Profil hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja

Zenčić, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:167:258373

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLTU

KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA AROMATIZIRANIH MASLINOVIH ULJA

DIPLOMSKI RAD

MARIJANA ZENČIĆ

Matični broj: 94

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLTU

KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA AROMATIZIRANIH MASLINOVIH ULJA

DIPLOMSKI RAD

MARIJANA ZENČIĆ

Matični broj: 94

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF AROMATIZED OLIVE OILS

DIPLOMA THESIS

Marijana Zenčić

Parent number: 94

Split, October 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ani Radonić
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA AROMATIZIRANIH MASLINOVIH ULJA

Marijana Zenčić, 94

Sažetak: Maslina (*Olea euroapea* L.) je jedna od najpoznatijih biljaka mediteranskog podneblja te se smatra najstarijom kultiviranom biljnom vrstom. Iz ploda masline dobiva se maslinovo ulje. U današnje vrijeme sve je više znanstvenih istraživanja i spoznaja o maslinovom ulju te njegovom utjecaju na zdravlje. Osim ljekovitih svojstava, kao što su utjecaj na probavni i krvožilni sustav, maslinovo ulje se koristi u kozmetičke svrhe i održavanje ljepote. U zadnje vrijeme aromatizirano maslinovo ulje dobiva sve veću pažnju u industriji maslinovog ulja gdje je glavni cilj aromatizacije proizvesti alternativne okuse za potrošače. Aromatizirana maslinova ulja predstavljaju novi koncept za poboljšanje okusa, senzornih karakteristika i roka trajanja ulja kao i zadovoljavanje potrošačkih težnji. Hlapljivi spojevi koji se nalaze u biljnom materijalu s kojim se aromatizira maslinovo ulje, kao što su ružmarin, bosiljak, timjan te mnogi drugi, poznati su zbog svoje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, hranjivih svojstava te komercijalne koristi. Korištene su dvije metode izolacije hlapljivih spojeva, destilacija s vodenom parom i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Svi uzorci hlapljivih spojeva, destilat i vršne pare, analizirani su veznim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).Glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja su alifatski alkohol heksan-1-ol i aldehid (*E*)-heks-2-enal koji spadaju u skupinu tzv. "zelenih“ hlapljivih spojeva. Vršne pare maslinovog ulja aromatiziranog s limunom i gorkom narančom su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične. U oba uzorka vršnih para dominira ciklički monoterpenski ugljikovodik limonen bez obzira na upotrijebljeno vlakno. U vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog origanom prevladavaju monoterpenski ugljikovodici limonen, *p*-cimen, γ-terpinen i monoterpenski fenol timol. Glavne komponente vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom, bez obzira na upotrijebljeno vlakno, su ugljikovodik limonen, ciklički monoterpenski eter 1,8-cineol i ugljikovodik *p*-cimen. Glavni hlapljivi spojevi destilata maslinovog ulja aromatiziranog limunom su monoterpenski ugljikovodik limonen i monoterpenski aldehid geranial,spojevi koji su identificirani i u vršnim parama istog ulja.

Ključne riječi: maslinovo ulje, aromatizirana maslinova ulja, hlapljivi spojevi, HS-SPME, GC-MS
Rad sadrži: 53 stranica, 26 slika, 9 tablica, 35 literaturnih referenci
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: 30. listopada 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

Mentor: Ani Radonić, PhD, Associate professor
Technical assistance: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor

VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF AROMATIZED OLIVE OILS

Marijana Zenčić, 94

Abstract: Olive (*Olea euroapea* L.) is one of the most famous plants of the Mediterranean climate and is considered the oldest cultivated plant species. Olive fruit is obtained from olive oil. Nowadays, there is a growing body of scientific research and knowledge about olive oil and its impact on health. In addition to its healing properties, such as its effect on the digestive and circulatory systems, olive oil is used for cosmetic purposes and for the maintenance of beauty. In recent times, aromatized olive oil has been gaining increasing attention in the olive oil industry, because the main objective of aromatization is to produce alternative tastes for consumers. Aromatized olive oils are a new concept for improving flavor, sensory characteristics, shelf life and satisfying consumer preferences. The volatile compounds found in plant material that flavors olive oil, such as rosemary, basil, thyme, and many others, are well known for their antimicrobial and antioxidant activities, nutritional properties and commercial benefits. Two methods of isolation of volatile compounds, steam distillation and headspace solid phase microextraction were used (HS-SPME). All samples of volatile compounds, distillate and headspace vapors were analyzed by gas chromatographic mass spectrometry (GC-MS). The main constituents of olive oil headspaces are aliphatic alcohol hexan-1-ol and aldehyde (*E*) -hex-2-enal, which belong to the so-called. "green" volatile compounds. The headspace vapours of olive oils aromatized with lemone and bitter orange are similar in qualitative and quantitative terms. The cyclic monoterpene hydrocarbon limonene was dominating compound in both headspace vapours regardless of the fiber used. Headspace vapours of olive oil aromatized with oregano are dominated by monoterpene hydrocarbons limonene, *p*-cymene, γ-terpinene and monoterpene phenol thymol. The main components of the headspace vapours of olive oil aromatized with rosemary, regardless of the fiber used, are hydrocarbon limonene, cyclic monoterpene ether 1,8-cineole and hydrocarbon *p*-cymene. The main volatile compounds of the distillate of olive oil aromatized with lemone are the monoterpene hydrocarbon limonene and the monoterpene aldehyde geranial, compounds that are also identified in the headspaces of that olive oil.

Keywords: olive oil, aromatized olive oils, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS
Thesis contains: 53 pages, 26 figures, 9 tables, 35 references
Original in: Croatian**.**

Defence committee:

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

Defence date: October 30, 2019.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić tijekom mjeseca lipnja, 2019. godine.

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojim roditeljima i obitelji što su mi omogućili školovanje te mi pritom bili i najveća potpora. Hvala Vam na beskonačnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

Od srca se zahvaljujem i svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Radonić koja mi je svojim stručnim savjetima pomogla pri izradi ovog rada, kao i na pruženom znanju i velikom razumijevanju tijekom školovanja.

Uz to, htjela bih se zahvaliti i doc. dr. sc. *Zvonimiru Marijanoviću na savjetima i pomoći pri eksperimentalnom radu.*

I na kraju, najviše se zahvaljujem svojem djedu, mojem najvećem kritičaru i motivatoru, kojem i posvećujem ovaj Diplomski rad. Znam da si ponosan tamo negdje Gore.

Marijana Zenčić

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti profil hlapljivih spojeva maslinovog ulja i maslinovih ulja aromatiziranih limunom, gorkom narančom, origanom (mravincem) i ružmarinom:
  ∗ Izolirati hlapljive spojeve iz maslinovog ulja i aromatiziranih maslinovih ulja koristeći metodu mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME).
  ∗ Analizirati uzorke hlapljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).
- Usporediti dobivene rezultate.

SAŽETAK

Maslina (*Olea euroapea* L.) je jedna od najpoznatijih biljaka mediteranskog podneblja te se smatra najstarijom kultiviranom biljnom vrstom. Iz ploda masline dobiva se maslinovo ulje. U današnje vrijeme sve je više znanstvenih istraživanja i spoznaja o maslinovom ulju te njegovom utjecaju na zdravlje. Osim ljekovitih svojstava, kao što su utjecaj na probavni i krvožilni sustav, maslinovo ulje se koristi u kozmetičke svrhe i održavanje ljepote. U zadnje vrijeme aromatizirano maslinovo ulje dobiva sve veću pažnju u industriji maslinovog ulja gdje je glavni cilj aromatizacije proizvesti alternativne okuse za potrošače. Aromatizirana maslinova ulja predstavljaju novi koncept za poboljšanje okusa, senzornih karakteristika i roka trajanja ulja kao i zadovoljavanje potrošačkih težnji. Hlapljivi spojevi koji se nalaze u biljnom materijalu s kojim se aromatizira maslinovo ulje, kao što su ružmarin, bosiljak, timjan te mnogi drugi, poznati su zbog svoje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, hranjivih svojstava te komercijalne koristi. Korištene su dvije metode izolacije hlapljivih spojeva, destilacija s vodenom parom i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Svi uzorci hlapljivih spojeva, destilat i vršne pare, analizirani su veznim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja su alifatski alkohol heksan-1-ol i aldehid (*E*)-heks-2-enal koji spadaju u skupinu tzv. "zelenih“ hlapljivih spojeva. Vršne pare maslinovog ulja aromatiziranog s limunom i gorkom narančom su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične. U oba uzorka vršnih para dominira ciklički monoterpenski ugljikovodik limonen bez obzira na upotrijebljeno vlakno. U vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog origanom prevladavaju monoterpenski ugljikovodici limonen, *p*-cimen, γ-terpinen i monoterpenski fenol timol. Glavne komponente vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom, bez obzira na upotrijebljeno vlakno, su ugljikovodik limonen, ciklički monoterpenski eter 1,8-cineol i ugljikovodik *p*-cimen. Glavni hlapljivi sastojci destilata maslinovog ulja aromatiziranog limunom su monoterpenski ugljikovodik limonen i monoterpenski aldehid geranial,spojevi koji su identificirani i u vršnim parama istog ulja.

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

SUMMARY

Olive (*Olea euroapea* L.) is one of the most famous plants of the Mediterranean climate and is considered the oldest cultivated plant species. Olive fruit is obtained from olive oil. Nowadays, there is a growing body of scientific research and knowledge about olive oil and its impact on health. In addition to its healing properties, such as its effect on the digestive and circulatory systems, olive oil is used for cosmetic purposes and for the maintenance of beauty. In recent times, aromatized olive oil has been gaining increasing attention in the olive oil industry, because the main objective of aromatization is to produce alternative tastes for consumers. Aromatized olive oils are a new concept for improving flavor, sensory characteristics, shelf life and satisfying consumer preferences. The volatile compounds found in plant material that flavors olive oil, such as rosemary, basil, thyme, and many others, are well known for their antimicrobial and antioxidant activities, nutritional properties and commercial benefits. Two methods of isolation of volatile compounds, steam distillation and headspace solid phase microextraction were used (HS-SPME). All samples of volatile compounds, distillate and headspace vapors were analyzed by gas chromatographic mass spectrometry (GC-MS).

The main constituents of olive oil headspaces are aliphatic alcohol hexan-1-ol and aldehyde (*E*) -hex-2-enal, which belong to the so-called. "green" volatile compounds. The headspace vapours of olive oils aromatized with lemone and bitter orange are similar in qualitative and quantitative terms. The cyclic monoterpene hydrocarbon limonene was dominating compound in both headspace vapours regardless of the fiber used. Headspace vapours of olive oil aromatized with oregano are dominated by monoterpene hydrocarbons limonene, *p*-cymene, *γ*-terpinene and monoterpene phenol thymol. The main components of the headspace vapours of olive oil aromatized with rosemary, regardless of the fiber used, are hydrocarbon limonene, cyclic monoterpene ether 1,8-cineole and hydrocarbon *p*-cymene. The main volatile compounds of the distillate of olive oil aromatized with lemone are the monoterpene hydrocarbon limonene and the monoterpene aldehyde geranial, compounds that are also identified in the headspaces of that olive oil.

Key words: olive oli, aromatized olive oils, volatile compounds, HS-SPME, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD 1

1. **OPĆI DIO** 2

1.1. Maslina 2

1.2. Građa i kemijski sastav ploda masline 3

1.3. Autohtone sorte maslina u Dalmaciji 5

1.4. Maslinovo ulje 8

1.4.1. Kemijski sastav maslinovog ulja 8

1.5. Aromatizirana maslinova ulja 15

1.5.1. Hlapljivi spojevi u aromatiziranim maslinovim uljima 15

1.6. Agrumi (lat. *Citrus*) 19

1.6.1. Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.) 19

1.6.2. Limun (*Citrus limon*) 20

1.7. Ljekovito i aromatično bilje 20

1.7.1. Origano (*Origanum vulgare* L.) 21

1.7.2. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 22

1.8. Metode izolacije hlapljivih spojeva 22

1.8.1. Destilacija 22

1.8.2. Ekstrakcija 25

1.8.3. Sorpcijske tehnike 26

1.9. Analiza hlapljivih spojeva 27

1.9.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa 28

2. **EKSPERIMENTALNI DIO** 30

2.1. Materijal 30

2.2. Kemikalije i aparatura 30

2.3. Izolacija hlapljivih spojeva 31

2.3.1. Destilacija vodenom parom 31

2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi 32

2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva 34

3. **REZULTATI** 36

3.1. GC/MS analiza hlapljivih spojeva 36

4. **RASPRAVA** 43

4.1. Hlapljivi spojevi vršnih para 43

4.2. Hlapljivi spojevi destilata 47
5. **ZAKLJUČAK** 49
6. **LITERATURA** 51

UVOD

Maslina (*Olea euroapea* L.) je jedna od najpoznatijih biljaka mediteranskog podneblja te se smatra najstarijom kultiviranom biljnom vrstom. Širenje kulture uzgoja masline započelo je prije 6000 godina u srednjoj Aziji te se širilo preko Irana, Sirije i Palestine do ostalih zemalja mediteranskog područja.[1]

Važnost masline kroz povijest ima i simboličko značenje. Najstariji zapisi u kojima se spominje stablo masline nalaze se u Bibliji, gdje se maslina spominje oko 100 puta, a maslinovo ulje približno 140 puta. Maslina je bila veoma cijenjena u drevnoj Grčkoj i Rimu. Stari Grci i Rimljani smatrali su je zaštitnicom mira, ljubavi, braka, strpljenja, plodnosti, postojanosti i mudrosti.[1,2]

Maslinovo ulje je sinonim za zdravi način prehrane i moderni način življenja. Prema različitim istraživanjima, maslinovo ulje ima obrambeni učinak na metabolizam čovjeka, povoljno djeluje na želudac, krvne žile i arterije, jetru i žučne putove, produžuje život starijih osoba i poboljšava rast djece.[1]

U kemijskom smislu, maslinovo ulje je smjesa glicerida u kojima prevladava jednostruko nezasićena oleinska kiselina s manjim, ali poželjnim, sadržajem linolne i α-linolenske kiseline. Maslinovo ulje bogato je antioksidansima kao što su tokoferoli i fenolni spojevi. Zbog njegovog uravnoteženog kemijskog sastava preproučuju ga nutricionisti, a istovremeno i gastronomi zbog specifičnih senzorskih osobina koje obogaćuju čulo okusa.

U zadnje vrijeme aromatizirano maslinovo ulje dobiva sve veću pažnju u industriji maslinovog ulja gdje je glavni cilj aromatizacije proizvesti alternativne okuse za potrošače. Aromatizirana maslinova ulja predstavljaju novi koncept za poboljšanje okusa, senzornih karakteristika i roka trajanja ulja kao i zadovoljavanje potrošačkih težnji. Hlapljivi spojevi koji se nalaze u biljnom materijalu s kojim se aromatizira maslinovo ulje, kao što su ružmarin, bosiljak, timjan te mnogi drugi, poznati su zbog svoje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, hranjivih svojstava te komercijalne koristi.[3]

1. OPĆI DIO

1.1. Maslina

Maslina (*Olea euroapea* L.) je višegodišnja i ljekovita biljka iz porodice maslina (Oleaceae). Kao biljka, maslina pripada zajednici česmine ili crnike što najviše odgovara mediteranskom području. Područje za uzgoj maslina najbolje odgovara mediteranskom tipu klime koji se prostire između 30 ° i 46 ° južne i sjeverne polutke Zemlje. Većina (95 %) nasada maslina nalazi se duž Mediterana, dok je ostatak zastupljen na području Australije, Indije, sjeverne i južne Amerike.[2,4]



Slika 1. *Olea euroapea* L.[5]

Maslina (slika 1) je široko zimzeleno stablo koje može narasti od 3 do 20 metara, ovisno o kojoj se sorti i ekološkim uvjetima radi. Međutim, visina joj se održava od 2 do 5 metara radi sigurnosnih uvjeta tijekom berbe. Deblo mlade masline je zelenkaste boje i glatke strukture, dok se starenjem na njemu pojavljuju izbočine tamno sive boje koje se nazivaju intarzijama. Debljina debla doseže 1 metar, no može biti i deblje ako ne istrune zbog lošeg održavanja. Na kraju listova nalaze se okrugli ili cvjetni te šiljasti ili drvni pupovi. Cvjetovi su grozdasti, žuto-bijele boje i ugodnog mirisa. Listovi su s vanjske strane

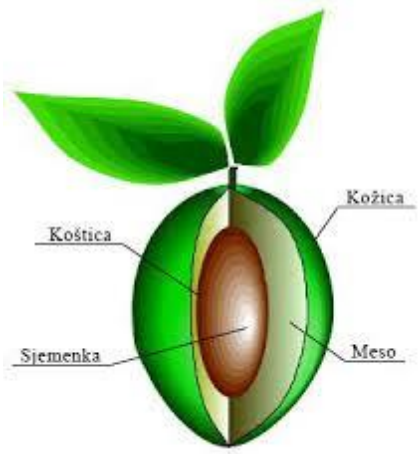
maslinasto zelene boje, a s unutrašnje svilenkasto bijele boje. Oblik listova može biti kopljasti do eliptični. Plod masline prvo je zelene boje, a zrenjem mijenja boju u tamnoljubičastu ili crnu. Zrenjem ploda maslina gubi gorčinu te se povećava udio ulja u samom plodu. Maslina većinom uspijeva u krajevima gdje se temperatura ne spušta ispdod 0 °C pa je zato i rasprostranjena duž morske obale.[2,4,6]

Poznato je da masline mogu živjeti dugo i razmnožavati se vegetativno. Samo jedna generacija kod maslina može trajati i do nekoliko tisuća godina. Smatra se da većina današnjih sorti maslina predstavlja fenotipski selekcionirane jedinke koje potječu od genotipova ishodišnih divljih populacija. Genetske strukture prvobitne biljke isključivo su sačuvane zbog vegetativnog načina razmnožavanja usljed različitih mutacija.[6]

1.2. Građa i kemijski sastav ploda masline

Maslina cvjeta u razdoblju od svibnja do lipnja. Većina cvjetova počinje rano opadati pa se samo jedan dio cvjetova pretvori u plod. Plodovi se počinju razvijati tijekom ljeta te u rujnu dolazi do njihovog sazrijevanja.[7]

Plod masline (slika 2) je bobica duguljastog ili okruglastog oblika koja se sastoji od dva glavna dijela: pulpe (perikarpa) i koštice (endokarpa). Pulpa (perikarp) se sastoji od pokožice (epikarp) koji je najtanji i ujedno zaštitni sloj ploda masline građen od sloja stanica bogatih kloroplastom i mesa ploda (mezokarp) u kojem se nalazi najveći udio ulja samog ploda.[6,7]



Slika 2. Građa ploda masline[6]

Mezokarp odnosno meso ploda sastoji se od velikog broja stanica i vlakana kao što su celuloza i lignin. Tijekom sazrijevanja stanice mezokarpa mijenjaju svoj oblik, veličinu i funkciju. Ulje se nalazi u citoplazmi dok se tvari topljive u vodi nalaze u stanicama vakuole. Meso ploda sadrži vodu, ulje, ugljikohidrate, minerale, vitamine, proteine, vlakna i pigmente. Također, u stanicama mezokarpa nalazi se i klorofil koji se zrenjem gubi. Pulpa čini 78 do 80 % težine ploda, dok pokožica čini 1,3 do 3,5 % težine ploda.

Endokarp čini drvenasta koštica koja obavija i štiti sjemenku. Koštice plodova masline su različitog oblika i veličine te imaju specifičnu površinu prema kojoj se mogu identificirati kojoj sorti pripadaju.[2]

Zreli plodovi maslina sadrže vodu, ulje, dušične spojeve, nedušične spojeve, celulozu i pepeo (tablica 1).

Tablica 1. Kemijski sastav ploda masline[2]

SASTOJCI (%)	**PLOD MASLINE**	**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

Od dušičnih spojeva u mezokarpu se nalaze aminokiseline, enzimi i proteini. Sastojci topljivi u mastima (liposolubilni) pulpe maslina su pigmenti, karotenoidi, vitamin A i viši ugljikovodici. Tanini, lignini, antocijani, oleuropeina i mnogi drugi antioksidansi koji su pronađeni u plodu maslina, točnije u samoj pulpi ploda, su fenolne tvari. Nadalje, u pulpi masline od tvari koje su topljive u vodi (hidrosolubilne) nalaze se monosaharidi, disaharidi, polisaharidi i organske kiseline kao što su jabučna, limunska i oksalna kiselina. Glavni biorazgradljivi ugljikohidrat u mesu ploda je glukoza, a slijede frukotoza, saharoza i manitol. Sadržaj pojedinih sastojaka u plodu masline ovisi o sorti, agrotehničkim zahvatima te stupnju dozrelosti.[2]

1.3. Autohtone sorte maslina u Dalmaciji

Elajografija je znanstvena disciplina koja se bavi istraživanjem sorti maslina.[2] Sorta ili kultivar je skupina kultiviranih biljaka iste vrste koje su stvorene oplemenjivanjem, istih ili različitih genotipova, s određenim genetskim, morfološkim, fiziološkim i proizvodnim svojstvima.[8] Sorte maslina se razlikuju po načinu rasta, oblika i bujnosti krošnje, obliku, boji i veličini ploda, lista i koštice, dobu cvatnje, intenzitetu samooplodnje, dobi sazrijevanja te količini i kvaliteti ulja. Svaka sorta sadrži različiti tip ulja. Razlika među kultivarima se može uočiti i u različitoj otpornosti prema niskim temperaturama, suši i bolestima.[9]

Hrvatska maslinarska regija podijeljena je u šest podregija uzgoja: Istra, Hrvatsko primorje i Kvarnerski otoci, sjeverna Dalmacija, srednja Dalmacija, južna Dalmacija i unutrašnjost Dalmacije.[10]

Na području južne Dalmacije glavna domaća sorta je oblica, potom slijede lastovka, bjelica, drobnica, murgulja, sitnica te ostale manje važne sorte. U srednjoj Dalmaciji glavne sorte koje se uzgajaju su oblica, levantinka, drobnica, lastovka i sitnica. Na području sjeverne Dalmacije glavne sorte su oblica, karbunčela, drobnica i oštrica, dok su u unutrašnjosti Dalmacije najzastupljenije sorte oblica i istarska bjelica.[10]

Oblica (slika 3) je najbrojnija i gospodarski najvažnija sorta masline koja se na našem području uzgaja više od 2000 godina. Uzgaja se na čitavom području Republike Hrvatske te je uvrštena na Sortnu listu Republike Hrvatske. Oblica razvija srednje bujno stablo i krošnju okruglog oblika. List je srednje krupan, širok i dug, eliptičnog oblika s valovitom površinom, sivomaslinaste boje lica. Plod oblice je krupan i okrugao te mu masa varira

od 2,5 do 14,5 grama, uz prosječnu masu oko 5 grama. Sorta se koristi za konzerviranje te preradu u ulje. Oblica neujednačeno sazrijeva pa na stablu nalazimo plodove različite obojenosti od zelene, ljubičaste do potpuno crne boje. Sadržaj ulja u plodu je 18–21 %, ovisno o uzgojnom području i uvjetima uzgoja. Također, sorta ima visoku toleranciju na sušu, dobro uspijeva na siromašnim tlima te podnosi jake udare vjetra. Adaptabilna je sorta i može se uzgajati na različitim nadmorskim visinama i položajima. Poseban potencijal sorte je dobra otpornost na niske temperature što omogućuje njezin uzgoj u unutrašnjosti Dalmacije ili nekim hladnijim položajima obalnog dijela.[10]



Slika 3. Oblica[11]

Levantinka se uzgaja na području južne i srednje Dalmacije. Njezino porijeklo nije poznato, no njezin naziv podsjeća na Levant, stari naziv za područje Bliskog istoka. Ova sorta masline najviše se uzgaja na otoku Šolti. Levantinka razvija bujno stablo s okruglastom krošnjom. List je velik, širok i dug, blago uvijen, tamnozelene boje lica, dok je naličje bjelkaste boje. Plod (slika 4) je srednje krupan, eliptično izdužen i blago uvijen prema vrhu. Prosječna masa ploda je 4,5 grama. Ova sorta rađa u grozdovima, a u jednom grozdu ima između tri i pet plodova. Pred početak zrenja plod je zelene boje koja postupno prelazi u crvenoljubičastu i na kraju je crne boje. Levantinka rađa redovito i obilno za razliku od oblice. Ulje levatinke je dobre kvalitete te mu je udio u plodu oko 20 %. Gospodarski je veoma važna sorta zbog redovite i obilne rodnosti te dobre otpornosti na rak masline. Slabo je otporna na sušu, zahtijeva tla bolje bonitetne klase, no dobro je otporna na jake vjetrove.[10]



Slika 4. Levantinka[12]

Lastovka (slika 5) je autohtona sorta masline koja potječe s otoka Korčule. Uzgoj ove sorte ograničen je na područje južne i srednje Dalmacije. Lastovka razvija srednje bujno stablo s krošnjom oblika piramide usljed uspravnog rasta grana. List je sitan, uzak i kratak, kopljastog izgleda, tamnozelene boje lica. Plod lastovke je eliptično izdužen, srednje krupan, prosječne mase 3,0 grama. Intenzivno je zelene boje, a tijekom zrenja poprima blijedozelenu boju koja prelazi u crnu. Lastovka je izrazito samooplodna sorta, radi čega rađa redovito i obilno. Ova sorta masline daje kvalitetno ulje s udjelom ulja u plodu od 24 % što je najveći udio od svih ostalih sorti. Lastovka je od svih sorti najotpornija na sušu, ali je osjetljiva na niske temperature i napad raka masline.[10]



Slika 5. Lastovka[11]

1.4. Maslinovo ulje

U današnje vrijeme sve je više znanstvenih istraživanja i spoznaja o maslinovom ulju te njegovom utjecaju na zdravlje. Osim ljekovitih svojstava, kao što su utjecaj na probavni i krvožilni sustav, maslinovo ulje se koristi u kozmetičke svrhe i održavanje ljepote. Maslinovo ulje dobiva se iz ploda masline. Ulje se nalazi unutar stanice ploda te se stvara procesom lipogeneze. Lipogeneza je proces koji traje od formiranja ploda krajem mjeseca srpnja pa do najvećeg mogućeg sadržaja ulja u plodu. Količina ulja u stanici raste tijekom jeseni i zime i svoj maksimum, u toplijim krajevima, postiže između kraja studenog i siječnja. Optimalna tehnološka zrelost za preradu plodova u ulje ovisi o sorti i području uzgoja. Jednom kada plod masline postigne najveći stupanj zrelosti, daljnje povećanje udjela ulja u njemu nije posljedica stvaranja ulja. Naime, dolazi do gubitka vode, a smanjuje se kakvoća i kvaliteta ulja.[2,4,6]

Djevičansko maslinovo ulje je ulje koje se dobiva izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, a sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.[4]

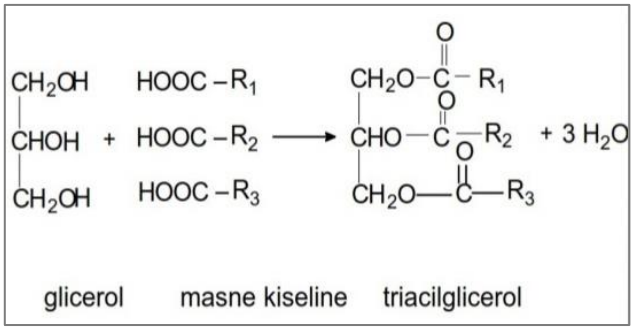
Postupci prerade plodova masline uključuju berbu, transport ploda, skladištenje ploda, odvajanje lišća i pranje ploda, mljevenje, miješanje, odvajanje ulja, čišćenje ulja, odvajanje taloga, skladištenje ulja, filtriranje ulja, pakiranje ulja u boce, skladištenje pakovina te zbrinjavanje otpada.[4]

1.4.1. Kemijski sastav maslinovog ulja

Prema kemijskom sastavu, maslinovo ulje se sastoji od uljne ili osapunjive frakcije i neuljne ili neosapunjive frakcije.[2] Osapunjivi dio ulja čine slobodne masne kiseline sa C_{14} do C_{24} i triacilgliceroli, a njihov udio u ulju je 98 %. U neosapunjivi dio maslinovog ulja spadaju ugljikovodici, triterpenski alkoholi, fosfolipidi, tokoferoli, fenoli, steroli, voskovi, pigmenti i hlapljivi spojevi koji su većinom sekundarni metaboliti i mogu se koristiti u karakterizaciji ulja. Njihov udio u maslinovom ulju manji je od 2 %.[4,2]

1.4.1.1. Osapunjivi dio maslinovog ulja

Najveći udio osapunjivog dijela maslinovog ulja predstavljaju acilgliceroli ili gliceridi. **Acilgliceroli** su esteri masnih kiselina i trovalentnog alkohola glicerola. Reakcija esterifikacije (slika 6) se može odvijati na jednoj, dvije ili sve tri hidroksilne skupine glicerola te ovisno o tome mogu nastati mono-, di- ili triacilgliceroli. Postoje jednostavni i mješoviti triacilgliceroli. Kada su sve tri masne kiseline u molekuli triacilglicerola iste onda su to jednostavni trigliceridi, a ako su masne kiseline različite triacilgliceroli su mješoviti. Položaj masnih kiselina u molekuli triacilglicerola je prirodno uvjetovan. Zasićene masne kiseline se većinom vežu na atom ugljika na poziciji 1, dok se nezasićene masne kiseline vežu na atom uglika u položaju 2.[2]



Slika 6. Reakcija esterifikacije[13]

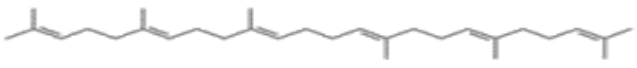
Masne kiseline predstavljaju reaktivni dio molekule glicerida (acilglicerola), a sastoje se sastoje od dugog, ravnog ugljikovodičnog lanca i karboksilne skupine, –COOH. U maslinovom ulju najzastupljenije masne kiseline su oleinska, palmitinska, linolna i stearinska (tablica 2). Oleinska kiselina je najzastupljenija masna kiselina u gliceridima maslinovog ulja (55 do 83 % u ukupnom sastavu masnih kiselina) za razliku od ostalih masnih kiselina koje su zastupljene u manjim koncentracijama. Palmitinska i stearinska kiselina su zasićene masne kiseline, dok su linolna i linolenska kiselina esencijalne masne kiseline. Maslinovo ulje visoke kvalitete ima umjerenu količinu zasićenih masnih kiselina (oko 16 %), visoku koncentraciju oleinske kiseline (70-80 %) te veoma povoljnu količinu esencijalnih masnih kiselina (8-10 %) što ga čini bitno različitim od ostalih biljnih ulja i masti.[2]

Tablica 2. Udio masnih kiselina u maslinovom ulju[2]

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
Linolenska kiselina	≤ 0,9
Miristinska kiselina	≤ 0,1
Arahinska kiselina	≤ 0,6
Behenska kiselina	≤ 0,2
Lignocerinska kiselina	≤ 0,2
Heptadekanska kiselina	≤ 0,3
Heptadecenska kiselin	≤ 0,3
Gadoleinska kiselina	≤ 0,4

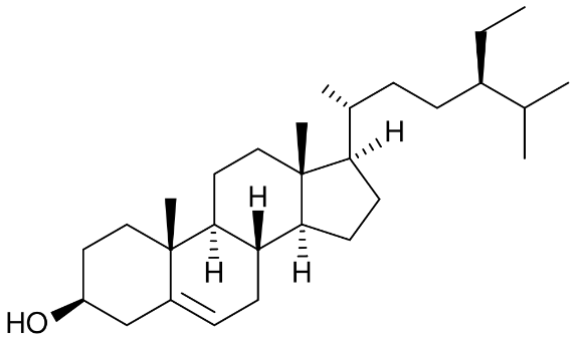
1.4.1.2. Neosapunjivi dio maslinovog ulja

Ugljikovodici su najzastupljeniji sastojci u neosapunjivom dijelu maslinovog ulja i čine 50-60 % ukupnog sadržaja. Skvalen (slika 7) je ugljikovodik koji je najviše zastupljen u maslinovom ulju.[2]



Slika 7. Stukturna formula skvalena[14]

Steroli (steroidni alkoholi) su podgrupa steroida, velike i vrlo raznolike skupine prirodnih spojeva. Prema kemijskom sastavu, steroli su visokomolekularni ciklički alkoholi, derivati ciklopentanofenantrena. U maslinovim uljima udio i sastav sterola ovisi o sorti, zrelosti plodova, načinu prerade, agrotehničkim i klimatskim uvjetima. Najznačajniji sterol u maslinovom ulju je *β*-sitosterol (slika 8). Parametar koji se koristi kod određivanja čistoće i kvalitete maslinovih ulja je udio sterola. Npr. rafinirana maslinova ulja imaju manji udio sterola nego djevičanska maslinova ulja.[2]



Slika 8. Strukturna formula *β*-sitosterola[15]

Tokoferoli su neuljni sastojci maslinovog ulja. Postoje četiri tipa tokoferola koja su prisutna u maslinovom ulju,a to su; *α*-, *β*-, *γ*-, *δ*-tokoferol. Najveći udio u maslinovom ulju ima α-tokoferol (55-370 mg/kg) za razliku od ostalih tokoferola čiji su udjeli mnogo manji.[2]

Fosfolipidi su u maslinovom ulju prisutni u vrlo malim količinama (40-135 mg/kg), što ovisi o biološkim i tehnološkim uvjetima, a naročito o starosti ulja. Fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatdilinozitol i fosfatidilserin su najzastupljeniji fosfolipidi u maslinovom ulju koji imaju antioksidacijsko djelovanje.[2]

Pigmenti zastupljeni u maslinovom ulju mogu se podijeliti u dvije skupine; klorofilne pigmente i karatenoide. Klorofil a i b te feoftin a i b su klorofilni pigmenti koje nalazimo u djevičanskom maslinovom ulju. Feoftin a je najzastupljeniji pigment u maslinovom

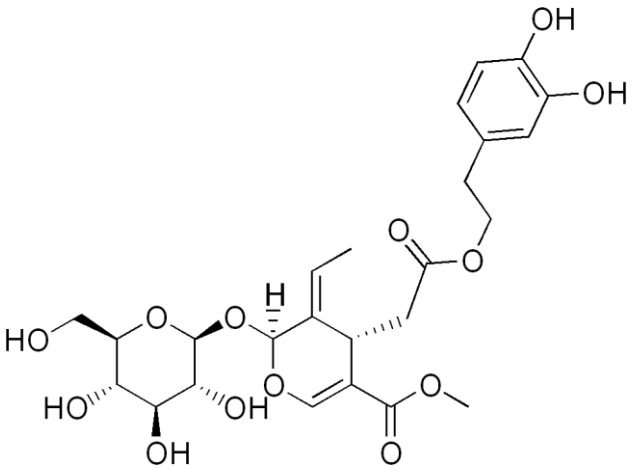
ulju. Karatenoidi koje nalazimo u maslinovom ulju su tetraterpenski nezasićeni ugljikovodici u koje spadaju β-karoten i likopen te njihovi oksidirani derivati, ksantofili, od kojih je najvažniji lutein. Koliko će obje skupine pigmenata biti zastupljene u ulju ovisi o području uzgoja, zrelosti plodova, sorti, načinu prerade i uvjetima čuvanja samog ulja. Kada govorimo o uvjetima čuvanja maslinovog ulja, ulje je poželjno čuvati u tamnim bocama, bez prisustva zraka i svjetlosti, a razlog tome je što klorofili i njihovi derivati ubrzavaju oksidaciju ulja na svjetlu, dok u mraku djeluju kao sinergisti fenolnim spojevima, odnosno kao antioksidansi.[2]

Voskovi nastaju procesom esterifikacije iz viših monohidroksi alkohola i masnih kiselina. Na temelju udjela voskova u maslinovom ulju može se razlikovati kojim je postupkom dobiveno maslinovo ulje. Udio voskova u djevičanskom maslinovom ulju je većinom manji od 150 mg/kg, naspram rafiniranih, sirovih i ulja dobivenih ekstrakcijom organskim otapalima gdje je njihov udio veći od 2000 mg/kg.[2]

Sastav i sadržaj **triterpenskih alkohola** u maslinovom ulju ovisi o sorti, klimi i načinu prerade. Najznačajniji triterpenski alkoholi u ulju su: β-amirin, butiospermol i 24-metilencikloartanol. Eritrodiol i uvaol su pentaciklički triterpenski dioli koji se također nalaze u neuljnoj frakciji maslinovog ulja, a udio im ovisi o sorti masline.[2]

Fenolni spojevi su najznačajniji antioksidansi u maslinovom ulju koji pridonose stabilnosti ulja od oksidacijskih promjena. Udio fenolnih spojeva u maslinovom ulju (40–1000 mg/kg) određuje njegovu kvalitetu i senzorska svojstva. Polifenoli su drugi naziv za fenolne sastojke, a u maslinovom ulju oni čine spojeve različite kemijske strukture. Sastav fenolnih sastojaka kao i njihova koncentracija ovise o stupnju zrelosti, sorti, području uzgoja te načini prerade ulja. Fenolne kiseline, fenolni alkoholi, flavonoidi, sekoiridoidi i lignani spadaju u hidrofilne fenole koji se nalaze u djevičanskom maslinovom ulju te su veoma važni zbog svoje antioksidacijske aktivnosti, zaštite ulja od kvarenja te pozitivnog utjecaja na zdravlje, što maslinovo ulje izdvaja od ostalih biljnih

ulja. Najznačajniji i najzastupljeniji polifenolni spoj, sekoiridoid, u maslinovom ulju je oleuropein (slika 9).[2]



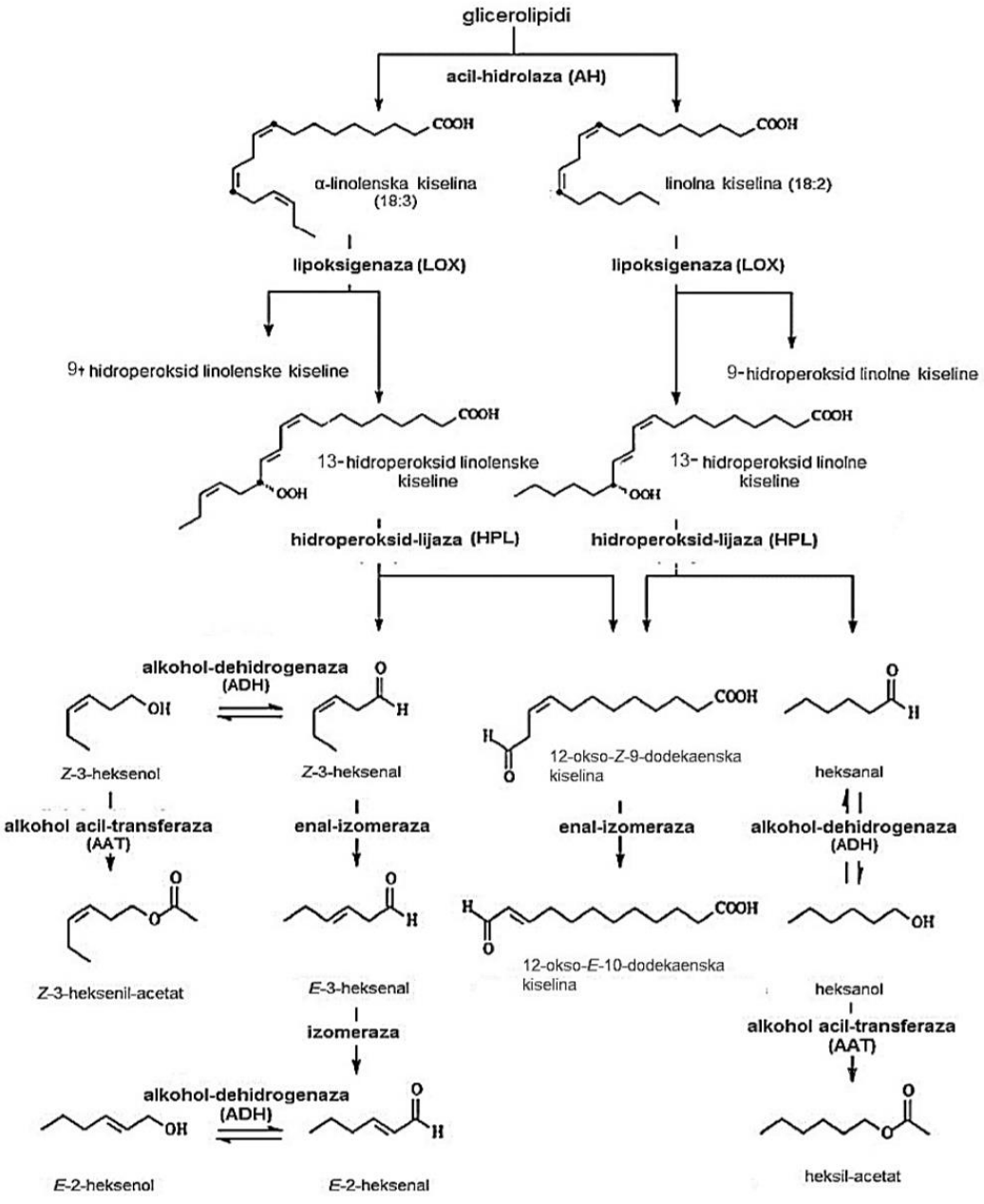
Slika 9. Strukturna formula oleuropeina[16]

Hlapljivi spojevi se također nalaze u negliceridnom dijelu maslinovog ulja te su zaslužni za njegovu aromu pa se često nazivaju i „spojevi arome“ (od engl. *aroma compounds*). Većina hlapljivih spojeva koje pridonose aromi maslinovog ulja pripadaju alifatskim i aromatskim ugljikovodicima, alkoholima, aldehidima, ketonima, esterima, eterima, furanima te derivatima tiofena. Udio hlapljivih spojeva u maslinovom ulju ovisi o sorti, zrelosti ploda, agronomskim faktorima, geografskom području te preradi ulja.[4,2]

Među hlapljivim sastojcima u maslinovom ulju najzastupljenija je C_6 i C_5 grupa spojeva. Prema različitim istraživanjima utvrđeno je da većina djevičanskih maslinovih ulja sadrži sljedeće spojeve: C_6 aldehide (heksanal, *Z*-heks-3-enal, *E*-heks-2-enal), C_6 alkohole (heksanol, *Z*-heksan-3-ol, *E*-heksan-2-ol) i acetatne estere (heksil-acetat i *Z*-heks-3-enil-acetat).[17]

Nastanak hlapljivih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima pripisuje se slijedu biokemijskih reakcija koje zajedno čine lipoksigenazni put. Tijekom procesa prerade maslina u ulje dolazi do oštećenja tkiva ploda masline, a kao rezultat imamo oslobođenje enzima lipoksigenaznog puta. Acil-hidrolaza je enzim kojim se na početku lipoksigenaznog puta oslobađa kiselina iz glicerolipida. Potom slijedi oskidacija dvostruko i višestruko nezasićene masne kiseline do hidroperoksida uz pomoć enzima

lipoksigenaze. Nadalje, hidroperoksid-liaza cijepa hidroperoksid te nastaju hlapljivi aldehidi. U konačnici, aldehidi se reduciraju do alkohola uz pomoć alkohol-dehidrogenaze koji pod djelovanjem acil-transferaze prelaze u estere (slika 10).[17]



Slika 10. Lipoksigenazni put nastanka hlapljivih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima[17]

1.5. Aromatizirana maslinova ulja

Maslinovo ulje jedan je od najpoznatijih proizvoda Mediterana koje se po svojoj posebnoj aromi i okusu razlikuje od ostalih biljnih ulja. U zadnje vrijeme aromatizirano maslinovo ulje dobiva sve veću pažnju u proizvodnji maslinovog ulja. Glavni cilj aromatizacije maslinovog ulja je postizanje alternativnih okusa kako bi se privukli i oni potrošači kojima osnovna aroma maslinovog ulja nije draga. Aromatizirano maslinovo ulje većinom se proizvodi u manjim manufakturama.

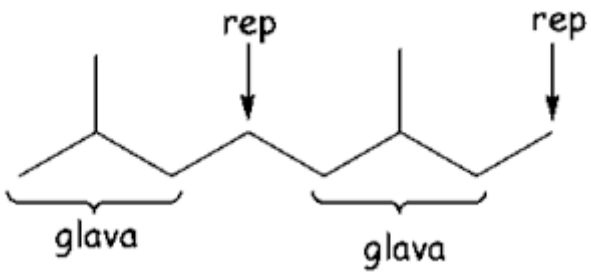
Za aromatizaciju maslinovog ulja koriste se različite tehnike. Većinom to uključuje miješanje ekstrakta aromatičnog bilja s maslinovim uljem ili izravno dodavanje bilja u ulje. Međutim, ovakav način aromatizacije ulja može dovesti do zamućenja i koekstrakcije nepoželjnih sastojaka. Suprotno tome, neke tehnike aromatizacije uključuju izravno dodavanje biljnog materijala maslinama ili maslinovoj pasti tijekom koraka mljevenja i malaksacije u preradi maslina u ulje. Biljke, a naročito aromatično bilje, koriste se u aromatizaciji ulja zbog jakih aroma, blagotovornog djelovanja na zdravlje i značajnog prehrambenog potencijala. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je jedna od najpoznatijih biljaka koja se koriste u aromatizaciji maslinovog ulja, no mogu se koristiti i druge aromatične i začinske biljke te citrusi.[18]

1.5.1. Hlapljivi spojevi u aromatiziranim maslinovim uljima

1.5.1.1. Terpeni

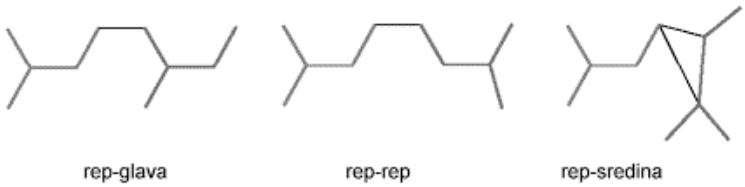
Većinu hlapljivih spojeva koji se nalaze u aromatiziranim maslinovim uljima čine terpeni (terpenoidi, izoprenoidi). Terpeni su glavni sastojci eteričnih ulja različitih biljnih vrsta (lavande, ružmarina, ruže, citrusa…). Naziv terpeni potječe od terpentina (*Balsamum terebinthinae*), hlapljive tekućine koja se dobiva destilacijom smole drveta bora. Spojevi koji su izolirani iz terpentina dobili su naziv terpeni.[19]

Osnovni strukturni element terpena je izopren (2-metilbuta-1,3-dien), spoj izgrađen od 5 ugljikovih atoma (tzv. C_5-izoprenska jedinica). Građa pravilnih terpena definirana je **izoprenskim pravilom** kojeg je predložio njemački znastvenik Otto Wallach 1881. godine, a poslije i utvrdio Lavoslav Ružička. Prema tom pravilu, redosljed vezivanja izoprenskih jedinica je „glava-rep“, odnosno razgranati završetak jedne C_5-jedinice, povezuje se na nerazgranati završetak druge C_5-jedinice (slika 11).[20]



Slika 11. Izoprensko pravilo[21]

Postoje i nepravilni terpeni čije se izoprenske jedinice povezuju na drugačiji način (slika 12.).



Slika 12. Prikaz načina povezivanja nepravilnih terpena[19]

Prema broju izoprenskih jedinica, odnosno broju ugljikovih atoma, terpeni se mogu podijeliti na semiterpene, monoterpene, seskviterpene, diterpene, triterpene, tetraterpene i politerpene (tablica 3).

Tablica 3. Podjela terpena[20]

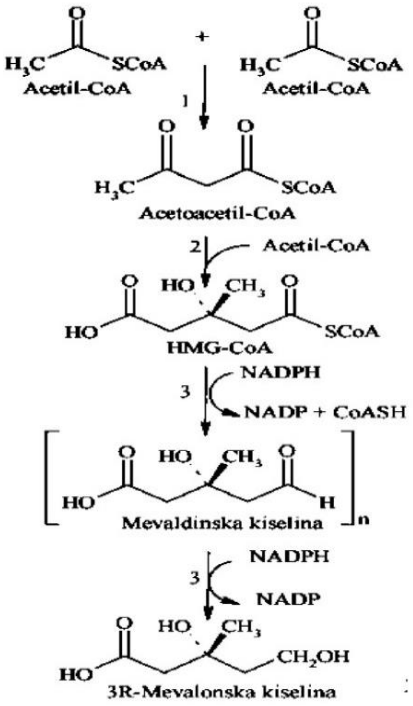
Vrsta	Broj C-atoma	Broj izoprenskih jedinica
Semiterpeni	5	1
Monoterpeni	10	2
Seskviterpeni	15	3
Diterpeni	20	4
Triterpeni	30	6
Tetraterpeni	40	8
Politerpeni	$(5)_n$	n

Navedeni terpeni mogu se dalje podijeliti ovisno o broju prstena u molekuli na:

- acikličke terpene,
- monocikličke terpene,
- bicikličke,
- tricikličke,
- tetracikličke.[19]

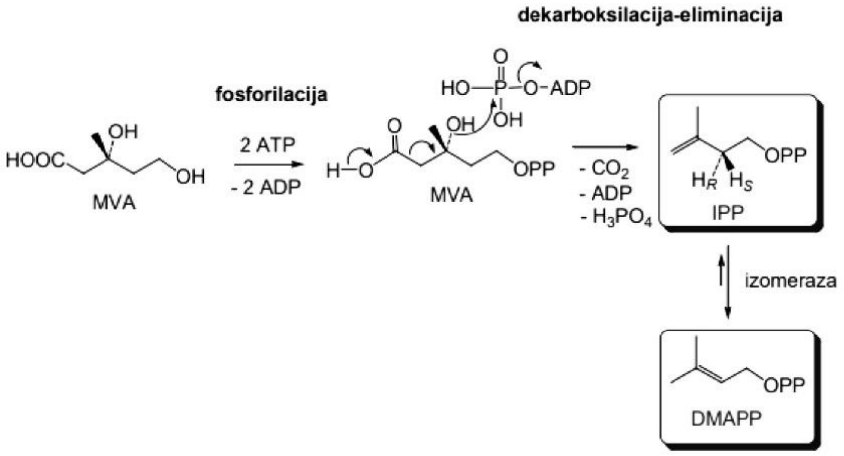
S obzirom na funkcijsku skupinu terpeni mogu biti ugljikovodici, alkoholi, esteri, kiseline, fenoli, aldehidi, ketoni te mnogi drugi spojevi.[20]

Osnovni strukturni element terpena, izopren ne sudjeluje u biosintezi terpena, već biokemijski aktivne izoprenske jedinice, njegovi piruvatni i difosfatni esteri. Terpenoidi, odnosno biosintetski ishodni spojevi terpena, 2-izopentenil-pirofosfat (2-IPP), dimetilalil-pirofosfat (DMAPP) i 3-izopentenil-pirofosfat (3-IPP), nastaju biosintezom iz mevalonske kiseline (MVA) ili deoksiksiluloza-5-fosfata (DXP). Polazni spoj mevalonskog biosintetskog puta (slika 13) je acetil-koenzim A (acetil-CoA). Dvije molekule acetil-CoA se povezuju u acetoacetil-koenzim A (acetoacetil-CoA), potom se adira treća molekuka acetil-CoA pri čemu nastaje ester *β*-hidroksi-*β*-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Dalje slijedi konverzija HMG-CoA u (3*R*)-mevalonsku kiselinu preko semiacetala mevaldinske kiseline gdje dolazi do redukcije aldehidne skupine u alkoholnu.[20]



Slika 13. Biosinteza mevalonske kiseline (MVA)[21]

Mevalonska kiselina se potom prevodi u fosfoliriranu izoprensku jedinicu preko difosfata mevalonske kiseline u što su uključena dva različita ATP ovisna enzima, nakon čega slijedi dekarboksilacija/dehidratacija koja daje IPP. U konačnici, IPP izomerizira u dimetilalil-pirofosfat (DMAPP) pomoću enzima izomeraze (slika 14).[20]



Slika 14. Biosinteza 3-IPP i DMAPP[20]

1.6. Agrumi (lat. *Citrus*)

Agrumi su rod unutar porodice Rutaceae koji potječe iz tropske i suptropske jugoistočne Azije. Porodica Rutaceae, porodica citrusa ili ruta, smještena je u red sapindoliki (lat. *Sapindales*). Sapindolike su red cvjetnica dvosupnica koji broji 9 porodica, 460 rodova i 5700 vrsta. Biljke iz roda agruma uglavnom imaju cvjetove s 5 bijelih latica, brojnim prašnicima i odlikuje ih vrlo jak miris. Ekonomski najvažniji je rod agruma (*Citrus*) gdje spdaju naranča, limun, grejp i limeta. Plodovi roda agruma imaju intenzivan miris zbog terpena, flavonoida i limonoida, te sadrže limunsku kiselinu i velike količine vitamina C.[22]

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

Gorka naranča (slika 15) je voće koje je nastalo križanjem grejpfruta (*Citrus maxima*) i mandarine (*Citrus reticulata*). Područje uzgoja gorke naranče je Mediteran, a kod nas ju nalazimo u području južnog primorja (Dubrovnika, Korčule, Mljeta, Hvara, Visa). Gorka naranča sadrži ljekovite tvari (eterično ulje i gorke tvari) zbog čega pripada skupini aromatično gorkih ljekovitih biljka. Postoje tri vrste eteričnog ulja koje se proizvode iz gorke naranče; eterično ulje cvijeta (neroli), lista i usploda. Poznato je da pojedini sastojci eteričnog ulja gorke naranče imaju biološku aktivnost; antiparazitsku, antifugalnu, antiinflamatornu i antimikrobnu.[22]



Slika 15. Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.)[22]

1.6.2. Limun (*Citrus limon*)

Limun je zimzeleno stablo iz porodice rutvica (Rutaceae). Potječe iz područja jugoistočne Azije te se pretpostavlja da je plod nastao križanjem pomela (*Citrus grandis*) i citrone (*Citrus medica*). Osjetljiv je na niske temperature pa se kod nas većinom uzgaja u Dalmaciji. Limun (slika 16) se koristi kao namirnica i kao lijek. Sadrži velike količine vitamina C koji djeluje kao antioksidans. U kori limuna nalazimo pektin koji se koristi u pripravljanju marmelda, dok sok limuna djeluje antiseptično. Tiještenjem kore limuna dobiva se eterično ulje koje se koristi u ljekovite svrhe (poboljšanje rada jetre i žući), za dezinfekciju prostora te kao antiseptik.[23,24]



Slika 16. Limun (*Citrus limon*)[25]

1.7. Ljekovito i aromatično bilje

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije: „*Ljekovito bilje* je vrsta bilja čiji jedan ili više biljnih dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može koristiti u terapijske svrhe ili kemijsko - farmaceutske sinteze.“ Prema istom izvoru: „*Aromatično bilje* je vrsta bilja koje sadrži jednu ili više aktivnih tvari posebnog mirisa ili okusa, koje se koriste za prozvodnju mirisa, kozmetičkih proizvoda, napitaka, aroma za živežne namirnice.“[26]

U farmaceutskoj industriji je oko 50 % aktivnih tvari biljnog podrijetla pa je potražnja za prirodnim sirovinama veća. Ljekovito bilje može biti jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje, drvenasto ili grmoliko. Broj biljnih vrsta ljekovitog bilja neprestano se mijenja. Smatra se da se ljekovito i aromatično bilje u Hrvatskoj uzgaja na negdje oko 2000–2500 ha, od čega oko 90% otpada na kamilicu.[26]

1.7.1. Origano (*Origanum vulgare* L.)

Origano (mravinac) je višegodišnja biljka koja se koristi kao začin i lijek. Spada u porodicu usnača (Lamiaceae). Eterično ulje origana upotrebljava se kao mirisna komponenta i aktivna tvar u kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima, kao sastojak prehrambenih aroma i u aromaterapiji. Djelovanje eteričnog ulja je analgetičko, antireumatično, antivirusno, baktericidno, fungicidno karminativno, ekspektorirajuće i rubefacijentno. Koristi se kod liječenja tegoba probavnog i dišnog sustava, reumatskih tegoba, virusnih infekcija te za jačanje imunosustava. Neke od komponenti eteričnog ulja mravinca su timol, karvakrol, γ-terpinen, *p*-cymene, kariofilen, borneol.[26,27]



Slika 17. Origano (*Origanum vulgare* L.)[28]

1.7.2. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ružmarin (slika 18) je grmolika, zimzelena biljka mediteranskog podneblja koja spada u porodicu usnača (Lamiaceae). Aromatična je biljka koja raste na tlu bogatom kalcijem. Destilacijom listova ružmarina dobiva se eterično ulje koje se koristi kao mirisna komponenta u kozmetičkim proizvodima, kao sastojak prehrambenih aroma, i u aromaterapiji. Djelovanje eteričnog ulja je analgetično, mukolitično, stimulirajuće i hipertenzorno. Koristi se kod liječenja reumatskih bolova i grčeva, kod spinalnog artritisa i zubobolje, te kao pomoć kod neuromuskulatornih tegoba. Najzastupljeniji spojevi u ružmarinu su flavonoidi (genkvanin, cirsimaritin i homoplantaginin), fenolne kiseline (ružmarinska, klorogenska i kafeinska kiselina) i fenolni diterpeni (karnosol, karnosolna kiselina i rozmanol), od kojih karnosolna kiselina, karnosol i ružmarinska kiselina pokazuju značajna antioksidacijska svojstva.[26,27]



Slika 18. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)[29]

1.8. Metode izolacije hlapljivih spojeva

1.8.1. Destilacija

Destilacija je metoda kod koje se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a para se hlađenjem ukapljuje (kondenzira). Time se želi postići: razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta, identifikacija tekućih tvari, čišćenje tekućih tvari te otparavanje organskih otapala.[30]

Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se tri vrste hidrodestilacije:

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

Vrste hidrodestilacije temelje se na istim teorijskim principima, a razlikuju se u međusobnom kontaktu između biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare. Organske tvari koje nisu topljive u vodi isparavaju zajedno s vodenom parom na temperaturi nižoj od njihova vrelišta. To najbolje opisuje *Daltonov zakon parcijalnih tlakova*: „Tlak para iznad heterogene smjese jednak je zbroju parcijalnih tlakova pojedinih komponenti za datu temperaturu, bez obzira na sastav smjese.“[31]

1.8.1.1. Vodena destilacija

Vodena destilacija se najčešće koristi za izolaciju eteričnih ulja iz aromatičnog bilja, a karakterizira je direktan kontakt biljnog materijala i vode. Usitnjeni biljni materijal se postavlja u tikvicu s vodom koja se zagrijava do vrenja (najčešće na atmosferskom tlaku). Standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura prema Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji, aparatura prema Clevengeru te razne modifikacije navedenih aparatura.

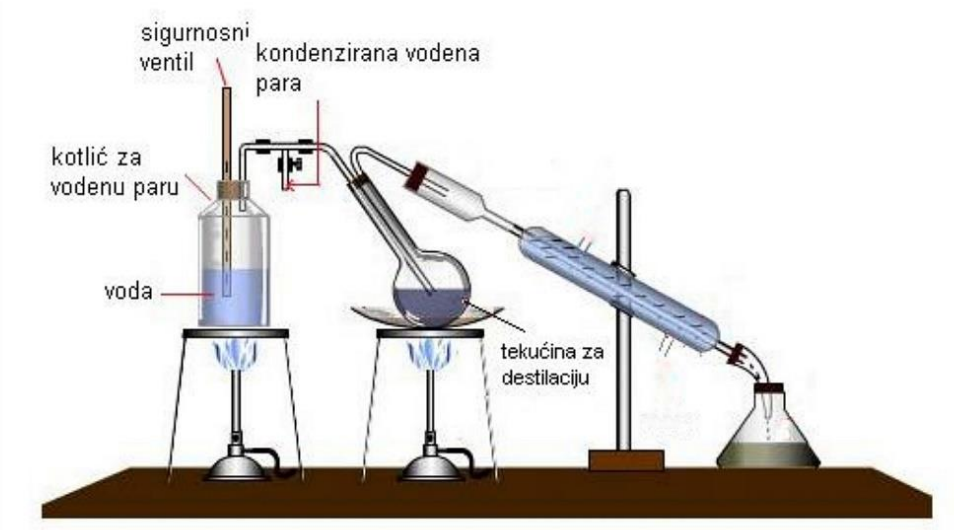
1.8.1.2. Vodeno–parna destilacija

Kod vodeno-parne destilacije biljni materijal je u kontaktu samo sa parom, a ne sa kipućom vodom. Biljni materijal je postavljen na perforiranoj podlozi na određenoj udaljenosti od dna kotla koji je ispunjen vodom (biljni materijal se nalazi neposredno iznad vode). Voda se grije kao i kod vodene destilacije. Zasićena, vlažna para niskog tlaka podiže se kroz biljni materijal i odnosi hlapljive spojeva ka vrhu kotla te u kondenzator. Ova metoda se pretežito koristi u industriji, a rjeđe u laboratoriju te je prikladna za izolaciju manje osjetljivih eteričnih ulja.

1.8.1.3. Destilacija vodenom parom

Destilacija vodenom parom ili parna destilacija koristi se za izolaciju određenih tvari iz smjese te za čišćenje organskih tvari koje imaju visoko vrelište. Osim toga, pogodna je za izolaciju eteričnih ulja ili za izolaciju hlapljivih tvari prisutnih u niskoj koncentraciji u smjesi nehlapljivih spojeva.

Za razliku od jednostavne destilacije, laboratorijska aparatura za destilaciju vodenom parom (slika 19) sadrži nastavak sa dva otvora umjesto račve na tikvici, od kojih je jedan služi za dovod vodene pare iz kotlića, a drugi za odvod para u hladilo. Vodena para se proizvodi u metalnom kotliću u koji je umetnuta staklena cijev koja služi za izjednačavanje tlaka u sustavu. Kotlić za razvijanje vodene pare puni se destiliranom vodom. Voda u kotliću se zagrijava te se dovod pare priključuje na aparaturu tek kada para počne izlaziti iz kotlića. Uvođenjem vodene pare iz kotlića, dolazi do isparavanja tvari i vode. Pare se kondenziraju u vodenom hladilu te skupljaju u predlošku. Prekidanjem dovoda pare u tikvicu destilacija se zaustavlja.[30]



Slika 19. Aparatura za destilaciju vodenom parom[32]

1.8.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja se koristi za izolaciju i pročišćavanje tvari iz otopine, emulzije, suspenzije ili krute smjese uz pomoć drugog otapala koji se s tom otopinom ne miješa. Postoje dvije osnovne vrste ekstrakcije:

- esktrakcija tekuće-tekuće:
  - diskontinuirana, koju još nazivamo i izmućkivanje, izvodi se u lijevku za odjeljivanje,
  - kontinuirana, izvodi se 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 u aparaturi po Soxhletu.

Bez obzira radi li se o ekstrakciji iz tekuće ili krute faze, organsko otapalo koje se koristi pri ekstrakciji trebalo bi zadovoljiti sljedeće uvjete:

- ne smije imati previsoko vrelište zbog lakšeg uklanjanja nakon ekstrakcije,
- mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima,
- topljivost tvari koju ekstrahiramo u otapalu mora biti velika,
- mora biti jeftino, što manje zapaljivo i otrovno,
- otapalo i otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar moraju se što više razlikovati u gustoći.

Dietil-eter, kloroform, petroleter i diklormetan su najučestalija otapala koja se koriste za ekstrakciju.

Teorijski, ekstrakcija se temelji na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa koje prate tvar, u dva otapala koja se ne miješaju, što najbolje opisuje Nernstov zakonon razdjeljenja:

$$K = c_1 / c_2 \qquad (1)$$

gdje je K je koeficijent razdjeljenja,

c_1, c_2 su ravnotežne koncentracije (množinske ili masene) tvari u dva otapala.

Učinak ekstrakcije je bolji ako se postupak ponovi više puta, odnosno ako se ekstrakcija provede više puta s manjom količinom otapala nego jedanput s većom.[30]

1.8.3. Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike, za razliku od ekstrakcije i destilacije, omogućuju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkondicioniranja aromatičnih spojeva. Najčešće sorpcijske tehnike su mikroestrakcija vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću koje se temelje na razdiobi organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma.[31]

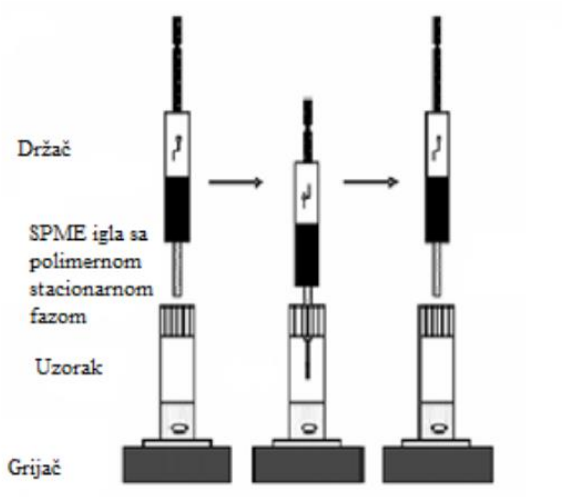
1.8.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) je sorpcijska tehnika koja se većinom upotrebljava za izolaciju aromatičnih spojeva. Omogućuje uzorkovanje, ekstrakciju i koncentriranje u jednom koraku bez upotrebe otapala. Tehnika je koja za sakupljanje hlapljivih spojeva iz uzorka koristi silikonsko vlakno (1 ili 2 cm dugo) prekriveno polimernim filmom. Na tržištu postoji široki raspon vlakana od nepolarnih, miješanih do polarnih. Tip vlakna koji se koristi utječe na selektivnost ekstrakcije: polarna vlakna koriste se za polarne spojeve, a nepolarna za nepolarne spojeve.[31]

Udio ekstrahiranih spojeva, osim o polarnosti i debljini filma, ovisi i o vremenu ekstrakcije te o udjelu hlapljivih spojeva u uzorku. Hlapljivi spojevi se ekstrahiraju brže nego djelomično hlapljivi spojevi jer su nalaze u većoj koncentraciji u prostoru iznad uzorka, što rezultira bržim prijenosom mase.[33]

Na SPME držač (slika 20) za uzrokovanje i desorpciju postavljena je igla unutar koje se nalazi vlakno. Uzorak se stavlja u SPME posudicu (vialicu) te zatvara septom i zagrijava. Tijekom zagrijavanja u prostoru iznad uzorka sakupljaju se hlapljivi spojevi, tzv. vršne pare. Potom se vlakno, koje je u sastavu igle, uvodi u prostor iznad uzorka i na vlakno se adsorbiraju hlapljivi spojevi, odnosno vršne pare. Potom se vlakno uvlači, a vršne pare se

desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa. SPME vlakno se rekondicionira zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa.[31]



Slika 20. Uređaj za HS-SPME[33]

Prednosti HS-SPME metode:

- ne koristi otapalo,
- laka i brza uporaba,
- dobra tehnika za identifikaciju nepoželjnih mirisa ili brzu usporedbu uzoraka.

Nedostaci HS-SPME metode:

- neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve,
- aromatični profil sakupljenih isparljivih spojeva ovisan je o debljini, vrsti i dužini vlakna te temperaturi i vremenu uzrokovanja.[31]

1.9. Analiza hlapljivih spojeva

Najčešće korištena tehnika za odjeljivanje hlapljivih spojeva je plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC). Uređaj za plinsku kromatografiju, plinski

kromatograf, se sastoji od: injekcijskog bloka, kromatografske kolone sa stacionarnom fazom koja se nalazi u termostatiranom prostoru, detektora, pojačala i računala.

Uzorci za GC analizu moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Inertni plin ili plin nositelj (He, N_2, Ne), predstavlja mobilnu fazu te ne utječe na proces odjeljivanja sastojaka smjese, dok je stacionarna faza većinom tekućina nanesena na kruti adsorbens (punjena kolona) ili vezana za stijenke kapilare (kapilarne kolone).

Detektor je uređaj koji se koristi u plinskoj kromatografiji za registraciju sastojaka smjese eluiranih s kromatografske kolone. GC detektori mogu biti:

- plamenoionizacijski detektor,
- detektor toplinske vodljivosti,
- plamenofotometrijski detektor,
- fotoionizacijski detektor,
- detektor apsorpcije elektrona,
- spektrometar masa.

Spektormetar masa je detektor koji pruža najveći broj podataka koji su potrebni za identifikaciju i određivanje strukture složenih organskih spojeva. Spektrometrija masa je analitička metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a pritom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi, točnije prema omjeru mase i naboja. To je metoda strukturne analize, tj. metoda identifikacije ispitivane tvari jer je spektar masa karakterističan za pojedinu tvar. Prednost spektrometrije masa je njena visoka osjetljivost i točnost.[30]

1.9.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

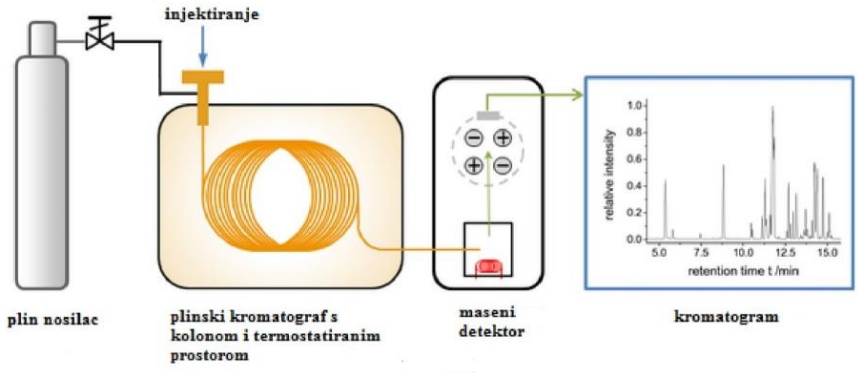
Plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GS-MS) koristi se za analizu smjesa hlapljivih spojeva, odnosno njihova razdvajanje i strukturnu analizu, uz korištenje minimalne količine uzorka.

Povezivanjem plinske kromatografije s masenom spektrometrijom formirana je jedna od najpouzdanijih instrumentalnih metoda. Ove dvije metode idealne su za povezivanje jer se vrlo dobro nadopunjuju. Dok je plinska kromatografija uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju sastojaka smjese, spektromerija masa je pogodna za kvalitativnu analizu

gdje je plinska kromatografija nepouzdana. Obje tehnike mogu postići visoku osjetljivost te se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost u redu pikogramskih i femtografskih količina hlapljivih i poluhlapljivih sastojaka smjese i to realtivno velikom brzinom.[34]

Osnovne komponente GC-MS uređaja (slika 21) su:

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



Slika 21. Shematski prikaz plinskog kromatografa s masenim detektorom (GC-MS)[35]

Princip rada GC-MS uređaja je: uzorak se injektira u injektor kromatografa gdje se prevodi u plinovito stanje, nošen plinom nositeljem ulazi u kromatografsku kolonu gdje dolazi do odjeljivanja sastojaka smjese. Nakon eluacije, odijeljeni sastojci nošeni plinom nositeljem odlaze u maseni detektor (spektrometar masa). Identifikacija nepoznatog spoja provodi se usporedbom masenog spektra tog spoja s masenim spektrom iz datoteke spektara poznatih tvari, tako da se nađe identičan maseni spektar.[35]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

U radu su korištene četiri vrste aromatiziranog maslinovog ulja:

- maslinovo ulje aromtizirano limunom,
- maslinovo ulje aromatizirano gorkom narančom,
- maslinovo ulje aromatizirano ružmarinom,
- maslinovo ulje aromatizrano origanom,

te čisto maslinovo ulje. Uzorci navedenih ulja proizvedeni su u uljari Anzulović na otoku Hvaru.

2.2. Kemikalije i aparatura

Kemikalije korištene u radu:

- dietil-eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatksa,
- natrijev klorid, Fluka Chemie, p.a.,

Aparatura korištena u radu:

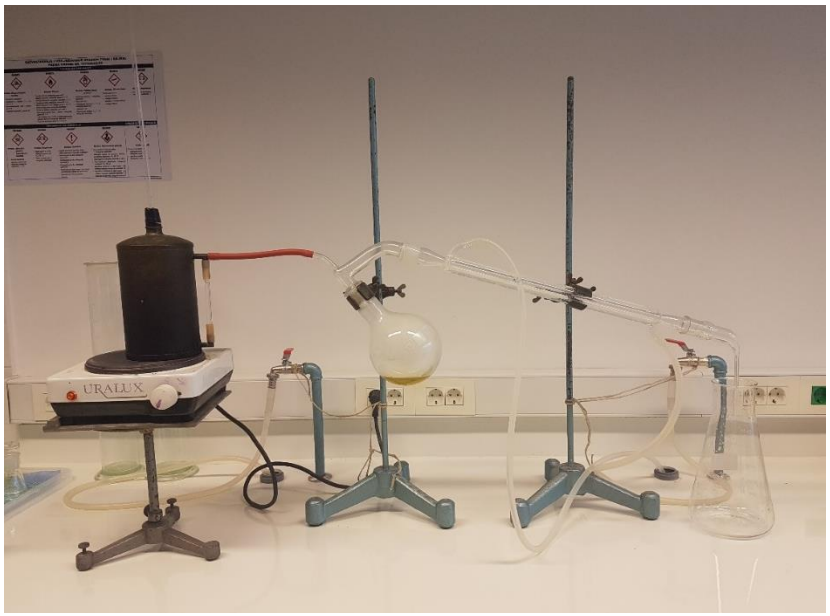
- tehnička vaga Kern model 572, Njemačka,
- aparatura za destilaciju vodenom parom koja se sastoji od: generatora (kotlića) vodene pare, nastavka za destilaciju vodenom parom, tikvice s okruglim dnom i dugim grlom i Liebigovog hladila,
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknima :
  -polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB), Supleco Co., SAD,
  -divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), Supleco Co., SAD,
- magnetska miješalica, model MR Hei-Standard s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001, Heidolph, Njemačka,
- vezani sustav plinska kromatografija–spektrometrija masa, Agilent Technologies SAD: plinski kromatograf model 7820A i spektrometar masa model 5977E.

2.3. Izolacija hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi iz maslinovog ulja i aromatiziranih maslinovih ulja izolirani su metodama destilacije vodenom parom i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Parnom destilacijom dobiven je destilat u kojem su sadržani hlapljivi spojevi, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiveni su uzorci hlapljivih spojeva koji se nazivaju vršnim parama.

2.3.1. Destilacija vodenom parom

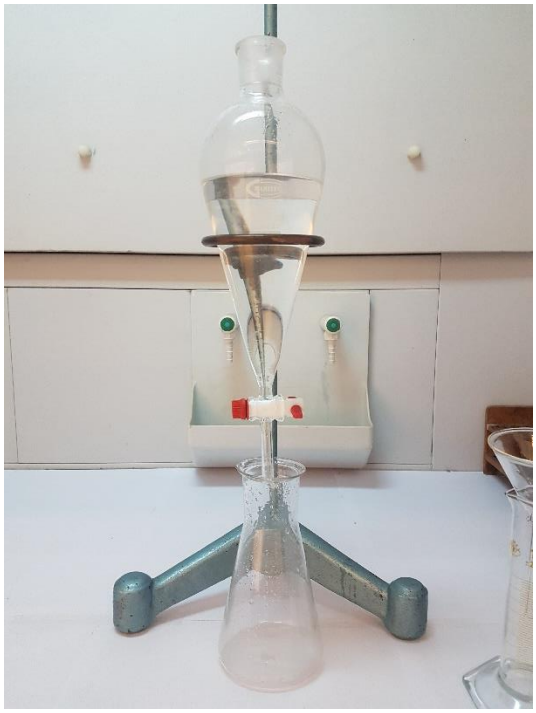
Izolacija hlapljivih spojeva iz maslinovog ulja aromatiziranog limunom izvedena je pomoću destilacije vodenom parom (slika 22).



Slika 22. Destilacija vodenom parom

U tikvicu s okruglim dnom (1000 mL) stavljeno je 60,02 g uzorka aromatiziranog maslinovog ulja, uz dodatak male količine destilirane vode. Na nastavak za destilaciju vodenom parom koja ima dva otvora spojeno je hladilo i kotlić za razvijanje vodene pare. Nakon sastavljanja aparature uspostavljen je odgovarajući protok vode. Vodena para se proizvodila u metalnom kotliću (generatoru vodene pare) u koji je umetnuta staklena cijev koja služi za izjednačavanje tlaka u sustavu. Kotlić za razvijanje vodene pare punio se destiliranom vodom. Voda u kotliću se zagrijavala te se dovod pare priključio na aparaturu tek kada je para počela izlaziti iz kotlića. Uvođenjem vodene pare iz kotlića, započelo je isparavanje hlapljivih tvari i vode. Pare su se kondenzirale u vodenom hladilu te skupljale u predlošku (Erlenmeyerovoj tikvici) koji je bio uronjen u otopinu leda i vode.

Prekidanjem dovoda pare u tikvicu destilacija je zaustavljena. Hidrodestilacija se odvijala kontinuirano četiri sata. Nakon destilacije, slijedila je ekstrakcija (slika 23) destilata s čistim dietil-eterom u lijevku za odjeljivanje. Po završetku ekstrakcije, otapalo je otpareno destilacijom pri atmosferskom tlaku i preko vodene kupelji te je uzorak čuvan u hermetički zatvorenoj bočici u hladnjaku pri temperaturi od -20 °C do GC-MS analize.



Slika 23. Lijevak za odjeljivanje

2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi

U staklenu bočicu, tzv. vialicu, od 15 mL stavljeno je 2,5 mL aromatiziranog maslinovog ulja i 1 g NaCl. Vialica je hermetički zatvorena teflonskom PTFE/silikon septom te postavljena u vodenu kupelj (40 ^{o}C), a sadržaj u njoj je miješan pomoću magnetske miješalice. Na slici 24 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).



Slika 24. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

Za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi korišena su dva vlakna (slika 25):

- plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD),
- sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD).



Slika 25. Vlakna s ovojnicama DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno)

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 min na 250 ^{o}C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa, dok je sivo vlakno kondicionirano na isti način 60 min na 270 ^{o}C. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno je izvučeno te je provedena ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min, uz konstantnu brzinu miješanja uzorka (1000 o/min). Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz vialice i odmah postavljeno u GC-MS injektor. Toplinska desorpcija (250 °C) ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu trajala je 7 minuta.

2.4. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7820A, u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977E, spojenim na računalo (slika 26).



Slika 26. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Analize su izvršene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies (5% difenil-95% dimetilpolisilksan, 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm). Plin nositelj je helij protoka 1 mL/min, omjer cijepanja 50:1, temperatura injektora iznosila je 250 °C, temperatura detektora 280 °C, energija

ionizacije 70 eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C brzinom od 3 °C min^{-1} te zadržavanje 2 min pri 200 °C.

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

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

Pojedinačni pikovi na kromatogramu su identificirani usporedbom retencijskih vremena s onima iz literature i dostupnim standardima, kao i usporedbom njihovih spektara masa sa spektrima masa iz Wiley9 (Wiley MS libraries) i NIST17 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) baza podataka. 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 maslinovog ulja te maslinovih ulja aromatiziranih limunom, narančom, mravincem i origanom provedena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Korištena su dva vlakna presvučena sorpcijskim materijalom različite polarnosti, DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno). Hlapljivi spojevi maslinovog ulja aromatiziranog limunom izolirani su i destilacijom vodenom parom (parnom destilacijom). Na taj način dobiveno je deset uzoraka vršnih para i jedan destilat. Svi uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 4 - 9. Spojevi u tablicama poredani su prema redoslijedu eluiranja (vremenu zadržavanja) sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (izražen u %) predstavlja udio površine pika tog spoja 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] – spoj identificiran samo na temelju masenog spektra, odnosno usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i NIST17 biblioteka masenih spektara.

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama maslinovog ulja

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) sivo vlakno	Udio (%) plavo vlakno
1.	pentan-2-on[a]	1,9	4,3	2,9
2.	heksanal	2,7	3,6	2,2

3.	(*E*)-heks-2-enal*	3,3	26,8	10,0
4.	(*Z*)-heks-3-en-1-ol*	3,4	/	2,9
5.	heksan-1-ol	3,6	20,5	16,8
6.	4-metilhepta-1,5-dien[a,]*	6,4	/	2,1
7.	*p*-cimen	7,3	2,0	1,3
8.	limonen	7,4	6,3	4,2
9.	(E)-β-ocimen*	7,9	12,0	9,4
10.	γ-terpinen	8,4	/	1,5
11.	nonanal	9,9	4,4	3,0
12.	4,8-dimetilnona-1,3,7-trien[a]	10,4	4,8	3,3
13.	2,4-diizocijanatotoluen[a]	20,3	/	30,5
14.	α-kopaen	20,9	3,5	1,5
	Identificirano		88,2	91,6

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog limunom

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) sivo vlakno	plavo vlakno
1.	(*E*)-heks-2-enal*	3,4	0,7	0,2
2.	heksan-1-ol	3,6	0,7	0,3
3.	α-tujen	4,7	0,2	0,3
4.	α-pinen	4,9	0,9	1,2
5.	sabinen	5,8	0,5	1,2
6.	β-pinen	5,9	3,2	5,1
7.	6-metilhept-5-en-2-on[a]	6,1	0,2	0,2
8.	mircen	6,2	2,6	3,0
9.	oktanal	6,6	0,2	/
10.	α-terpinen	7,0	0,3	0,1

11.	*p*-cimen	7,3	2,1	1,9
12.	limonen	7,4	80,5	76,4
13.	(E)-β-ocimen*	7,9	0,4	0,5
14.	γ-terpinen	8,4	3,7	4,5
15.	α-terpinolen	9,4	0,4	0,3
16.	linalol	9,8	/	0,9
17.	α-terpineol	13,4	/	0,3
18.	neral	15,4	0,5	0,7
19.	linalil-acetat	16,0	/	0,9
20.	geranial	16,6	1,0	1,1
	Identificirano		98,1	99,1

Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u destilatu maslinovog ulja aromatiziranog limunom

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)
1.	hept-2-enal*	5,3	0,5
2.	benzaldehid	5,5	0,2
3.	β-pinen	5,9	0,6
4.	6-metilhept-5-en-2-on[a]	6,1	0,3
5.	mircen	6,2	0,3
6.	hepta-2,4-dienal*	6,4	0,5
7.	oktanal	6,6	0,3
8.	*p*-cimen	7,3	0,7
9.	limonen	7,4	9,4
10.	γ-terpinen	8,4	1,0

11.	linalol	9,8	4,3
12.	nonanal	9,9	1,0
13.	*trans*-limonen oksid*	11,2	0,4
14.	terpinen-4-ol	12,8	1,7
15.	α-terpineol	13,4	4,0
16.	dekanal	13,9	0,6
17.	nerol	14,9	3,6
18.	neral	15,4	4,4
19.	geraniol	16,1	4,9
20.	(*E*)-dec-2-enal*	16,3	2,8
21.	geranial	16,6	9,1
22.	deka-2,4-dienal*	17,6	4,1
23.	benzen-1,4-diol[a,]*	18,1	1,1
24.	deka-2,4-dienal*	18,6	6,5
25.	neril-acetat	20,5	3,1
26.	geranil-acetat	21,3	2,0
27.	*trans*-kariofilen	22,8	0,4
28.	*trans*-α-bergamoten	23,4	0,5
29.	β-bisabolen	26,4	2,3
30.	nerolidol	28,6	0,9
31.	izopropil-laurat	30,9	0,7
32.	diizobutil-ftalat[a]	39,4	1,4
33.	metil-palmitat	41,3	1,5
34.	dibutil-ftalat	42,5	3,6
35.	etil-palmitat	43,6	4,9
36.	metil-linoleat	46,6	0,4
37.	metil-oleat	46,9	2,0
38.	etil-linoleat	49,2	1,1
39.	etil-oleat	49,5	6,0
40.	trikosan	56,4	0,8
	Identificirano		93,9

Tablica 7. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog gorkom narančom

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) sivo vlakno	plavo vlakno
1.	(*E*)-heks-2-enal*	3,4	0,7	0,2
2.	heksan-1-ol	3,6	0,6	0,2
3.	α-tujen	4,7	/	0,1
4.	α-pinen	4,9	0,7	0,9
5.	sabinen	5,8	0,3	0,6
6.	β-pinen	5,9	1,6	2,7
7.	mircen	6,2	2,8	3,1
9.	oktanal	6,6	0,3	0,2
10.	*p*-cimen	7,3	1,0	0,9
11.	limonen	7,4	84,5	83,9
12.	(E)-β-ocimen*	7,9	0,5	0,5
13.	γ-terpinen	8,4	2,2	2,7
14.	α-terpinolen	9,4	0,4	/
16.	linalol	9,8	1,0	1,2
17.	nonanal	9,9	/	0,2
18.	dekanal	13,9	/	0,2
18.	neral	15,4	/	0,3
19.	linalil-acetat	16,0	0,6	1,2
20.	geranial	16,6	0,5	0,5
	Identificirano		97,7	99,6

Tablica 8. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog mravincem (origanom)

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) sivo vlakno	plavo vlakno
1.	(*E*)-heks-2-enal*	3,4	2,7	0,8
2.	α-tujen	4,7	0,6	1,2
3.	α-pinen	4,9	0,5	1,0
4.	sabinen	5,8	/	0,4
5.	β-pinen	5,9	1,4	2,3
6.	mircen	6,2	3,0	4,1
7.	felandren	6,6	/	0,3
8.	α-terpinen	7,0	1,1	1,5
9.	*p*-cimen	7,3	15,4	20,0
10.	limonen	7,4	29,3	39,7
11.	(E)-β-ocimen*	7,9	/	0,3
12.	γ-terpinen	8,4	8,1	13,2
13.	*trans*-sabinen hidrat*	8,6	/	1,4
14.	terpinen-4-ol	12,8	0,6	0,3
15.	timokinon[a,]*	15,8	0,5	0,4
16.	timol	17,8	28,2	11,6
17.	karvakrol	18,2	1,6	tr.
	Identificirano		93,0	98,5

Tablica 9. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) sivo vlakno	plavo vlakno
1.	(*E*)-heks-2-enal*	3,4	3,1	1,0
2.	(*E*)-heks-2-en-1-ol*	3,6	4,3	1,7
3.	α-tujen	4,7	0,4	0,8
4.	α-pinen	4,9	3,5	6,5
5.	Kamfen	5,3	1,5	2,7
6.	sabinen	5,8	/	0,3
7.	β-pinen	5,9	1,6	2,8
8.	oktan-3-on	6,1	1,1	0,7
9.	mircen	6,2	3,6	4,5
10.	α-terpinen	7,0	0,5	0,5
11.	*p*-cimen	7,3	13,8	14,0
12.	limonen	7,4	20,2	23,0
13.	1,8-cineol	7,5	11,2	15,6
14.	(E)-β-ocimen*	7,9	/	0,5
15.	γ-terpinen	8,4	6,1	7,9
16.	*trans*-sabinen hidrat*	8,6	/	0,6
17.	linalol	9,8	/	0,7
18.	kamfor	11,5	6,4	7,3
19.	borneol	12,4	2,0	2,6
20.	terpinen-4-ol	12,8	0,8	0,5
21.	β-fenhol[a]	13,4	1,3	0,8
22.	bornil-acetat[a]	17,2	1,7	1,3
23.	timol	17,8	10,9	2,4
24.	*trans*-kariofilen	22,8	0,8	/
	Identificirano		94,8	98,7

4. RASPRAVA

Maslina (*Olea euroapea* L.) je jedna od najpoznatijih biljaka mediteranskog podneblja te se smatra najstarijom kultiviranom biljnom vrstom. Iz ploda masline dobiva se maslinovo ulje. U današnje vrijeme sve je više znanstvenih istraživanja i spoznaja o maslinovom ulju te njegovom utjecaju na zdravlje. Osim ljekovitih svojstava, kao što su utjecaj na probavni i krvožilni sustav, maslinovo ulje se koristi u kozmetičke svrhe i održavanje ljepote. U zadnje vrijeme aromatizirano maslinovo ulje dobiva sve veću pažnju u industriji maslinovog ulja gdje je glavni cilj aromatizacije proizvesti alternativne okuse za potrošače. Aromatizirana maslinova ulja predstavljaju novi koncept za poboljšanje okusa, senzornih karakteristika i roka trajanja ulja kao i zadovoljavanje potrošačkih težnji. Hlapljivi spojevi koji se nalaze u biljnom materijalu s kojim se aromatizira maslinovo ulje, kao što su ružmarin, bosiljak, timjan te mnogi drugi, poznati su zbog svoje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, hranjivih svojstava te komercijalne koristi.

Cilj ovog rada bio je odrediti profil hlapljivih spojeva maslinovog ulja i maslinovih ulja aromatiziranih s limunom, gorkom narančom, origanom (mravinac) i ružmarinom. Korištene su dvije metode izolacije hlapljivih spojeva, destilacija s vodenom parom i mikoroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Parnom destilacijom dobiven je destilat u kojem su sadržani hlapljivi spojevi maslinovog ulja aromatiziranog limunom, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) dobivene su vršne pare maslinovog ulja i maslinovih ulja aromatiziranih s limunom, gorkom narančom, origanom (mravinac) te ružmarinom. Na taj način dobiveno je deset uzoraka vršnih para i jedan destilat. Svi uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS, a rezultati analiza su prikazani u tablicama 4 - 9.

4.1. Hlapljivi spojevi vršnih para

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama maslinovog ulja i aromatiziranih maslinovih ulja dan je u tablicama 4 i 5 i 7 - 9.

U vršnim parama čistog maslinovog ulja izoliranim korištenjem plavog vlakna identificirano je 14 spojeva, što predstavlja 91,6 % od ukupnih hlapljivih spojeva (tablica 4). Glavni sastojak u ovom uzorku vršnih para je 2,4-diizocijanatotoluen (30,5 %). Ostali kvantitativno značajni sastojci su alifatski alkohol heksan-1-ol (16,8 %) i alifatski aldehid (*E*)-heks-2-enal (10 %) te monoterpen (E)-β-ocimen (9,4 %). Od terpenskih spojeva u uzorku su identificirani monoterpenski ugljikovodici limonen (4,2 %), γ-terpinen (1,5 %) i *p*-cimen (1,3 %) te seskviterpenski ugljikovodik α-kopaen (1,5 %). U vršnim parama su identificirana i dva alifatska nezasićena ugljikovodika 4,8-dimetilnona-1,3,7-trien (3,3 %) i 4-metilhepta-1,5-dien (2,1 %) te alkohol (*Z*)-heks-3-en-1-ol (2,9 %) i keton pentan-2-on (2,9 %). Od alifatskih aldehida u vršnim parama identificirani su nonanal (3,0 %) i heksanal (2,2 %).

Korištenjem sivog vlakna u vršnim parama maslinovog ulja identificirano je 10 spojeva, odnosno 88,2 % od ukupnog uzorka hlapljivih spojeva (tablica 4). U ovom uzorku vršnih para dominiraju alifatski aldehid (*E*)-heks-2-enal (26,8 %) i alkohol heksan-1-ol (20,5 %), a slijedi monoterpenski ugljikovodici (E)-β-ocimen (12,0 %) i limonen (6,3 %). U vršnim parama dobivenim korištenjem sivog vlakna nije identificiran 2,4-diizocijanatotoluen, glavni spoj u vršnim parama maslinovog ulja dobivenim korištenjem plavog vlakna. Jedini seskviterpen identificiran u ovom uzorku vršnih para je α-kopaen (3,5 %). Kao i kod korištenja plavog vlakna, u vršnim parama maslinovog ulja (sivo vlakno) identificirana su dva alifatska aldehida, heksanal (3,6 %) i nonanal (4,4 %) i keton pentan-2-on (4,3 %) te nezasićeni alifatski ugljikovodik 4,8-dimetilnona-1,3,7-trien (4,8 %) što predstavlja veći udio navedenih spojeva od onih analiziranim koristeći plavo vlakno.

Alifatski alkohol heksan-1-ol i aldehid (*E*)-heks-2-enal, glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja, spadaju u skupinu tzv. "zelenih“ hlapljivih spojeva. Osim navednih spojeve „zelene“ hlapljive spojeve ili „zelene note“ čine i sljedeći C_6 spojevi: heksanal, (*E*)- i (*Z*)-heks-3-en-1-ol, (*E*)-heks-2-en-1-ol te (*Z*)-heks-3-enal. Svi navedeni spojevi u literaturi su poznati kao "lisni" alkoholi i aldehidi koji tvore tzv. "zelenu notu". Većina tih spojeva nastaje u biljci degradacijom masnih kiselina linolne i linolenske pod utjecajem enzima lipoksigenaze, odnosno lipoksigenaznim biosintetskim putem. Vršne pare čistog maslinovog ulja su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične. Značajna razlika je jedino prisustvo 2,4-diizocijanatotoluena u vršnim parama dobivenim

korištenjem sivog vlakna. Međutim, treba naglasiti da je taj spoj identificiran samo na temelju masenog spektra, odnosno usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i NIST17 biblioteka masenih spektara.

U vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog limunom koristeći plavo vlakno identificirano je 19 spojeva, odnosno 99,1 % od ukupnog uzorka hlapljivih spojeva, dok je korištenjem sivog vlakna identificirano 17 spojeva, što predstavlja 98,1 % od ukupnih hlapljivih spojeva u uzorku (tablica 5). Vršne pare maslinovog ulja aromatiziranog limunom su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične. Većina sastojaka su terpeni, a izuzetak su „zeleni" spojevi heksan-1-ol i aldehid (*E*)-heks-2-enal te 6-metilhept-5-en-2-on koji je razgradni produkt terpena. U oba uzorka vršnih para dominira ciklički monoterpenski ugljikovodik limonen bez obzira na upotrijebljeno vlakno. Udio limonena u uzorku dobivenom korištenjem plavog vlakna je 76,4 %, a u uzorku dobivenom korištenjem sivog vlakna je 80,5 %. Od terpenskih spojeva (plavo vlakno) kvantitativno značajni su još β-pinen (5,1 %), γ-terpinen (4,5 %) i mircen (3,0 %), dok su ostali identificirani terpeni prisutni s udjelima manjim od 2,0 %. Udio navednih monoterpenskih ugljikovodika u uzorku dobivenom korištenjem sivog vlakna je nešto manji i iznosi za β-pinen 3,2 %, γ-terpinen 3,7 % i mircen 2,6 %. Stoga, u skladu s očekivanim, vršne pare maslinovog ulja aromatiziranog limunom, karakterizira visoki udio terpena, posebno limonena.

Korištenjem plavog vlakna, u vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog gorkom narančom ukupno je identificirano 19 spojeva, što predstavlja 99,6 % od ukupnih hlapljivih spojeva (tablica 7). Glavni sastojak vršnih para je ciklički monoterpenski ugljikovodik limonen (83,9 %). Ostali kvantitativno važniji monoterpeni u vršnim parama su također ugljikovodici, mircen (3,1 %), β-pinen (2,7 %) i γ-terpinen (2,7 %). Ostali spojevi nalaze se u udjelima manjim od 2 %.

U vršnim parama maslinovog ulja aromtiziranog gorkom narančom, korištenjem sivog vlakna identificirano je 16 spojeva što predstavlja 97,7 % od ukupnih hlapljivih spojeva u vršnim parama. Spojevi koji nisu identificirani korištenjem sivog vlakna, a identificirani su u vršnim parama dobivenim plavim vlaknom su α-tujen, nonanal, dekanal i neral. Također, glavni sastojak u ovom uzorku je limonen (84,5 %). Ostali kvantitativno važni spojevi u vršnim parama (sivo vlakno) su mircen (2,8 %) i γ-terpinen (2,2 %).

Vršne pare maslinovog ulja aromatiziranog gorkom narančom su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične. Većina sastojaka su terpenski ugljikovodici, s limonenom kao dominantnim sastojkom. I u ovim vršnim parama identificirani su „zeleni“ spojevi heksan-1-ol i aldehid (*E*)-heks-2-enal.

Sedamnaest spojeva identificiranih u vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog origanom (mravincem) koristeći plavo vlakno čini 98,5 % od ukupnog uzorka (tablica 8). Glavni sastojci vršnih para su monoterpenski ugljikovodici limonen (39,7 %), *p*-cimen (20 %), γ-terpinen (13,2 %) i monoterpenski fenol timol (11,6 %). Nasuprot tome, korištenjem sivog vlakna identificirano je 13 spojeva, odnosno 93,0 % od ukupnog uzorka hlapljivih spojeva. Spojevi sabinen, felandren, (*E*)-β-ocimen i *trans*-sabinen hidrat nisu identificirani u vršnim parama (sivo vlakno). U vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog origanom korištenjem sivog vlakna kao glavni spojevi identificirani su isti spojevi kao i kod korištenja plavog vlakna no s različitim udjelima: limonen (39,7 %), timol (28,2 %), *p*-cimen (15,4 %) i γ-terpinen (8,1 %).

I za vršne pare maslinovog ulja aromatizirane origanom vrijedi prethodno navedeno, a to je da su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične. Samo jedan identificirani sastojak nije terpen i to (*E*)-heks-2-enal.

U vršnim parama maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom identificirana su 23 spoja (korištenjem plavog vlakna), odnosno 21 spoj (sivo vlakno), što predstavlja 98,7 %, odnosno 94,8 % od ukupnih hlapljivih spojeva (tablica 9). Gotovo svi sastojci vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom su terpeni, a izuzetak su nositelji tzv. zelenih mirisnih nota u maslinovom ulju, alifatski aldehid (*E*)-heks-2-enal (plavo vlakno 1,0 %, sivo vlakno 3,1 %) i alkohol (*E*)-heks-2-en-1-ol (plavo vlakno 1,7 %, sivo vlakno 4,3 %). Glavne komponente vršnih para, bez obzira na upotrijebljeno vlakno, su isti spojevi: ugljikovodik limonen (plavo vlakno 23,0 %, sivo vlakno 20,2%), ciklički monoterpenski eter 1,8-cineol (plavo vlakno 15,6 %, sivo vlakno 11,2 %) i ugljikovodik *p*-cimen (plavo vlakno 14,0 %, sivo vlakno 13,8 %). Od ostalih spojeva kvantitativno značajni su još i monoterpenski ugljikovodici γ-terpinen (plavo vlakno 7,9 %, sivo vlakno 6,1 %), α-pinen (plavo vlakno 6,5 %, sivo vlakno 3,5 %), mircen (plavo vlakno 4,5 %, sivo vlakno 3,6 %) i kamfen (plavo vlakno 2,7 %, sivo vlakno 1,5 %), biciklički terpenski keton kamfor (plavo vlakno 7,3 %, sivo vlakno 6,4 %) te monoterpenski alkohol borneol (plavo vlakno

2,6 %, sivo vlakno 2,0 %). Monoterpenski fenol timol, korištenjem sivog vlakna identificiran je u mnogo većem udjelu (10,9 %) nego korištenjem plavog vlakna, gdje mu je udio 2,4 %. Monoterpenski alkohol linalol identificiran je samo u vršnim parama-plavo vlakno (7,3 %), dok je, također monoterpenski alkohol, terpinen-4-ol identificiran u oba uzorka vršnih para (plavo vlakno 0,5 %, sivo vlakno 0,8 %).

Iz GC-MS analiza vršnih para aromatiziranih maslinovih ulja vidljivo je da su identificirani spojevi koji uglavnom potječu iz biljke (ploda) kojim je određeno maslinovo ulje aromatizirano. Sama metoda izolacije hlapljivih spojeva, mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi, je diskriminirajuća s obzirom na hlapljivost spojeva. Naime ovom metodom se ekstrahiraju spojevi veće hlapljivosti. Nadalje ostali parametri metode, kao što su ograničeni volumen HS-SPME vialice u koji se može smjestiti relativno malo uzorka (2,5 mL), vrijeme i temperatura uzorkovanja, uvjetuju ekstrakciju i analizu samo određenih spojeva. Dobivena analiza potvrđuje glavni nedostatak metode, a to je da broj i udio sastojaka u vršnim parama ne predstavlja i njihov broj i udio u uzorku. Zbog toga je, radi usporedbe, jedan uzorak maslinovog ulja i to ono aromatizirano limunom, podvrgnut destilaciji vodenom parom.

4.2. Hlapljivi spojevi destilata

Destilacijom vodenom parom maslinovog ulja aromatiziranog limunom dobiven je uzorak koji se u daljnjem tekstu naziva destilat. U destilatu je identificirano 40 spojeva, odnosno 93,9 % od ukupnog uzorka (tablica 6). Glavni sastojci destilata su monoterpenski ugljikovodik limonen (9,4 %) i monoterpenski aldehid geranial (9,1 %), spojevi koji su identificirani i u vršnim parama istog ulja. Međutim, limonen je bio dominantan sastojak vršnih para (76,4 %, odnosno 80,5 %). Ono što je uočljivo, čak i na prvi pogled, je razlika u broju identificiranih spojeva, ali i u kemijskom sastavu uzoraka. U destilatu su, osim terpena, identificirani i drugi spojevi koji nisu identificirani u vršnim parama. To su alifatski nezasićeni aldehidi hept-2-enal, hepta-2,4-dienal, (*E*)-dec-2-enal i dva izomera deka-2,4-dienala sa ukupnim udjelom od 14,4 % te esteri masnih kiselina izopropil-laurat, metil-palmitat, etil-palmitat, metil-linoleat, metil-oleat i etil-linoleat s ukupnim udjelom od 16,6 %.

Za potpuniju analizu hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja treba koristiti više metoda njihove izolacije, nikako samo mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi. Destilacija vodenom parom vjerojatno nije najbolji izbor za takvu vrstu analize zbog korištenja topline te nastanka artefakata (npr. hidroliza glicerida maslinovog ulja). Istraživanja treba proširiti na način da se upotrijebe i druge metode izolacije hlapljivih spojeva kao što su npr. kontinuirana ekstrakciju tekuće-tekuće uz korištenje različitih organskih otapala, ultrazvučnim valovima potpomognuta ekstrakcija uz korištenje različitih organskih otapala, mikrovalna ekstrakcija i slično.

5. ZAKLJUČAK

- Cilj rada bio je analizirati hlapljive spojeve u maslinovom ulju i maslinovim uljima aromatiziranim limunom, gorkom narančom, origanom (mravincem) i ružmarinom. Za izolaciju je korištena metoda mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME), a uzorak maslinovog ulja aromatiziranog limunom je podvrgnut destilaciji vodenom parom.
- Glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja su alifatski alkohol heksan-1-ol i aldehid (*E*)-heks-2-enal koji spadaju u skupinu tzv. "zelenih“ hlapljivih spojeva, odnosno spojevi u literaturi poznati kao nositelji tzv. "zelenih nota". Ovi spojevi nastaju degradacijom masnih kiselina, uglavnom linolne i linolenske kiseline, pod utjecajem enzima lipoksigenaze.
- Vršne pare maslinovog ulja aromatiziranog limunom su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične. U oba uzorka vršnih para dominira ciklički monoterpenski ugljikovodik limonen (76,4 %, odnosno 80,5 %) bez obzira na upotrijebljeno vlakno.
- Vršne pare maslinovog ulja aromatiziranog gorkom narančom su kvalitativno i kvantitativno slične, karakterizira ih izrazito visoki udio terpena, posebno limonena (83,9 %, odnosno 84,5 %)..
- I za vršne pare maslinovog ulja aromatizirane origanom vrijedi prethodno navedeno, a to je da su u kvalitativnom i kvantitativnom pogledu slične. Vršne pare su terpenske prirode, sa monoterpenskim ugljikovodicima limonenom (39,7 %), *p*-cimenom (20 %), γ-terpinenom (13,2 %) i monoterpenskim fenolom timolom (11,6 %) kao glavnim sastojcima. Samo jedan identificirani sastojak nije terpen i to (*E*)-heks-2-enal.
- Gotovo svi sastojci vršnih para maslinovog ulja aromatiziranog ružmarinom su terpeni, a izuzetak su nositelji tzv. zelenih mirisnih nota u maslinovom ulju, (*E*)-heks-2-enal i alkohol (*E*)-heks-2-en-1-ol. Glavne komponente vršnih para, bez obzira na upotrijebljeno vlakno, su isti spojevi: ugljikovodik limonen (23,0 %, odnosno 20, 2%), ciklički monoterpenski eter 1,8-cineol (15,6 %, odnosno 11,2 %) i ugljikovodik *p*-cimen (14,0 %, odnosno 13,8 %).
- U destilatu maslinovog ulja aromatiziranog limunom identificirano je više spojeva, a i njihov kemijski sastav je različit u usporedbi s vršnim param. U

destilatu su, osim terpena, identificirani i drugi spojevi koji nisu identificirani u vršnim parama, prvenstveno alifatski nezasićeni te esteri masnih kiselina.

- Za potpuniju analizu hlapljivih spojeva aromatiziranih maslinovih ulja treba koristiti više metoda njihove izolacije, nikako samo mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi. Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi se ekstrahiraju uglavnom spojevi veće hlapljivosti, za izolaciju se koristi mala količina uzorka, a i vrijeme ekstrakcije je kratko. Glavni nedostatak metode je da broj i udio sastojaka u vršnim parama ne predstavlja i njihov broj i udio u uzorku.

6. LITERATURA

1. M. Žanetić, M. Gugić, *Pomologia Croatica* **12** (2016) 159-173.
2. M. Gugić, M. Šarolić, *Maslina i proizvodi*, Ogranak Matice hrvatske u Sinju, Sinj, 2017, str. 15-166.
3. H. Benmoussa, W. Elfalleh, A. Farhat, M. Servilli, M. Algabr, M. Romdhane, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **93** (2016) 921-928.
4. S. Barbarić, *Utjecaj prozvodnih uvjeta i vremena skladištenja na kvalitetu ulja dobivenog iz plodova maslina*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2017.
5. http://www.agroledina.hr/maslina.php (20.9.2019.).
6. M. Dobra, *Laboratorijska analiza maslinovog ulja*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2017.
7. M. Gugić i suradnici, *Maslina-kemija i tehnologija prerade*, interna skripta, Veleučilište Marko Marulić u Kninu, Knin, 2006.
8. http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=57224 (21.9.2019.).
9. https://www.agroportal.hr/maslinarstvo/1924 (21.9.2019.).
10. R. Ozimec, J. Karlogan Kontić, F. Strikić, E. Maletić, Z. Matotan, *Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije*, Program Ujedinjenih naroda za razvoj, Zagreb, str. 94-113.
11. http://www.velaluka.info/udruga-maslinara/sorte_maslina/oblica.htm (21.9.2019.).
12. https://publicinsta.com/media/BaxBwa1l2Xu (21.9.2019.).
13. M. Marjanović, *Utjecaj antioksidansa i singerista na održivost hladno prešanog ulja šafranike*, Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Osijeku, Osijek,2015.
14. T. Zrnić, *Utjecaj skvalena na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja i ribljeg ulja*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2017.
15. https://en.wikipedia.org/wiki/BetaSitosterol#/media/File:Sitosterol_structure.svg (28.9.2019).
16. https://en.wikipedia.org/wiki/Oleuropein 14 (2.10.2019.).

17. B. Soldo, *Utjecaj lipoksigenaze na sastav hlapljivih tvari u maslinovom ulju autohtonih dalmatinskih sorti*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
18. M. Yilmazer, S. G. Karagoz, G. Ozlan, E. Karacabey, *Journal of food and drug analysis* **24** (2016) 299-304.
19. M. Subotić, *Terpeni-prirodni organski spojevi*, Završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Osijeku, Osijek, 2016.
20. I. Jerković, Predlošci za predavanje iz kemije i tehnologije aromatičnog bilja, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2014.
21. A. Parčina, *Eterično ulje gorke naranče (Citrus aurantium* L.*): usporedba metoda izolacije*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2017.
22. M. Zenčić, *Određivanje antioksidacijske aktivnosti i inhibicijskog djelovanja vodenog ekstrakta gorke naranče (Citrus aurantium* L.*) na aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2017.
23. http://narodni.net/limunova-ljekovita-svojstva-upotreba-limuna-kao-ljeka/ (2.10.2019).
24. https://www.plantea.com.hr/limun/ (2.10.2019.)
25. https://www.nezavisne.com/zivot-stil/zdravlje/Smrsajte-uz-limun-dijetu-10-kilograma-za-samo-14-dana/325227 (2.10.2019.).
26. http://www.ras.hr/Media/Ljekovito_bilje.pdf (2.10.2019.).
27. V. Jurić, *Određivanje hlapljivih spojeva i ukupnih fenola iz ružmarina, kadulje, origana i timjana nakon postupka lifilizacije i sušenja sprejom*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2018.
28. https://dokaziumedicini.hr/ulje-origana-je-li-zdravo-ili-samo-lijepo-mirise/ (2.10.2019.).
29. https://www.ballyrobertgardens.com/products/rosmarinus-officinalis-prostratus-group (2.10.2019).
30. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
31. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.

32. S. Borčić, O. Kronja, Praktikum preparativne organske kemije, Školska knjiga, Zagreb, 2004.
33. A. M. Lovrić, *Optimizacija i validacija HS-SPME GC-MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
34. A. Radonić, *Izolacija i indetifikacija slobodnih i glukozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (Juniperus oxycedrus* L.*)*, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2000.
35. A. Perković, *Kvantitativno određivanje fenola iz uzorka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode*, Diplomski rad, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2018.