima povoljan učinak na zdravlje u vidu antioksidativne, protuupalne, antimikrobne, antiteratogene i antitumorske aktivnosti. Dokazano je kako maslinovo ulje ima povoljan učinak i na usporavanje procesa starenja, jačanja imunološkog sustava te održavanje ljepote. U najnovije doba posebnu pozornost privlače aromatizirana maslinova ulja. Već poznatom mirisu i okusu maslinova ulja dodaju se razne aromatične biljke kako bi se poboljšala osjetilna i nutricionistička svojstva, ali osim toga i produžio vijek valjanosti proizvoda. U aromatizaciji ulja najčešće se koriste ružmarin, timijan, origano i slične aromatične biljke te plodovi citrusa, npr. naranče i limuna. Ujedno, tako aromatizirana ulja ljubiteljima nude široku paletu novih okusa.

Cilj ovog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva nearomatiziranih maslinovih ulja i maslinovih ulja aromatiziranih gorkom narančom, origanom i ružmarinom. Korištene su dvije metode izolacije hlapljivih spojeva, destilacija vodenom parom i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Vodenom destilacijom dobiveni su destilati u kojima su sadržani hlapljivih spojevi maslinovih ulja, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) dobivene su vršne pare maslinovih ulja. Na taj način dobiveno je šest uzoraka destilata i šest uzoraka vršnih para. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), a rezultati analiza su prikazani u tablicama 4-7.

4.1. Hlapljivi spojevi nearomatiziranih maslinovih ulja

Vodenom destilacijom triju uzoraka nearomatiziranih maslinovih ulja dobiveni su uzorci koji se u daljnjem tekstu nazivaju destilati. Kemijski sastav i udio pojedinih sastojaka u destilatima prikazan je u tablici 4. U destilatu nearomatiziranog maslinovog ulja s područja Jelse, otok Hvar (uzorak 1) identificirano je 45 spojeva, odnosno 95,9 % od ukupnih hlapljivih spojeva. U destilatu maslinovog ulja s područja Svirča, otok Hvar

(uzorak 2) identificirana su 24 spoja, što predstavlja 75,7 % od ukupnog destilata, dok je u destilatu uzorka 3 (Postira, otok Brač) identificirano 38 spojeva koji čine 98,5 % od ukupnih hlapljivih spojeva.

Glavni sastojci destilata maslinovog ulja, uzorak 1, su nezasićena masna kiselina, oleinska kiselina (39,0 %), alifatski aldehid nonanal (6,9 %) te (*E*)- i (*Z*)-izomeri nezasićenog alifatskog aldehida deka-2,4-dienala (ukupnog udjela 8,0 %). Kvantitativno značajni sastojci destilata su i seskviterpenski ugljikovodici α -kopaen (5,6 %), α -murolen (2,6 %) i α -farnezen (2,0 %) te triterpenski ugljikovodik skvalen (4,6 %). Osim oleinske kiseline, identificirana je i zasićena masna kiselina, palmitinska kiselina (4,2 %). U destilatu uzorka 2 ističe se nezasićeni C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal (21,9 %). Što se tiče ostalih kvantitativno značajnih sastojaka ovog uzorka rezultati analize su slični kao za uzorak 1, odnosno i ovdje su najvažniji spojevi α -kopaen (12,7 %), oleinska kiselina (8,9 %), α -murolen (5,0 %), nonanal (4,6 %), α -farnezen (2,7 %) te palmitinska kiselina (2,8 %). Treba spomenuti da je količinski značajan sastojak u ovom uzorku i nezasićeni alifatski C₆ alkohol heksan-1-ol (4,5 %) čiji je udio u uzorku 1 bio 1,5 %. Uzorak 3 pokazuje samo djelomično sličan profil hlapljivih spojeva u usporedbi s prva dva uzorka. Tako se kao glavni spojevi ističu oleinska kiselina (30,8 %) i njen etilni ester, etil-oleat (11,5 %), a slijede α -kopaen (10,7 %), palmitinska kiselina (9,1 %), α -murolen (5,5 %) te etilni ester palmitinske kiseline, etil-palmitat (5,2 %). U sva tri destilata, osim navedenih spojeva, identificirani su u nešto manjim količinama i monoterpenski ugljikovodik β -ocimen, seskviterpenski ugljikovodik δ -kadinen te nezasićeni ugljikovodik 4,8-dimetilnona-1,3,7-trien. Ukupni udio izomernih deka-2,4-dienala u uzorcima 2 i 3 je manji nego u uzorku 1 i iznosi 2,0 %, odnosno 1,1 %. C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal, glavni sastojak destilata uzorka 2, nije identificiran u destilatima uzorka 1 i 3, dok je C₆ alkohol heksan-1-ol identificiran u sva tri destilata, ali s različitim udjelima.

Korištenjem vlakna presvučenog s polimernim filmom sastava polidimetilsiloksan/divinilbenzen (rozo vlakno) u vršnim parama maslinovih ulja identificirano je 17 (uzorak 1), 16 (uzorak 2) te 15 (uzorak 3) spojeva koji čine 92,1 %, odnosno 89,7 %, odnosno 99,9 % od ukupnih uzoraka (tablica 5).

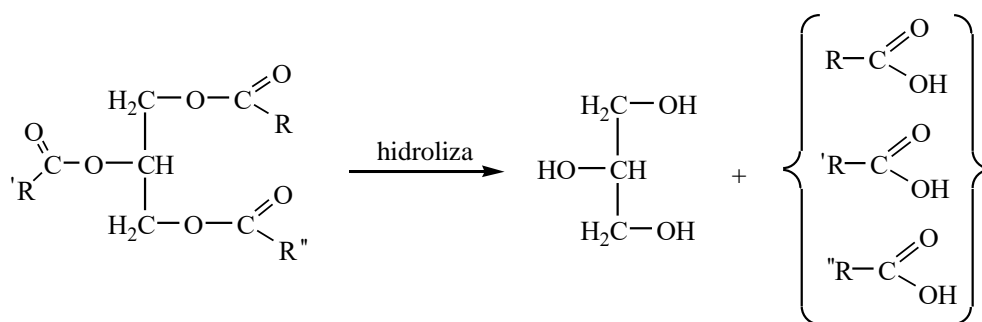
Glavni sastojak vršnih para uzorka 1 je oleinska kiselina (28,7 %), a slijede C₆ aldehidi (*E*)-heks-2-enal (11,2 %) i heksanal (8,8 %) te C₆ alkohol heksan-1-ol (8,3 %)

Dominantan sastojak vršnih para uzorka 2 je C₆ aldehyd (*E*)-heks-2-enal (44,9 %), a slijedi heksan-1-ol (12,8 %). U vršnim parama ovog uzorka identificiran je i heksanal, ali s manjim udjelom (4,8 %) nego u vršnim parama uzorka 1. Vršne pare uzorka 3 se u kvalitativnom smislu dosta razlikuju od vršnih para uzoraka 1 i 2. U vršnim parama prevladavaju esteri masnih kiselina, posebno butanske kiseline, a identificirana je i sama butanska kiselina (maslačna kiselina, 5,0 %). Glavni sastojak uzorka je etil-butanoat (45,7 %), a identificirani su još i metil-butanoat (2,8 %) i butil-butanoat (2,2 %) te etil-heksanoat (2,7 %). Ukupan udio navedenih estera u uzorku je 53,4 %. Količinski značajan sastojak vršnih para je etanol (10,5 %). Etanol je prirodni sastojak plodova masline koji iz njih prelazi i u maslinovo ulje, ali i jedan od produkata fermentacije koja se odvija u plodovima ili ulju. Etanol je i supstrat za sintezu etilnih estera masnih kiselina kao što je etil-butanoat. Sadržaj etilnih estera masnih kiselina je jedan od parametara kvalitete djevičanskih maslinovih ulja koji ukazuje na senzorne defekte ulja nastale procesom fermentacije u plodovima.²³ Izuzetno visoki udio etil-butanoata (45,7 %) u vršnim parama uzorka 3, kao i visoki udio etanola (10,5 %), vjerojatno je posljedica postupanja s maslinama prije dobivanja ulja točnije njihovog čuvanja u vodi. C₆ aldehydi (*E*)-heks-2-enal i heksanal u ovom uzorku nisu identificirani, a udio C₆ alkohola heksan-1-ola bio je manji nego u vršnim parama uzoraka 1 i 2 (2,7 % prema 8,3 % odnosno 12,8 %). Zanimljivo, u ovom uzorku vršnih para identificiran je C₆ alkohol heks-3-en-1-ol (5,7 %) koji nije identificiran u prethodnim uzorcima.

Spojevi koji su identificirani u sva tri uzorka vršnih para su octena kiselina (5,0 %, 5,2 % i 4,7 %), etil-acetat (2,9 %, 3,3 % i 3,6 %), β -ocimen (4,0 %, 2,4 % i 3,9 %) i 4,8-dimetilnona-1,3,7-trien (1,9 %, 1,3 % i 1,9 %).

Odmah se da primijetiti kako je u destilatima uzoraka 1 i 3 visoki udio oleinske kiseline, 39,0 %, odnosno 30,8 %. To ukazuje na vjerojatnu hidrolizu triglicerida maslinovog ulja (slika 35). Naime, oleinska kiselina je najzastupljenija nezasićena masna kiselina u trigliceridima maslinovog ulja. U destilatima je identificirana i palmitinska kiselina (heksadekanska kiselina) koja je najzastupljenija zasićena masna kiselina u trigliceridima maslinovog ulja. Što se tiče vršnih para, oleinska kiselina identificirana je samo u vršnim parama uzorka 1, dok palmitinska kiselina nije identificirana u vršnim parama maslinovog ulja. Iz navedenog se može zaključiti da oleinska i palmitinska kiselina u destilatima maslinovog ulja vjerojatno potječu od hidrolize triglicerida. Do hidrolize triglicerida je vjerojatno došlo tijekom izolacije

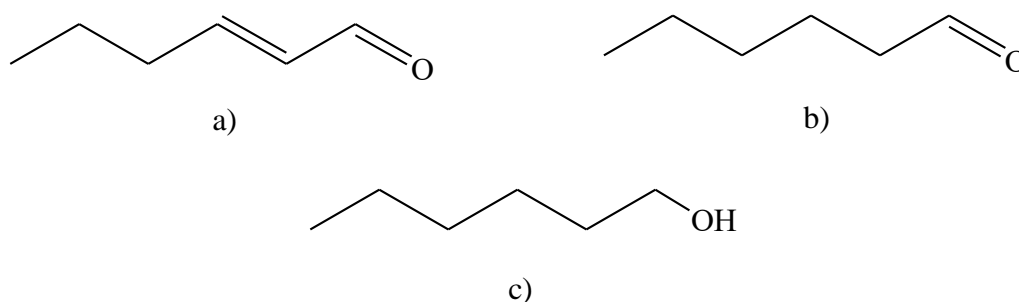
hlapljivih spojeva iz maslinovog ulja. Hlapljivi spojevi su izolirani vodenom destilacijom koja se provodi grijanjem uzorka na temperaturi od oko 100 °C uz dodatak vode što pogoduje hidrolizi triglicerida. Stoga ne začuđuje visok udio oleinske kiseline u destilatima maslinovog ulja. Oleinska kiselina identificirana je samo u vršnim parama uzorka 1, ali ne i u vršnim parama uzoraka 2 i 3. Uzorak maslinovog ulja 1 je star dvije godine (berba 2018. godine), dok su maslinova ulja 2 i 3 iz berbe 2019. godine. Prisustvo oleinske kiseline u navedenim vršnim parama vjerojatno je također posljedica hidrolize triglicerida do koje je došlo tijekom starenja i skladištenja maslinovog ulja.



Slika 35. Shematski prikaz reakcije hidrolize triglicerida

Osim po udjelu oleinske kiseline destilat uzorka 2 se razlikuje od destilata uzoraka 1 i 3 i po sadržaju karakterističnih spojeva arome maslinovog ulja prvenstveno C₆ aldehida i alkohola (slika 36). Glavni sastojak destilata uzorka 2 je upravo C₆ aldehyd (*E*)-heks-2-enal koji nije identificiran u destilatima uzoraka 1 i 3. Još jedan predstavnik spojeva arome, C₆ alkohol heksan-1-ol, je identificiran u sva tri destilata, ali s različitim udjelima. Najveći udio ovog alkohola je također u destilatu uzorka 2 (4,5 %). Dakle, ukupan udio spojeva arome maslinovog ulja, (*E*)-heks-2-enala i heksan-1-ola, u destilatu uzorka 2 je značajan i iznosi 26,4 %, dok je u ostalim uzorcima zanemariv. Navedeni spojevi su nositelji arome koja se opisuje kao „zelena“ ili aroma zelene trave i lišća. Oni nastaju iz masnih kiselina linolne i α-linolenske kiseline u slijedu biokemijskih reakcija koje čine lipoksigenazni biosintetski put. Iz α-linolenske kiseline nastaje nezasićeni aldehyd (*E*)-heks-2-enal, a zasićeni alkohol heksan-1-ol nastaje iz linolne kiseline. (*E*)-heks-2-enal je glavni hlapljivi spoj u većini europskih ekstra djevičanskih maslinovih ulja.²⁴ Udio hlapljivih spojeva arome, C₆ aldehida i alkohola, u vršnim parama ispitivanih maslinovih ulja je znatno veći što je u skladu s očekivanjima. Naime, radi se o najhlapljivijim spojevima. Također, što se tiče ovih spojeva rezultati

analiza vršnih para potvrđuju rezultate analiza destilata. Najbolje rezultate je pokazao uzorak 2 u kojem je ukupni udio C₆ aldehida i alkohola 63,0 %. Kao i u destilatu ovog uzorka, glavni sastojak vršnih para je (*E*)-heks-2-enal, a slijedi heksan-1-ol. U vršnim parama uzorka 1 udio spojeva zelene arome je 28,3 %, a najlošije rezultate pokazao je uzorak 3 u čijim vršnim parama je identificiran samo jedan spoj iz ove skupine, heks-3-en-1-ol (5,7 %). Ovakvi rezultati vezani za spojeve arome mogu se objasniti time što su to najhlapljiviji spojevi koji se lako izgube bilo stajanjem (starenjem i/ili skladištenjem) ulja što vrijedi za uzorak 1 ili čuvanjem maslina u vodi prije prešanja, odnosno dobivanja maslinovog ulja (uzorak 3).

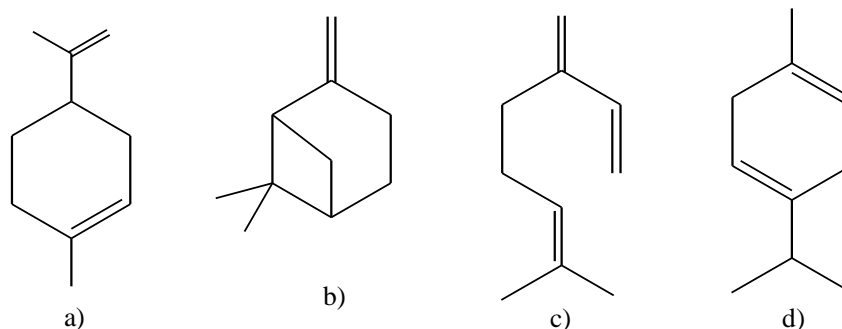


Slika 36. Karakteristični spojevi arome maslinovog ulja a) (*E*)-heks-2-enal, b) heksanal i c) heksan-1-ol

4.2. Hlapljivi spojevi aromatiziranih maslinovih ulja

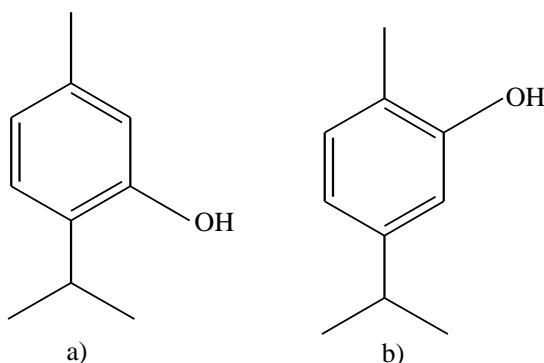
Osim čistih, nearomatiziranih maslinovih ulja u radu je istražen profil spojeva arome tri aromatizirana maslinova ulja, ulja aromatiziranog gorkom narančom, origanom te ružmarinom. Hlapljivi spojevi (spojevi arome) izolirani su vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi.

U tablici 6 prikazani su hlapljivi sastojci destilata aromatiziranih maslinovih ulja. U destilatu maslinovog ulja aromatiziranog **gorkom narančom** identificirana su 32 spoja, što predstavlja 96,5 % od ukupnog uzorka. U destilatu prevladavaju terpeni i to monoterpeni. U destilatu se ističe monoterpenski ugljikovodik limonen (68,9 %), a kvantitativno značajni su i, također monoterpenski ugljikovodici, β -pinen (6,5 %), β -mircen (4,3 %) i γ -terpinen (3,5 %) (slika 37). U nešto manjim udjelima identificirani su sljedeći monoterpenski spojevi: ugljikovodik α -pinen (2,3 %), alkohol linalol (2,0 %), ugljikovodik sabinen (1,8 %) te alhid (*E*)-citral ili geranial (1,1 %).



Slika 37. Strukturne formule monoterpenkih ugljikovodika a) limonena, b) β -pinena, b) β -mircena i c) γ -terpinena

U destilatu maslinovog ulja aromatiziranog **origanom** identificirana su 42 spoja, što predstavlja 98,0 % od ukupnog uzorka. Najistaknutiji spojevi ovog uzorka su također monoterpeni. Glavni sastojak destilata je monoterpenki fenol timol (44,2 %), a slijede ugljikovodici *p*-cimen (13,1 %), limonen (11,6 %), γ -terpinen (5,4 %) i fenol karvakrol (5,0 %) (slika 38). Od ostalih spojeva, prisutnih u ovom uzorku s nešto manjim udjelima, identificirani su monoterpenki ugljikovodici β -pinen (2,1 %), β -mircen (1,8 %) i α -terpinen (1,0 %), monoterpenki alkohol terpinen-4-ol (1,4 %) i seskviterpenki ugljikovodik β -bisabolen (1,4 %).



Slika 38. Strukturne formule monoterpenkih fenola a) timola i b) karvakrola

U destilatu maslinovog ulja aromatiziranog **ružmarinom** identificirano je 29 spojeva, što predstavlja 98,2 % od ukupnog uzorka. S obzirom na udio najistaknutiji spojevi su timol (20,9 %), limonen (13,4 %), 1,8-cineol (10,9 %), *p*-cimen (8,4 %), kamfor (7,5 %) te α -pinen (7,0 %). Svi navedeni spojevi su monoterpeni bilo

ugljikovodici (limonen, *p*-cimen, α -pinen) ili njihovi oksidirani derivati: fenol timol, ciklički eter 1,8-cineol i keton kamfor. Od ostalih spojeva, u nešto manjim količinama, identificirani su također monoterpeni spojevi: alkohol borneol (4,7 %), ugljikovodici γ -terpinen (4,5 %), kamfen (3,9 %) te β -pinen (3,3 %)

Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) dobivene su vršne pare triju uzoraka aromatiziranih maslinovih ulja, a kemijski sastav vršnih para kao i udio pojedinih sastojaka prikazan je u tablici 7. Za izolaciju hlapljivih spojeva iz spomenutih uzoraka korišteno je rozo vlakno sastava polidimetilsiloksan/divinilbenzen.

U vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog **gorkom narančom** identificirano je 11 spojeva, odnosno 98,5 % od ukupnog uzorka. Dominantan sastojak vršnih para je monoterpeni ugljikovodik limonen (72,3 %), a količinom se ističe i triterpeni ugljikovodik skvalen (15,6 %). S manjim udjelima u ovom su uzorku još identificirani monoterpeni ugljikovodici β -mircen (2,3 %), β -pinen (2,2 %), *p*-cimen (2,0 %) i γ -terpinen (1,2 %).

Vršne pare maslinovog ulja aromatiziranog **origanom** imaju sličan kemijski sastav hlapljivih spojeva kao i prethodno opisane vršne pare. Naime i u ovim vršnim parama prevladavaju monoterpeni spojevi, a razlika je u udjelima pojedinih sastojaka. Najveće udjele u ovom uzorku imaju ugljikovodici limonen (32,4 %) i *p*-cimen (21,1 %) te fenolni spoj timol (13,7 %). I u ovom uzorku je identificiran triterpeni ugljikovodik skvalen (9,9 %). Treba spomenuti nekoliko kvantitativno važnijih spojeva, kao što su monoterpeni ugljikovodici γ -terpinen (6,8 %) i β -mircen (3,4 %). U uzorku je identificirano ukupno 25 spojeva, što predstavlja 99,4 % od ukupnog uzorka.

U vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog **ružmarinom** identificirano je 27 spojeva, odnosno 79,2 % od ukupnog uzorka. Ovaj uzorak vršnih para se znatno razlikuje od vršnih para prethodna dva uzorka po uspješnosti identifikacije prisutnih spojeva (79,2 % prema 98,5 %, odnosno 99,4 %). Na kromatogramu vršnih para je vidljivo 28 pikova, odnosno sastojaka vršnih para. Jedan, kvantitativno važan sastojak (20,8 %) je ostao neidentificiran. Neidentificirani sastojak je vjerojatno ugljikovodik. Osim navedenog ovaj uzorak karakterizira i izuzetno visoki udio triterpenskog ugljikovodika skvalena (54,8 %) u odnosu na udio skvalena u uljima aromatiziranim gorkom narančom i origanom (15,6 %, odnosno 9,9 %). Ostali sastojci identificirani u

znatno manjim količinama su oleinska kiselina (8,4 %), monoterpenski ugljikovodici limonen (3,2 %) i *p*-cimen (2,3 %) te 1,8-cineol (1,9 %) i timol (1,7 %).

Iz GC-MS analiza destilata i vršnih para aromatiziranih maslinovih ulja vidljivo je da u uzorcima prevladavaju terpeni i to pretežito monoterpeni koji potječu iz biljke (ploda) kojim je određeno maslinovo ulje aromatizirano. Udio spojeva arome koji potječu od maslinovog ulja u destilatima, a posebno u vršnim parama aromatiziranih ulja, je vrlo nizak. Terpeni prisutni u aromatičnim biljkama imaju dovoljno visok tlak para pri atmosferskom tlaku što omogućava njihovo otpuštanje u okoliš. Posljedica je veća akumulacija terpena u okolišu, odnosno u slučaju HS-SPME metode u takozvanom *headspace* prostoru odakle se adsorbiraju na vlakno. Ograničavajući faktor je volumen HS-SPME vijale, odnosno *headspace* prostora u kojem se sakupljaju hlapljivi spojevi. Općenito, koncentracija hlapljivih spojeva na HS-SPME vlaknu ovisi o više parametara, kao što su vrsta vlakna, površina vlakna, temperatura i vrijeme postizanja ravnoteže između uzorka i vršnih para, ekstrakcijsko vrijeme, miješanje uzorka, temperatura i vrijeme desorpcije. Ipak najvažniji parametar je kemijski sastav vlakna. Količina ekstrahiranih sastojaka najviše ovisi o njihovom različitom afinitetu prema vlaknu, ali i o kompeticijskom fenomenu.²⁵

Zanimljiv je visoki udio skvalena u vršnim parama svih uzoraka aromatiziranih ulja. Skvalen je karakterističan sastojak maslinovog ulja. S obzirom da je termolabilan destilacija nije pogodna metoda za njegovu izolaciju.²⁶ Skvalen (slika 13) je triterpenski ugljikovodik i, stoga, teže hlapljiv (poluhlapljiv) spoj. Vjerojatno je razlog visokog udjela skvalena u vršnim parama njegov afinitet prema upotrijebljenom vlaknu (srednja polarnost filma) kao i kompeticija s ostalim sastojcima vršnih para.

5. ZAKLJUČCI

- Cilj ovog diplomskog rada bio je analizirati hlapljive spojeve u uzorcima nearomatiziranih maslinovih ulja te u uzorcima maslinovih ulja aromatiziranih gorkom narančom, origanom i ružmarinom. U svrhu izolacije hlapljivih spojeva svih šest uzoraka podvrgnuto je hidrodestilaciji te mikroekstrakciji vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).
- Destilat maslinovog ulja, **uzorak 1**, karakterizira visoki udio nezasićene masne kiseline, oleinske kiseline (39,0 %). U destilatu **uzorka 2** ističe se nezasićeni C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal (21,9 %), a glavni sastojak destilata **uzorka 3** je oleinska kiselina (30,8 %).
- C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal, glavni sastojak destilata uzorka 2, nije identificiran u destilatima uzoraka 1 i 3, dok je C₆ alkohol heksan-1-ol identificiran u sva tri destilata, ali s različitim udjelima. Navedeni spojevi su nositelji arome koja se opisuje kao „zelena“ ili aroma zelene trave i lišća. Nastaju iz masnih kiselina linolne i α -linolenske kiseline u lipoksigenaznom biosintetskom putu.
- Glavni sastojak **vršnih para uzorka 1** je oleinska kiselina (28,7 %), a identificiranu su i C₆ spojevi, aldehidi (*E*)-heks-2-enal i heksanal te alkohol heksan-1-ol s ukupnim udjelom 28,3 %. **Vršnim parama uzorka 2** dominira C₆ aldehid (*E*)-heks-2-enal, a identificiranu su i drugi C₆ spojevi, heksan-1-ol, heksanal i heks-3-enal s ukupnim udjelom od 62,5 %. U **vršnim parama uzorka 3** prevlada ester maslačne kiseline, etil-butanoat (45,7 %). Visoki udio etil-butanoata i etanola (10,5 %) u vršnim parama vjerojatno je posljedica postupanja s maslinama prije dobivanja ulja tj. njihovog čuvanja u vodi. U vršnim parama ovog uzorka identificiran je samo jedan C₆ spoj, alkohol heks-3-en-1-ol (5,7 %).
- Rezultati vezani za spojeve arome mogu se objasniti time što su to najhlapljiviji spojevi koji se lako izgube bilo stajanjem ulja što vrijedi za uzorak 1 ili čuvanjem maslina u vodi prije prešanja, odnosno dobivanja maslinovog ulja (uzorak 3).
- U **destilatu** maslinovog ulja aromatiziranog **gorkom narančom** ističe se monoterpenski ugljikovodik limonen (68,9 %), a kvantitativno su značajni i

monoterpenski ugljikovodici, β -pinen, β -mircen i γ -terpinen. Najistaknutiji spojevi **destilata** maslinovog ulja aromatiziranog **origanom** su monoterpenski fenol timol (44,2 %), a slijede ugljikovodici *p*-cimen, limonen i γ -terpinen te fenol karvakrol. Glavni spojevi **destilata** maslinovog ulja aromatiziranog **ružmarinom** su monoterpenski timol (20,9 %), limonen (13,4 %), 1,8-cineol (10,9 %), *p*-cimen (8,4 %), kamfor (7,5 %) te α -pinen (7,0 %).

- Dominantan sastojak **vršnih para** maslinovog ulja aromatiziranog **gorkom narančom** je monoterpenski ugljikovodik limonen (72,3 %), a kvantitativno se ističe i triterpenski ugljikovodik skvalen (15,6 %). Najistaknutiji spojevi **vršnih para** maslinovog ulja aromatiziranog **origanom** su također terpeni, ugljikovodici limonen (32,4 %), *p*-cimen (21,1 %) i skvalen (9,9 %) te fenol timol (13,7 %). Uzorak **vršnih para** maslinovog ulja aromatiziranog **ružmarinom** karakterizira izuzetno visoki udio triterpenskog ugljikovodika skvalena (54,8 %).
- Usporedbom rezultata GC-MS analiza destilata i vršnih para nearomatiziranih maslinovih ulja može se zaključiti da vodena destilacija nije najbolji izbor za istraživanje spojeva arome. Tijekom vodene destilacije, zbog grijanja maslinovog ulja na temperaturi od oko 100 °C u prisustvu vode, dolazi do hidrolize triglicerida maslinovog ulja, odnosno nastanka artefakata. HS-SPME metoda je bolja metoda za izolaciju spojeva arome maslinovog ulja jer omogućuje uzorkovanje i analizu spojeva koji se smatraju nositeljima poželjnih aroma maslinovog ulja, a to su prvenstveno C₆ aldehidi i alkoholi.
- Dodatak aromatične biljke ili citrusa ima snažan utjecaj na ukupni profil arome maslinovog ulja. Iz rezultata GC-MS analiza destilata i vršnih para aromatiziranih maslinovih ulja vidljivo je da u uzorcima prevladavaju hlapljivi spojevi koji potječu iz biljke (ploda) kojim je određeno maslinovo ulje aromatizirano.

6. LITERATURA

1. M. Gugić, M. Šarolić, *Maslina i proizvodi*, Ogranak Matice hrvatske u Sinju, Sinj, 2017.
2. M. Barbarić, A. Raič, A. Karačić, *Priručnik iz maslinarstva*, Federalni agromediteranski zavod Mostar, Mostar, 2014.
3. R. Ozimec, J. Karoglan Kontić, E. Maletić, Z. Matotan, F. Strikić, *Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije*, Program Ujedinjenih naroda za razvoj, Zagreb, 2015.
4. A. Radonić, *Prirodni organski spojevi*, neregizirani nastavni materijal (ppt prezentacija), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2016.
5. D. Boskou, *Olive oil: Chemistry and technology*, AOCS Press, Champaign, 2006.
6. J. J. Salas, J. Sanchez, U. S. Ramli, A. M. Manaf, M. Williams, J. L. Harwood, *Prog Lipid Res.* **39** (2000) 151-180.
7. M. T. Morales, G. Luna, R. Aparicio, *Food Chem* **91** (2005) 293-301.
8. M. Yilmazer, S. Goksu Karagoz, G. Ozkan, E. Karacabey, *J Food and Drug Anal* **24** (2016) 299-304.
9. I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, neregizirani nastavni materijali, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2011.
10. I. Jerković, *Kemija aroma*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2011.
11. <https://www.britannica.com/plant/Rutaceae#ref207751> (25.08.2020.)
12. <https://www.britannica.com/plant/Sapindales/Characteristic-morphological-features> (25.08.2020.)
13. I. Suntar, H. Khan, S. Patel, R. Clano, L. Rastelli, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2018) 1-12.
14. http://www.ras.hr/Media/Ljekovito_bilje.pdf (25.08.2020.): I. Mihovilović, *Proizvodnja i prerada ljekovitog i aromatičnog bilja*
15. <http://docplayer.rs/189778672-Uzgoj-ljekovitog-za%C4%8Dinskog-i-aromati%C4%8Dno-bilja.html>: V. Ibraković, *Uzgoj ljekovitog, začinskog i aromatično bilja*, Slavonski brod, 2019.
16. M. Lj. Čikeš, *Profil hlapljivih spojeva začina origana prije i nakon zagrijavanja*, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split 2018.
17. D. Kuštrak, *Farmakognozija fitofarmacija*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2005.

18. J. A. Del Rio, M. D. Fustera, P. Gomez, I. Porrassb, A. Garcia-Lidon, A. Ortuno, *Food Chem.* **84** (2004) 457-461.
19. <https://www.plantea.com.hr/limun/> (6.09.2020.)
20. N. C. Da Costa, S. Eri, *Identification of Aroma Chemicals*, in: D. J. Rowe (Ed.), *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing, Oxford, 2005.
21. F. Burčul, *Instrumentne metode analize*, nerecenzirani nastavni materijal (ppt prezentacija), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2018.
22. A. Radonić, *Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (Juniperus oxycedrus L.)*, magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split 2010.
23. L. G. Vico, A. Belaj, A. León, R. de la Rosa, C. Sanz, A. G. Pérez, *Food Control* **91**, (2018) 248-253.
24. C. M. Kalua, M. S. Allen, D. R. Bedgood Jr, A. G. Bishop, P. D. Prenzler, K. Robards, *Food Chemistry* **100** (2007) 273-286.
25. V. S. Pragadheesh, A. Yadav, C. S. Chanotiya, P. K. Rout, G. C. Uniyal, *Nat. Prod. Commun.* **6** (2011) 1333-1338.
26. O. Popa, N. E. Băbeanu, I. Popa, S. Niță, C. E. Dinu-Pârvu, *Biomed Res. Int* **Volume 2015**, Article ID 367202, 1-16 (<http://dx.doi.org/10.1155/2015/367202>, 5.10.2020).

7. POPIS SLIKA

Slika 1: <http://www.agroledina.hr/maslina.php> (18.08.2020.)

Slika 2: M. Barbarić, A. Raič, A. Karačić, *Priručnik iz maslinarstva*, Federalni agromediterranski zavod Mostar, Mostar, 2014.

Slika 3: S. Barbarić, *Utjecaj proizvodnih uvjeta i vremena skladištenja na kvalitetu ulja dobivenog iz plodova maslina sorte levantinka*, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2017.

Slika 4, 5, 6, 7, 8: R. Ozimec, J. Karoglan Kontić, E. Maletić, Z. Matotan, F. Strikić, *Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije*, Program Ujedinjenih naroda za razvoj, Zagreb, 2015.

Slike 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 35, 36, 37 i 38 izrađene su u računalnom programu ChemDraw

Slika 19: M. Gugić, M. Šarolić, *Maslina i proizvodi*, Sinj, Ogranak Matice hrvatske, 2017.

Slika 22: http://www.plantmaster.com/gardens/eplant.php?plantnum=2432#tab_images (25.08.2020)

Slika 23: http://www.plantmaster.com/gardens/eplant.php?plantnum=416#tab_images (25.08.2020.)

Slika 24: <http://www.plantmaster.com/gardens/eplant.php?plantnum=481#images> (25.08.2020.)

Slika 25: *European Pharmacopoeia*, 5th Ed., Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines

Slika 26: I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, nerecenzirani nastavni materijali*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2011.

Slika 27: I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, nerecenzirani nastavni materijali*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2011.

Slika 28: I. Jerković, *Kemija aroma*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2011.

Slika 29: I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, nerecenzirani nastavni materijali*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2011.

Slika 30: I. Lovrić, *Aromatični spojevi brnistre*, diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, Split, 2017.

Slika 32: Z. Marijanović, *Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda*, disertacija, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, 2014.

Slika 31, 33 i 34 fotografirane su za vrijeme izrade eksperimentalnog rada u laboratorijima Zavoda za Organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu, Split, srpanj 2020.