

Sekundarni metaboliti iz listova masline (*Olea europaea* L.)

Miletić, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:268221>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Tina Miletić

SEKUNDARNI METABOLITI IZ LISTOVA MASLINE

(Olea europaea L.)

Diplomski rad

Akadska godina: 2018./2019.

Mentor: prof. dr. sc. Valerija Dunkić

Split, siječanj 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Tina Miletić

SEKUNDARNI METABOLITI IZ LISTOVA MASLINE

(Olea europaea L.)

Diplomski rad

Akadska godina: 2018./2019.

Mentor: prof. dr. sc. Valerija Dunkić

Split, siječanj 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmakognozija/Botanika
Tema rada: je prihvaćena u prosincu 2017. na XX. sjednici vijeća studija Farmacija te potvrđena na XX. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Valerija Dunkić
Pomoć pri izradi: Marija Nazlić, asistent, mag.educ.biol.et.chem

SEKUNDARNI METABOLITI IZ LISTOVA MASLINE (*Olea europaea* L.)

Tina Miletić, broj indeksa 119

Sažetak: Maslina (*Olea europaea* L.) je jedna od glavnih poljoprivrednih kultura mediteranskog područja. Otkriveno je da su osim ulja i listovi masline bogat izvor komponenti s farmakološkim učinkom. U ovom radu analiziran je sastav eteričnog ulja i hidrolata u različitim razvojnim fazama masline. Vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru iz nekoliko uzoraka listova masline izolirana su eterična ulja i hidrolati te identificirani GC/MS analizom. U prvom uzorku eteričnog ulja najzastupljeniji spoj bio je β -ionon (20.4%), u drugom germakren D (31.2%), u trećem *endo*-fenhil acetat (12.7%), u četvrtom dokosan (40.1%), u petom n-dodekanol (30.6%) i u šestom kariofilen oksid (17.1%). U uzorcima hidrolata najzastupljeniji spoj u većini uzoraka bio je β -ionon: u prvom uzorku u količini od 15.9%, u drugom uzorku u količini od 40.3%, u trećem uzorku u količini od 42.8%; u četvrtom uzorku najzastupljeniji spoj bio je biciklogermakren (39.5%), u petom β -ionon (25.3%) i u šestom najzastupljeniji je bio miristicin (35%). Spojevi koji su izolirani u svim uzorcima listova, ili u eteričnom ulju ili hidrolatu su: α -pinen, β -kariofilen, α -humulen, *allo*-aromadendren, β -ionon, miristicin, palmitinska kiselina, oleinska kiselina te dokosan, trikosan i tetrakosan.

Ključne riječi: maslina, sekundarni metaboliti, oleuropein, fenolni spojevi

Rad sadrži: 72 stranice, 23 slike, 6 tablica, 63 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv.prof.dr.sc Olivera Politeo - predsjednik
2. izv.prof.dr.sc. Mirko Ruščić - član
3. prof.dr.sc. Valerija Dunkić – član - mentor

Datum obrane: 11. 01. 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Pharmacognosy/Botany
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. XX on December 2017 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine
Mentor: full prof. Valerija Dunkić, Ph. D.
Technical assistance: Marija Nazlić, research assistant, mag.educ.biol.et.chem

SECONDARY METABOLITES FROM OLIVE LEAVES (*Olea europaea* L.)

Tina Miletić, 119

Summary: Olive (*Olea europaea* L.) is one of the main agricultural crops of the Mediterranean area. It has been discovered that apart from oil, olive leaves are also a rich source of components with pharmacological effect. In this paper the composition of essential oils and hydrolates was observed in different life stages of olive. By aqueous distillation in Clevenger's apparatus, essential oils and hydrolates were isolated from several olive leaf samples and identified by GC/MS analysis. In the first sample of essential oil the most common compound was β -ionone (20.4%), in second germacrene D (31.2%), in third *endo*-fenchyl acetate (12.7%), in fourth docosane (40.1%), in fifth n-dodecanol (30.6 %) and in sixth caryophyllene oxide (17.1%). In hydrolates the most common compound in most of the samples was β -ionone: in first sample in the amount of 15.9%, in second sample in the amount of 40.3%, in third sample in the amount of 42.8%; in fourth sample the most common component was bicyclogermacrene (39.5%), in fifth β -ionone (25.3%) and in sixth myristicin (35%). The compounds that were isolated from all of the samples, either from essential oil or hydrolate, were: α -pinene, β -caryophyllene, α -humulene, *allo*-aromadendrene, β -ionone, myristicin, palmitic acid, oleic acid and docosane, tricosane and tetracosane.

Key words: olive, secondary metabolites, oleuropein, phenolic compounds

Thesis contains: 72 pages, 23 figures, 6 tables, 63 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. associate prof.dr.sc. Olivera Politeo – chair person
2. associate prof.dr.sc. Mirko Ruščić - member
3. full prof.dr.sc. Valerija Dunkić - supervisor

Defence date: 11. 01. 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of the thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Split, Šoltanska 2.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Maslina	2
1.1.1. Botanička pripadnost vrste <i>Olea europaea</i> L.	5
1.1.2. Uporaba i ljekovita svojstva lista masline	6
1.2. Sekundarni metaboliti	7
1.2.1. Sekundarni metaboliti u listu masline	9
1.3. Fenolni spojevi	9
1.3.1. Fenolni spojevi u listu masline	10
1.3.2. Oleuropein	12
1.3.2.1. Farmakološka svojstva oleuropeina	13
1.4. Eterična ulja	15
1.4.1. Djelovanje i primjena eteričnih ulja	15
1.4.2. Dobivanje eteričnih ulja	16
1.5. Terpeni	18
1.5.1. Monoterpeni	18
1.5.2. Seskviterpeni	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Sakupljanje materijala	24
3.2. Izolacija eteričnih ulja	24
3.3. GC/MS i GC/FID analiza eteričnih ulja	25
3.4. GC/MS i GC/FID analiza hidrolata	26
4. REZULTATI	28
4.1. Sastav eteričnih ulja i hidrolata	29
5. RASPRAVA	41
6. ZAKLJUČCI	46
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	48
8. SAŽETAK	54
9. SUMMARY	56
10. ŽIVOTOPIS	58
11. PRILOZI	60

1. UVOD

1.1. Maslina

Maslina *Olea europaea* L. (slika 1) je dugogodišnje zimzeleno stablo iz porodice Oleaceae. Od davnina je simbol Mediterana te je zahvaljujući svojoj sposobnosti da opstane u teškim uvjetima stekla reputaciju dugovječnosti (1). Rasprostranjena je u priobalnom području istočnog Mediterana, susjednom obalnom području jugoistočne Europe, zapadne Azije i sjeverne Afrike kao i u sjevernom Iranu na južnom dijelu Kaspijskog mora. Iako se maslina danas uzgaja u različitim dijelovima svijeta, Mediteran i dalje prednjači kao regija sa najvećim uzgojem (2). Tamo joj pogoduje mediteranska klima sa toplim, suhim ljetima te hladnim i kišovitim zimama.

Europsko stablo masline (*O. europaea* subsp. *europaea*) bilo je jedna od prvih kultura koju su uzgajale mediteranske civilizacije prije otprilike 6000 godina. Unatoč brojnim teorijama o podrijetlu, većina autora se slaže da divlja maslina potječe iz Male Azije odakle se širi zapadno u Grčku, Italiju, Francusku, Španjolsku i Portugal. Sa Mediterana se maslina širi u druge dijelove svijeta zahvaljujući Rimljanima i Arapima i to u Južnu i Sjevernu Ameriku, Australiju, južnu Afriku, i, tijekom posljednjih 30 godina, u Kinu (3,4). U Hrvatskoj su maslina i vinova loza glavne poljoprivredne kulture obalnog i otočnog dijela zemlje. O tradiciji uzgoja masline na području Hrvatske svjedoče brojni dokumenti te ona osim ekonomske vrijednosti u našim krajevima ima i tradicijsku, duhovnu te krajobraznu vrijednost. Uzgojno područje masline u Hrvatskoj je veoma veliko, a glavna sorta u uzgoju je „Oblica“ koja je ujedno predmet istraživanja ovog diplomskog rada (5).

Maslina je termofilna vrsta koja se dobro prilagođava stresnim uvjetima kao što su suša i velike promjene u salinitetu (3). Može rasti na različitim tipovima tala, iako preferira dobro isušena i prozračna tla bogata nutrijentima i organskom tvari. Unatoč tome, obično raste na stjenovitim obroncima na tlima koja su siromašna hranjivim tvarima. *O. europaea* subsp. *europaea* je vrsta koja se smatra otpornom na sušu jer raste na području gdje je često izložena stresu kao što je nedostatak vode, što je karakteristično za mediteransku klimu. Veličina i oblik stabla masline variraju ovisno o klimatskim uvjetima, plodnosti tla i načinu kultiviranja. Stabla koja rastu u divljini mogu doseći visinu i do 10 metara, a obrezana kultivirana stabla mogu rasti u visinu i do 15 metara. Korijski sustav masline je opsežan, dubina i lateralna širina mu ovise o dubini i vrsti tla, aeraciji i količini vode u tlu (4).

Od 6 podvrsta masline samo 3 podvrste su prirodno rasprostranjene na mediteranskom području: subsp. *Europaea*, subsp. *guanchica* i subsp. *cerasiformis*. Mediteranske podvrste dijele se na oleaster, divlji oblik (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) i kultiviranu maslinu (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) (3). Divlju maslinu karakterizira grmoliki rast, manji list i manji plod od kultivirane masline. Hibridizacija ovih dviju populacija je odigrala važnu ulogu u evoluciji sorti maslina (4). Stablo masline se odlikuje cjelovitim, duguljastim ili eliptičnim listovima koji rastu bilateralno na stabljici, malim bijelim cvjetovima te mesnatim plodom koji je obično ovalnog oblika i sazrijevanjem prelazi iz zelene u crnu boju (6,7). Rast i razvoj ploda započinje u rujnu i obično traje do prosinca, a plodovi se beru u kasnu jesen ili zimu (4). Plod masline se koristi u prehrani ne samo zbog svoje jestive pulpe već i kao izvor maslinovog ulja koje je bogato mononezasićenim masnim kiselinama. Osim što se rabi u prehrani, maslinovo ulje se također široko primjenjuje u kozmetici kao i u farmaceutskoj industriji (6,7). Tvari odgovorne za ljekoviti učinak su mononezasićene masne kiseline te fenolne komponente koje su pretežito prisutne u vodenoj fazi (8).

Stablo masline ima opsežnu povijest u smislu terapijske i nutritivne važnosti. Stoljećima se ekstrakt lista masline rabio u zdravstvene svrhe i za konzerviranje. Još su najstariji Egipćani koristili lišće kako bi sačuvali tijela faraona. Lišće je također bilo dobro znan tradicionalni lijek za ublažavanje vrućice i nekih tropskih bolesti kao što je malarija (2). U drevna vremena maslinovo ulje se prvenstveno rabilo u terapeutske svrhe i imalo je veliku ulogu u općoj higijeni i njezi tijela. Masaže s maslinovim uljem su omekšavale kožu, opuštale mišiće i bile su smatrane „fontanom mladosti“. Još je Hipokrat u svojim djelima govorio o farmakoterapijskim učincima maslinovog ulja. Stari liječnici su mu pripisivali adstringentni i antiseptički učinak, a koristilo se kao komponenta masti i obloga za kožne lezije, kao i za liječenje glavobolje (7).

Maslinovo ulje danas je sastavni dio mediteranske prehrane za koju se pokazalo da je snažno povezana sa smanjenom učestalošću kardiovaskularnih bolesti i određenih vrsta tumora. Nutritivna vrijednost i povoljni učinci na zdravlje pripisuju se velikoj količini mononezasićenih masnih kiselina koje maslinovo ulje sadrži, kao što je oleinska kiselina te komponentama koje su prisutne u manjim količinama kao što su skvaleni, triterpeni, steroli, pigmenti, fenoli itd. Fenolne komponente iz maslinovog ulja su najviše proučavane i upravo njima se pripisuje glavnina učinaka na ljudsko zdravlje, a najznačajnije su oleuropein i hidroksitirozol. Sadržaj komponenti u maslinovom ulju varira ovisno o sorti masline, klimi,

zrelosti masline te sustavu prerade za proizvodnju maslinovog ulja. Zahvaljujući ovim bioaktivnim komponentama maslinovo ulje posjeduje antioksidativni, antibakterijski, protuupalni te antikancerogeni učinak (2,9). Kao i plod masline, i listovi sadrže velik broj fenolnih komponenti koje su odgovorne za brojne farmakološke učinke (10).



Slika 1. Maslina

(Dostupno na: <https://www.agroportal.hr/maslinarstvo/19886>)

1.1.1. Botanička pripadnost vrste *Olea europaea* L.

Sistematski položaj istraživane vrste je sljedeći:

Carstvo: Biljke

Podcarstvo: Tracheobionta (vaskularne biljke)

Odjeljak: Spermatophyta (sjemenjače)

Pododjeljak: Magnoliophyta (kritosjemenjače)

Razred: Magnoliopsida (dvosupnice)

Podrazred: Asteridae

Red: Scrophulariales

Porodica: Oleaceae

Rod: *Olea* L.

Vrsta: *Olea europaea* L.

1.1.2. Uporaba i ljekovita svojstva lista masline

Lišće masline jedan je od nusproizvoda maslinarstva, a dostupno je tijekom cijele godine. Akumulira se tijekom obrezivanja maslina i može se naći u velikim količinama u proizvodnji maslinovog ulja jer se odvaja od ploda neposredno prije same prerade. List je primarno mjesto odvijanja kako primarnog tako i sekundarnog metabolizma biljke i može se smatrati potencijalnim izvorom važnih bioaktivnih komponenti (11). Iako su plod i drvo najviše korišteni dijelovi masline još od davnina, postoje dokazi o upotrebi lista masline još u starom Egiptu, gdje se on smatrao simbolom nebeske moći (12). List masline tradicionalno se upotrebljavao u razne svrhe: oralno se koristio za liječenje različitih intestinalnih bolesti, za liječenje bolesti usne šupljine list bi se žvakao, u obliku dekokta koristio se za liječenje proljeva te infekcije mokraćnog sustava, vrući vodeni ekstrakt od svježeg lišća primijenjen oralno koristio se za liječenje hipertenzije i za poticanje diureze dok se vrući vodeni ekstrakt osušene biljke koristio za liječenje astme (13). Potkraj 19. stoljeća izoliran je sastojak kojeg je većina istraživača smatrala odgovornim za ljekovita svojstva lista masline, oleuropein. 1962. potvrđeno je da oleuropein snižava krvni tlak kod životinja. Također se došlo do spoznaja da list masline ima pozitivan učinak na cirkulaciju, smanjenje pojave grčeva crijevnih mišića te ublažavanje aritmije. Nakon navedenoga, izoliran je aktivni sastojak oleuropeina, elenolna kiselina (12). Sredinom 19. stoljeća, čaj od lista masline je korišten u liječenju malarije. U Engleskoj je čaj od masline postao veoma popularan s obzirom da su ga Englezi davali bolesnim mornarima i kolonijalistima koji su se vraćali iz tropskih područja u kolonijalna vremena. Pojavilo se nekoliko brendova dodataka prehrani koji su u sebi sadržavali list masline u obliku tekućih ekstrakata ili tableta protiv dijabetesa, hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti, učestalih prehlada, infekcije mokraćnog sustava, za liječenje kroničnog umora i za podizanje imuniteta. Ekstrakti lista masline se također koriste u kozmetičkoj industriji kao „anti-age“ proizvodi (14). Prilikom proizvodnje maslinovog ulja listovi se mogu dodati kako bi se povećao pozitivan učinak na zdravlje te poboljšao okus ulja. Dodatak lišća povećava sadržaj polifenola i klorofila u ulju, ali i poboljšava organoleptička svojstva ulja (15).

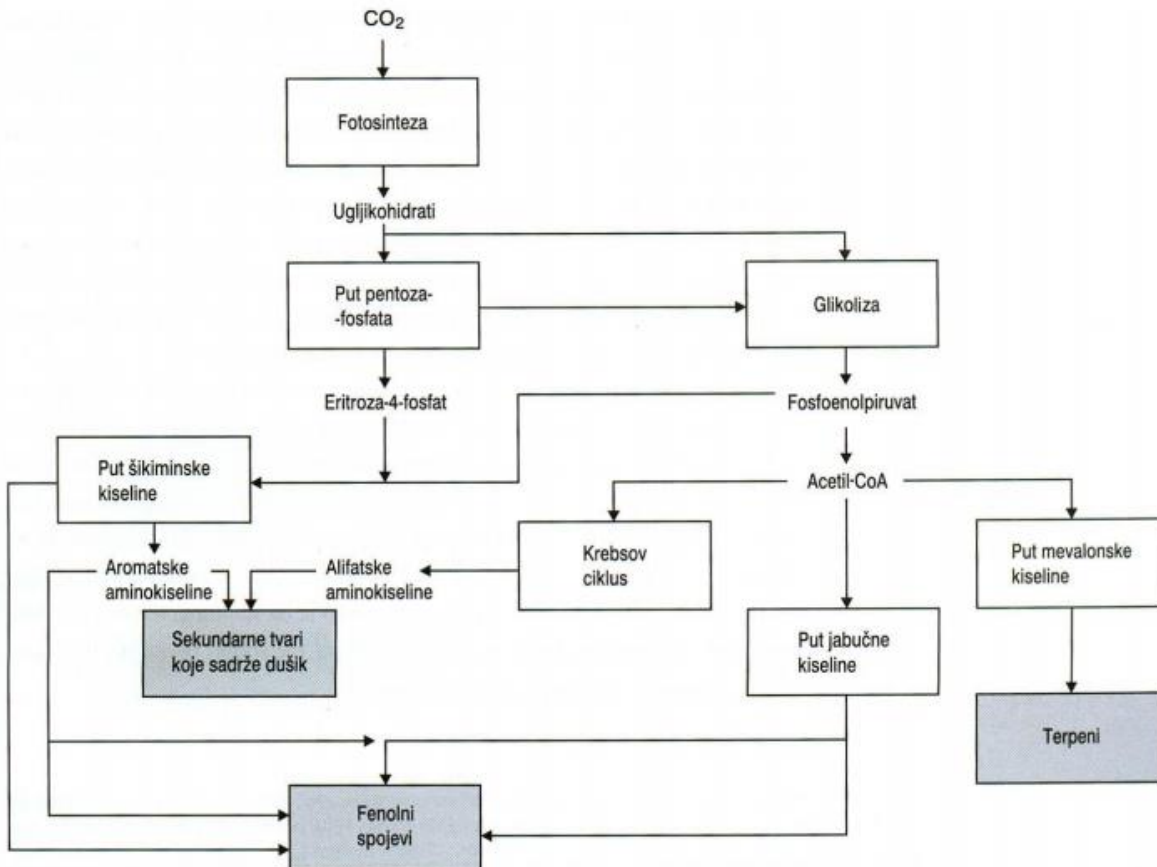
1.2. Sekundarni metaboliti

Metaboliti su međuprodukti i produkti metabolizma. U stanici imaju različite funkcije kao što su signaliziranje, strukturna uloga, stimulatorni i inhibitorni učinci na enzime, funkcioniraju kao gorivo, imaju vlastitu katalitičku aktivnost, važni su za obranu i interakcije s drugim organizmima. Biljke proizvode širok asortiman organskih tvari od kojih velika većina ne sudjeluje izravno u rastu i razvoju same biljke. Te tvari nazivamo sekundarnim ili specijaliziranim metabolitima (16). Njihova ograničena raspodjela im omogućuje da budu korišteni kao taksonomski markeri te mogu biti odgovorni za specifičan miris, okus i boju određene biljke s obzirom na to da različite porodice biljaka imaju jedinstvenu kombinaciju specijaliziranih metabolita. Nekad su se specijalizirani metaboliti smatrali otpadnim produktima biljaka koji su nastajali kao rezultat „pogrešaka“ primarnog metabolizma te se smatralo da su od male važnosti za metabolizam biljke. Danas se zna da su mnogi specijalizirani metaboliti ključne komponente obrambenih mehanizama biljke (17,18). Imaju važnu ekološku funkciju u biljkama jer predstavljaju zaštitu od herbivora i zaraze mikrobima. Osim toga, važni su i za primamljivanje oprašivača i životinja koje rasprostranjuju sjemenke, te kao tvari koje posreduju u kompeticiji biljka – biljka (19).

Primarni metaboliti su tvari koje biljka proizvodi za rast i metabolizam; oni uključuju ugljikohidrate, lipide i proteine (18). Za razliku od primarnih metabolita, nedostatak specijaliziranih metabolita neće rezultirati naglim uginućem biljke već može dovesti do dugoročno smanjene sposobnosti biljke da preživi, da se oplođuje, može narušiti sam izgled biljke ili može ne dovesti ni do kakve promjene (16). Mnogi od specijaliziranih metabolita dobivenih iz biljaka imaju važnu ulogu u farmaceutskoj industriji, prehrani, proizvodnji kozmetike, parfema, boja, dodataka prehrani itd. (20). Danas su predmet mnogih istraživanja jer pokazuju raznolike biološke učinke kao što su antimikrobni, antitumorski, antiinflamatorni i antifungalni učinci (18). Specijalizirani metaboliti mogu biti klasificirani na temelju kemijske strukture (na primjer imaju li prsten, sadrže li šećer), sastava, topljivosti u različitim otapalima ili na temelju puta njihove sinteze (slika 2) (16).

Na temelju njihovog biosintetskog podrijetla, specijalizirane metabolite možemo podijeliti u 3 glavne skupine:

- **Fenolni spojevi**
- **Terpeni**
- **Spojevi s dušikom (19)**



Slika 2. Glavni putovi biosinteze sekundarnih metabolita

(Preuzeto iz: Pevalšek–Kozlina B. Fiziologija bilja. Zagreb: Profil; 2003.)

1.2.1. Sekundarni metaboliti u listu masline

Maslina je, kao i mnoge druge biljke, neprestano izložena okolišnom stresu kao što je visoka temperatura i UV zračenje. Kako bi se zaštitila, maslina proizvodi različite fenolne spojeve. Kvantitativni i kvalitativni sastav ovih komponenti ovisi o vrsti masline, stupnju zrelosti listova, o klimi, geografskom položaju itd. Biofenoli sačinjavaju većinski dio lista masline dok su druge komponente prisutne u tragovima, kao što su terpeni i lipofilne komponente. Dok metabolite kao što su flavonoidi, alkoholi i fenolne kiseline pronalazimo u različitim biljkama, sekoiridoide kao što je oleuropein pronalazimo samo u biljkama iz porodice *Oleaceae*. Ovi spojevi su istovremeno i terpenski i hidroksi-aromatski sekundarni metaboliti. U listu masline su također prisutni terpeni kao što su α -amirin, maslinska kiselina i oleanolna kiselina. Oleanolna kiselina sačinjava otprilike 30 g/kg suhe tvari. Od lipofilnih komponenti tu su zasićeni ugljikohidrati, vosak, α -tokoferol, skvaleni, trigliceridi, β -karoten, linearni alkoholi i masne kiseline kao što su palmitinska, oleinska i linolenska, na razini ppm-ova. Broj ugljikovih atoma varira između 29 i 33. α -tokoferol, β -karoten, skvalen, α i β -amirin analizirani u heksanskom ekstraktu su bioaktivne komponente koje imaju utjecaj na ljudski fiziološki sustav stoga se oni primjenjuju u industriji lijekova, hrane i kozmetološkoj industriji. List masline također sadrži manitol, šećerni alkohol kojeg sintetizira jedino porodica *Oleaceae*. On je u listu masline prisutan u količini između 10 i 20 g/kg lista masline (14).

1.3. Fenolni spojevi

Fenole karakterizira prisutnost barem jedne aromatske skupine na kojoj se nalazi jedna ili više hidroksilnih grupa (slika 3). Rangiraju od jednostavnih, niske molekularne težine, sa samo jednim aromatskim prstenom pa do većih i kompleksnijih tanina i deriviranih polifenola (21). Fenolne spojeve često nalazimo otopljene u vakuoli u obliku glikozida ili estera šećera. Biljke proizvode brojne fenolne spojeve od kojih su neki topivi samo u organskim otapalima, neki u vodi, a neki su veliki, netopivi polimeri. Mogu se sintetizirati na različite načine, a dva najvažnija puta biosinteze uključuju put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline. Većina

biljnih fenola sintetizira se putem šikiminske kiseline, dok put jabučne kiseline ima manje značenje u sintezi biljnih fenolnih spojeva (19).

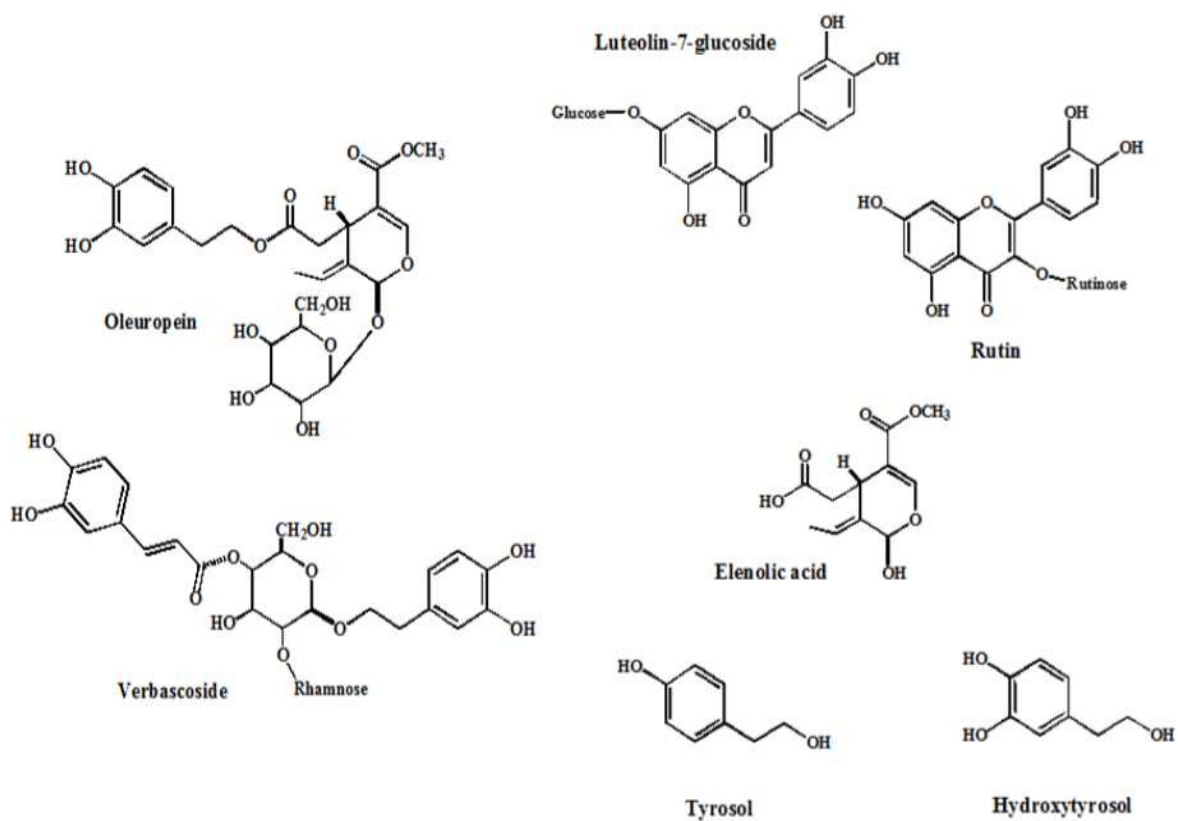
1.3.1. Fenolni spojevi u listu masline

List masline od svih dijelova stabla masline ima najveću antioksidativnu aktivnost (10). Listovi sadrže veću količinu i raznolikost polifenola nego ekstra djevičansko maslinovo ulje. Također, prisutne su važne strukturalne razlike između polifenola iz listova masline i onih iz plodova koje bi mogle imati utjecaj na veći kapacitet pozitivnog učinka na zdravlje ekstrakta lista masline (15). Pet je skupina fenolnih spojeva prisutno u listu masline:

1. Oleuropeozidi (oleuropein i verbaskozid)
2. Flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diozmetin-7-glukozid, luteolin i diozmetin)
3. Flavonoli (rutin)
4. Flavan-3-oli (katehin)
5. Supstituirani fenoli (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska kiselina i kavena kiselina)

Najbrojnija komponenta prisutna u listu masline je oleuropein, iza kojeg slijede hidroksitirozol, luteolin, apigenin i na kraju verbaskozid (13). Derivati oleuropeina - oleuropein aglikon, oleozid i aglikon ligstrozida su također prisutni u različitim koncentracijama. Hidrolizom oleuropeina nastaju aglikon oleuropeina, elenolna kiselina, hidroksitirozol i molekula glukoze. Hidroksitirozol je fenolni alkohol i druga najbrojnija fenolna komponenta u listu masline. Tirozol je još jedna fenolna komponenta koja se dobiva iz oleuropeina, ali se u listu nalazi u puno manjim koncentracijama. Od drugih komponenti tu je verbaskozid koji je također pokazao antioksidativni, protuupalni i antineoplastični učinak. Luteolin, koji pripada flavonoidima, je također pokazao protuupalni učinak, kao i apigenin, koji je u listu prisutan u relativno niskim koncentracijama (15). Na količinu fenolnih spojeva

u listu učinak može imati nekoliko čimbenika kao što su: uvjeti sušenja, datum prikupljanja, zona kultivacije, proces ekstrakcije te vrsta masline (11).

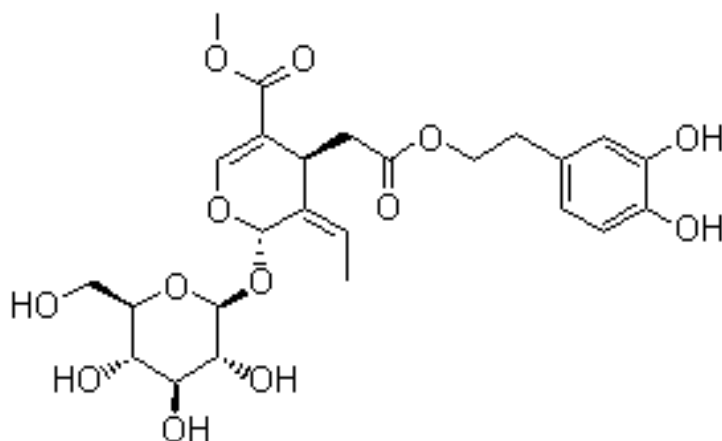


Slika 3. Struktura fenolnih komponenti većinom prisutnih u listu masline.

(Preuzeto iz: Sabry O. Review: Beneficial Health Effects of Olive Leaves Extracts. J Natur Sci Res. 2014;4(19):1-9.)

1.3.2. Oleuropein

Oleuropein (slika 4) je heterozidni ester β -glikozilirane elenolne kiseline i 3,4-dihidroksi-feniletanola (hidroksitirozola) (14). Pripada sekoiridoidima, skupini koja nastaje kao produkt sekundarnog metabolizma terpena (20). U velikim količinama je prisutan u neobrađenim plodovima i listovima masline, dok je hidroksitirozol, razgradni produkt oleuropeina, više prisutan u procesuiranim plodovima masline i maslinovom ulju (14). Smanjenje koncentracije oleuropeina i povećanje koncentracije hidroksitirozola rezultat je kemijskih i enzimatskih reakcija do kojih dolazi tijekom sazrijevanja ploda ili procesuiranja maslina (13).



Slika 4. Oleuropein

Oleuropein su prvi put izolirali Vintilesco i Bourquelot 1908. godine. Oni su ga definirali kao topljivog u vodi i alkoholu i netopljivom u eteru, kao ne-kristaliničnu tvar i kao ekstremno gorak glukozid. Većina istraživača se slaže da je oleuropein tvar koja je najviše odgovorna za pozitivne učinke na zdravlje lista masline, budući da i produkti hidrolize ovog spoja također imaju značajan farmakološki učinak (14).

1.3.2.1. Farmakološka svojstva oleuropeina

Oleuropein ima nekoliko farmakoloških učinaka, kao što su antioksidativni, antiinflamatorni, antikancerogeni, antiaterogeni, antimikrobni i antiviralni učinak. Također se pokazalo da djeluje kardioprotektivno te da iskazuje antiishemičku i hipolipemičku aktivnost (22).

Antioksidativni učinak

Oleuropein inhibira oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL-a) induciranu bakrovim sulfatom. Također ima mogućnost uklanjanja dušikovog oksida i dovodi do povećanja ekspresije inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) (22). Do antioksidacijskog učinka oleuropeina vjerojatno dolazi i zahvaljujući njegovoj sposobnosti keliranja metalnih iona, kao što su Cu i Fe, koji kataliziraju reakcije stvaranja slobodnih radikala. Za oleuropein i hidrositirozol se pokazalo da uklanjaju superoksidne anione te hidroksilne i DPPH radikale (13).

Antiinflamatorni učinak

Oleuropein povećava proizvodnju dušikovog oksida u makrofazima te im time povećava učinkovitost. Također dovodi do inhibicije lipooksigenazne aktivnosti i produkcije leukotriena B₄.

Antikancerogeni učinak

Mnoštvo sastojaka iz maslinovog ulja identificirano je kao učinkovito sredstvo u ublažavanju inicijacije, promocije i napredovanja višestupanjske karcinogeneze. Aglikon oleuropeina je najpotentniji fenolni spoj u smanjenju životnog vijeka stanica raka dojke. Također je pokazan antiproliferativni učinak ekstrakata u kojima je dominantni spoj bio oleuropein koji su inhibirali proliferaciju stanica humanog adenokarcinoma dojke, karcinoma mokraćnog mjehura te endotela stanica goveđeg mozga.

Antiaterogeni učinak

Pokazalo se da je u ishemičnom srcu koje je prethodno bilo tretirano s oleuropeinom smanjeno otpuštanje oksidiranog glutationa te da je spriječena lipidna peroksidacija membrane, što se smatra ključnim čimbenikom u patogenezi ateroskleroze.

Antimikrobni učinak

Iako točan mehanizam antimikrobnog učinka još nije utvrđen, pokazalo se da oleuropein ima snažan učinak na gram pozitivne i gram negativne bakterije. Uz druge fenolne spojeve inhibira razvoj *Klebsiellae pneumoniae*, *Escherichiae Coli*, *Bacillus Cereus*, a pokazalo se i da komercijalni ekstrakt lista masline pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* te protiv MRSA-e (*Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*). (22) Oleuropein i hidroksitirozol djeluju i protiv protozoa te virusa gdje oleuropein djeluje putem elenolne kiseline, koja je produkt njegove hidrolize (13).

Ostali učinci oleuropeina

Oleuropein djeluje i neuroprotektivno; pokazan je pozitivan učinak na bolesti povezane sa starenjem, kao što je demencija (22). Od ostalih učinaka možemo istaknuti hipoglikemijski, hepatoprotektivni, gastroprotektivni učinak, učinak na smanjenje tjelesne težine, preventivan učinak na osteoporozi, a rabi se i u kozmetičkim preparatima jer štiti od UVB zraka, usporava starenje te potpomaže zacjeljivanje rana i re-epitelizaciju kože (23).

1.4. Eterična ulja

Eterična ulja su složene hidrofobne tekućine koje sadrže različite hlapljive komponente niske molekularne težine kao što su terpeni i terpenoidi (24). Može ih proizvesti više od 17000 vrsta biljaka koje najčešće pripadaju cvjetnjačama i to porodicama kao što su Lamiaceae, Zingiberaceae i Asteraceae. U biljkama su prisutni u obliku uljnih kapi, u jednom ili više biljnih organa kao što su cvjetovi, listovi, plodovi, sjemenke, kora i korijen (25). Eterična ulja su mješavine zasićenih i nezasićenih ugljikohidrata, alkohola, aldehida, etera, estera, ketona, fenolnih oksida i terpena. Prozirne su tekućine ugodna mirisa s visokim refrakturnim indeksom (26). Mnogi čimbenici utječu na kemijski sastav eteričnog ulja kao što su genetičke varijacije, prehrana biljke, primjena gnojiva, geografska lokacija biljke, klima, sezonske varijacije, stres tijekom rasta i sazrijevanja biljke te skladištenje. Osim toga, na sastav mogu utjecati i vrsta korištenog biljnog materijala te metoda ekstrakcije. Također, eterična ulja iz različitih dijelova biljke iskazuju različita biološka i farmakološka svojstva. Slično tome, otapala različitih polarnosti ekstrahiraju različite skupine tvari (27). Eterična ulja mogu sadržavati 20-100 biljnih sekundarnih metabolita koji pripadaju različitim kemijskim skupinama. Terpenoidi i fenilpropanoidi čine najveći dio sastava eteričnog ulja (28). Nekoliko tisuća tvari koje pripadaju skupini terpena je dosad identificirano u eteričnim uljima kao što su funkcionalni derivati alkohola (geraniol, α -bisabolol), ketona (menton, p-vetivon), aldehida (citronelal, sinensal), estera (γ -terpinil acetat, cedril acetat) i fenola (timol). Od tvari koje pripadaju fenilpropanoidima tu su eugenol, cinamaldehyd i safrol (29). Većinom biološku aktivnost eteričnog ulja određuju jedna ili dvije njegove komponente iako se ponekad ukupna aktivnost ne mora nužno pripisati pojedinačnoj komponenti već može biti rezultat sinergizma više njih (28).

1.4.1. Djelovanje i primjena eteričnih ulja

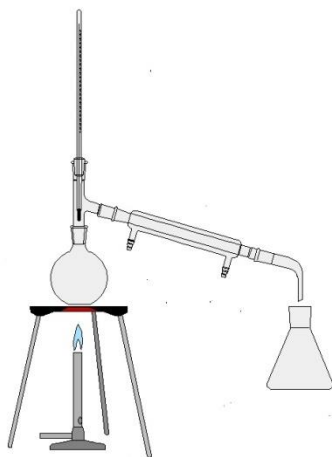
Aromatične biljke, koje proizvode eterična ulja, rabe se još od davnih vremena za različite namjene kao što su medicinski tretmani, konzerviranje te začinjavanje hrane. U starom Egiptu eterična ulja su se koristila za prevenciju i liječenje bolesti. Kasnije su to preuzeli Grci i Rimljani i nastavili koristiti eterična ulja u aromaterapiji. Danas je poznato

otprilike oko 3000 različitih eteričnih ulja od kojih je oko 300 komercijalno dostupno. Rabe se u raznim proizvodima kao što je kozmetika, proizvodi za čišćenje, osvježivači zraka, proizvodi za higijenu, agrikulturu, prehrambeni proizvodi, proizvodi medicinske namjene te u aromaterapiji. Za eterična ulja dokazano je da posjeduju brojne farmakološke učinke kao što su antibakterijski, antivirusni, antifungalni, antiinflamatorni te mnogi drugi (30). Primjenjuju se u malim količinama inhalacijom, masažom ili jednostavnom primjenom na kožu (21). Inhalacijska terapija eteričnim uljima se koristi za tretiranje akutnog i kroničnog bronhitisa te akutnog sinusitisa. Inhalacija para eteričnih ulja povećava izlaz tekućine iz dišnog sustava, održava ventilaciju i drenažu sinusa, ima protuupalni učinak na dušnik te smanjuje simptome astme (31). Inhalacija i vanjska primjena ovih ulja za liječenje mentalnog i fizičkog zdravlja osnova su aromaterapije. Mehanizam njihova djelovanja uključuje podraživanje receptora u nosu odakle se signal prenosi u limbički sustav i hipotalamus u mozgu te dovodi do otpuštanja neurotransmitora kao što su serotonin, endorfin itd. Ti neurotransmitori povezuju naš živčani sustav sa ostalim dijelovima tijela te dovode do željenih učinaka i prouzrokuju osjećaj olakšanja (26).

1.4.2. Dobivanje eteričnih ulja

Postoji nekoliko načina dobivanja eteričnih ulja:

Destilacija – najčešće korištena metoda dobivanja eteričnih ulja (slika 5). Količina dobivenog ulja ovisi o duljini trajanja destilacije, tlaku, temperaturi i tipu biljnog materijala. Tijekom destilacije biljni materijal je izložen ključaloj vodi ili pari kako bi se eterično ulje iz materijala oslobodilo putem isparavanja. Kako se para i eterično ulje kondenziraju, tako se sakupljaju i odvajaju uljna od vodene faze na temelju razlike u gustoći (32,33).



Slika 5. Aparatura za destilaciju.

(Dostupno na: https://sr.wikipedia.org/sr-el/Датотека:Aparatura_za_destilaciju.JPG)

Hladno prešanje – najstarija metoda ekstrakcije koja se rabi gotovo isključivo za proizvodnju eteričnih ulja iz citrusa. Odnosi se na bilo koji fizički proces kojim se iz žljezda sa eteričnim uljem iz kore i kutikule istiskuje eterično ulje. Time se dobiva vodenasta emulzija koja se onda centrifugira kako bi se izdvojilo eterično ulje. Ovom metodom se ekstrahira citrusno voće zbog termolabilnosti prisutnih aldehida.

Ekstrakcija otapalom – ova metoda se može koristiti kod termolabilnih eteričnih ulja. Eterično ulje se odvaja uz pomoć organskog otapala (etanol, heksan, metanol, petrolej eter) koje se nakon toga uklanja. Glavna prednost ove metode je što je zbog niže temperature tijekom procesa smanjen rizik od kemijskih promjena do kojih može doći pri visokim temperaturama. Izolirano ulje sadrži malu količinu organskog otapala stoga se ova metoda ne koristi u industriji hrane, a učestala je u kozmetičkoj industriji.

Superkritična fluidna ekstrakcija – u ovoj metodi umjesto vodene pare koristi se superkritični ugljikov dioksid koji se pod određenim uvjetima tlaka i temperature ponaša kao otapalo. Superkritično otapalo je otapalo koje je u međustanju između plina i tekućine. Na kraju ekstrakcije snižavanjem tlaka dolazi do prijelaza CO₂ iz superkritičnog u plinovito stanje koji se onda sam uklanja iz ekstrakta pod atmosferskim tlakom (33,34).

1.5. Terpeni

Terpeni su glavna sastavnica eteričnih ulja koja biljnom materijalu daju miris (35). Predstavljaju najveću i najraznovrsniju skupinu specijaliziranih metabolita (36). U biljkama imaju različite funkcionalne uloge kao hormoni, fotosintetski pigmenti, nosači elektrona te kao strukturne komponente membrana (27). Terpeni se mogu oksidirati i reducirati, a neki i polimerizirati, stoga mogu postojati i u obliku alkohola, oksida, estera, etera, aldehida i ketona (37). Netopljivi su u vodi, a sintetiziraju se iz izopentenskih jedinica sa 5 C-atoma. Razvrstavaju se na osnovi broja jedinica od 5 C atoma koje sadrže: monoterpeni sadrže 2 C₅ jedinice, seskviterpeni 3 C₅ jedinice, diterpeni 4 C₅ jedinice, triterpeni 6 C₅ jedinica, tetraterpeni 8 C₅ jedinica a politerpenoidi (C₅)_n jedinica (19). Wallach 1887. formulira „izoprensko pravilo“ po kojem se većina terpena sastoji od izoprenskih jedinica koje se povezuju po načelu „glava na rep“.

Od navedenih grupa terpenskih spojeva, u sastav eteričnih ulja ulaze monoterpeni i seskviterpeni (38).

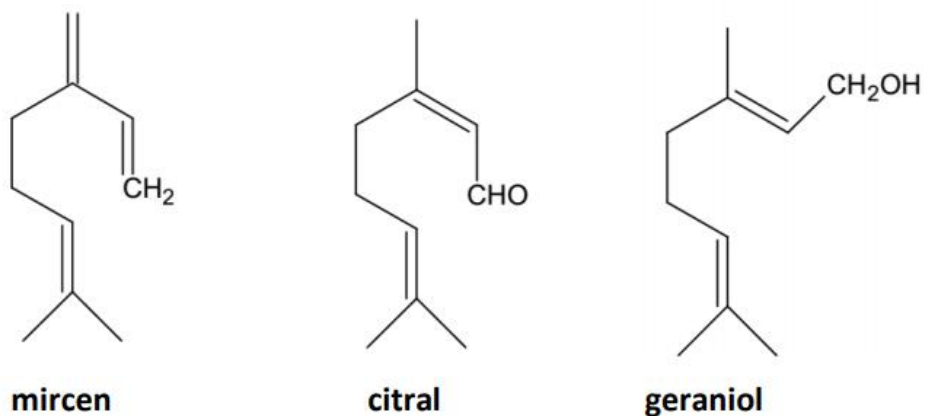
1.5.1. Monoterpeni

Monoterpeni (slika 6) sadrže 10 C atoma. Sastoje se od dvije izoprenske jedinice povezane po načelu „glava na rep“. Kombinacijom dimetilalil-pirofosfata (DPP), izopentenil-pirofosfata (IPP) i enzima transferaze nastaje geranil-pirofosfat (GPP) koji je prekursor monoterpena (39).

Dijele se u 2 skupine:

- **Pravilni** koji mogu biti linearni, monociklički i biciklički
- **Nepравilni.**

Nepравilni monoterpeni su oni koji odstupaju od uobičajenog povezivanja glava – rep; kod njih su izoprenske jedinice povezane glava - glava, glava – sredina ili pregradnjom glava – rep struktura (40).

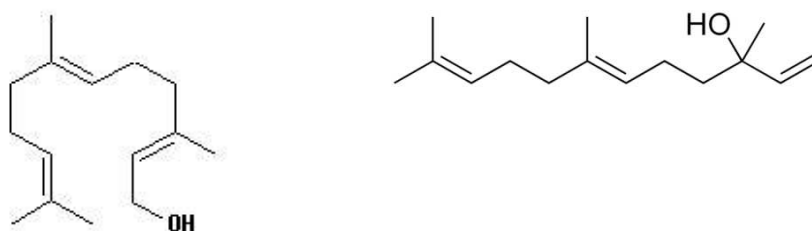


Slika 6. Primjeri monoterpena

1.5.2. Seskviterpeni

Seskviterpeni su linearni i ciklički C₁₅ spojevi čiji je prekursor farnezil-pirofosfat (FPP) koji nastaje adicijom izopentenil-pirofosfata (IPP) na geranil-pirofosfat (GPP). Poznato je više od dvjesto različitih tipova seskviterpenskih skeleta koji nastaju kao posljedica ciklizacija, pregradnji i oksidacija (38).

Najpoznatiji primjer acikličkih seskviterpena su spojevi farnezol i nerolidol (slika 7).



Slika 7. Farnezol i nerolidol

Predstavnici monocikličkih seskviterpena su bisabolen i zinziberen, a bicikličkih kadinen (slika 8).



Slika 8. Zinziberen i kadinen

Azuleni su spojevi koji nekim uljima daju intenzivno plavu boju, a pripadaju bicikličkim seskviterpenima.

Najpoznatiji triciklički seskviterpen je kopaen (slika 9).



Slika 9. Kopaen

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Maslina (*Olea europaea* L.) je biljka koja u Hrvatskoj ima veliki tradicijski i gospodarski značaj. Jedna je od glavnih gospodarskih kultura obalnog dijela zemlje i njen uzgoj usmjeren je ponajprije na proizvodnju maslinovog ulja koje je ključna komponenta „mediteranske prehrane“ zahvaljujući brojnim dokazanim učincima na zdravlje. Kakogod, u zadnje vrijeme sve se više pozornosti usmjerava na istraživanje listova masline za koje se pokazalo da su također bogat izvor komponenti s blagotvornim učinkom na zdravlje.

U ovom diplomskom radu vršena je usporedba sastava hlapljivih komponenti izoliranih iz eteričnih ulja i hlapljivih komponenti hidrolata listova masline. Uzorci listova za istraživanja su sakupljeni u različitim vegetativnim fazama razvoja masline na istom stablu. Cilj istraživanja je usporediti kvalitativni i kvantitativni sastav hlapljivih tvari iz listova masline u različitim vegetativnim fazama, od zimskog razdoblja do faze cvatnje, u razdoblju od šest mjeseci.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Sakupljanje materijala

Mjesto sakupljanja: Ražanac, okolica Zadra. Listovi su sakupljeni sa istog stabla masline jednom mjesečno.

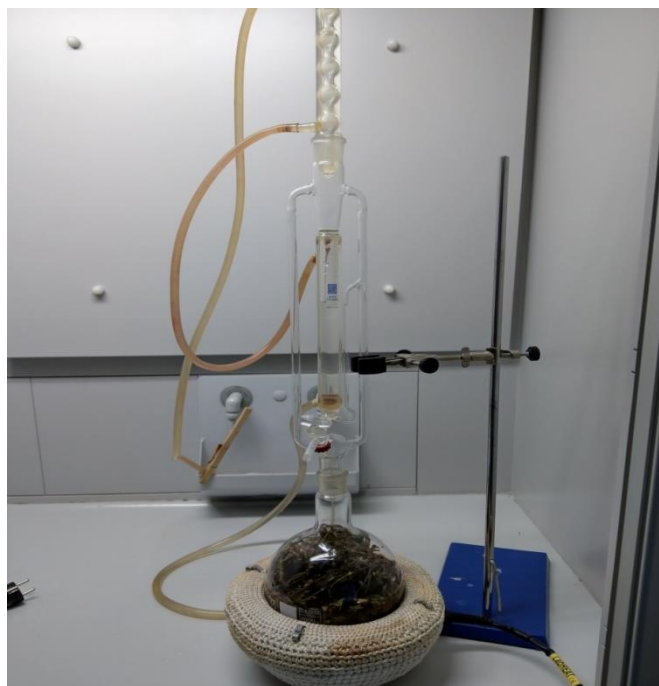
Vrsta masline: Oblica

Vrijeme sakupljanja:

1. uzorak: 12. 12. 2017.
2. uzorak: 06. 01. 2018.
3. uzorak: 03. 02. 2018.
4. uzorak: 14. 03. 2018.
5. uzorak: 14. 04. 2018.
6. uzorak: 14. 05. 2018.

3.2. Izolacija eteričnih ulja

Eterična ulja su iz biljnog materijala izolirana vodenom destilacijom u trajanju od 3 sata, aparaturom po Clevengeru (slika 10). Aparatura se sastoji od: tikvice od 1000 mL, graduirane cijevi, hladila i kalote. Koristilo se oko 50 g suhog materijala svakog uzorka na 500 mL vode. U graduiranu cijev dodano je i 2 mL pentana (C_5H_{12} , $M = 72,15\text{g/mol}$) kako bi se smanjio mogući gubitak otopljenih hlapljivih spojeva u vodi. Nakon završetka destilacije, otopina ulja u pentanu je odijeljena od vode. Prije destilacije odvagana je prazna bočica m_1 , a nakon destilacije bočica sa eteričnim uljem m_2 . Iz razlike masa dobivena je masa eteričnog ulja te je izračunat maseni udio ulja u biljnom materijalu. Uzorci su se čuvali u hermetički zatvorenim bočicama u hladnjaku do analize.



Slika 10. Aparatura po Clevengeru

3.3. GC/MS i GC/FID analiza eteričnih ulja

GC/FID analiza rađena je na plinskom kromatografu Varian 3900 s plameno ionizacijskim detektorom FID i kapilarnom kolonom VF-5 ms (30 m × 0,25 mm debljina sloja adsorbensa 0,25 μm) sa stacionarnom fazom 5%-fenil-95%-dimetilpoliksilanom. Plin nositelj je vodik, protoka 1,2 mLmin⁻¹, injekcijski volumen je 1 μL, omjer cijepanja 1:10, temperatura injekcijskog bloka je 250° C.

GC/ MS analiza rađena je na sustavu Varian Saturn 2100 na kapilarnoj koloni VF-5 ms s istim temperaturnim programom kao i GC. Plin nositelj je helij, s linearnim vektorom 31,5 cm/s, omjerom cijepanja 1:60, ionizacijskom energijom 70 eV, temperaturom 280 °C i jedinicama mase 40-600 m/z.

Identifikacija je provedena usporedbom masenih spektara nepoznatih tvari s masenim spektrima iz komercijalne biblioteke masenih spektara (NIST/02, MS library) (41).

3.4. GC/MS i GC/FID analiza hidrolata

GC/FID analiza rađena je na plinskom kromatografu Varian 3900 s plameno ionizacijskim detektorom FID i kapilarnom kolonom VF-5 ms (30 m × 0,25 mm debljina sloja adsorbensa 0,25 μm) sa stacionarnom fazom 5%-fenil-95%-dimetilpoliksilanom (slika 11). Plin nositelj je vodik, protoka 1,2 mLmin⁻¹, injekcijski volumen je 1 μL, bez cijepanja, temperatura injekcijskog bloka je 250° C.

GC/ MS analiza rađena je na sustavu Varian Saturn 2100 na kapilarnoj koloni VF-5 ms s istim temperaturnim programom kao i GC. Plin nositelj je helij, s linearnim vektorom 31,5 cm/s, omjerom cijepanja 1:60, ionizacijskom energijom 70 eV, temperaturom 280 °C i jedinicama mase 40-600 m/z.

Identifikacija je provedena usporedbom masenih spektara nepoznatih tvari s masenim spektrima iz komercijalne biblioteke masenih spektara (NIST/02, MS library) (41).

Za svaki analizirani uzorak dobili smo:

- kromatogram ukupne ionske struje
- vrijeme zadržavanja svake komponente, koja je predstavljena pikom
- udio pojedine komponente izražen u postotcima, tj. udio površine pika u ukupnoj površini
- naziv spojava čiji spektar je najsličniji spektru nepoznate komponente, sličnosti spektara koji su uspoređivani izraženi su u postotcima.



Slika 11. GC/ FID i GC/MS

4. REZULTATI

4.1. Sastav eteričnih ulja i hidrolata

Izolacija eteričnih ulja i hidrolata iz listova osušene biljne vrste *Olea europaea* L. provedena je vodenom destilacijom u aparaturi po Clevenger-u. Dobiveni uzorci analizirani su sustavom plinske kromatografije – masene spektrometrije (GC/MS analiza) i plameno ionizacijskom kromatografijom (FID).

1. Uzorak

Datum sakupljanja: 12. 12. 2017.

Sastav eteričnog ulja:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 11 spojeva koji predstavljaju 78.3% sveukupnog ulja s postotkom ulja u 50 g suhog materijala od 0.1%. Spojevi zastupljeni u najvećem postotku su β -ionon (20.4%), palmitinska kiselina (19.9%) i α -ionon (18.5%) (tablica 1).

Sastav hidrolata:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 18 spojeva koji predstavljaju 75.7% sveukupnog hidrolata.

Spojevi zastupljeni u najvećem postotku su β -ionon (15.9%), miristicin (10.3%) i α -ionon (8.7%).

Tablica 1*. Fitokemijski sastav (%) eteričnog ulja i hidrolata (uzorak 1) listova vrste *Olea europaea* L.

Komponente	RI VF-5MS	% (ulje)	% (hidrolat)	Identifikacija
α -Pinen	935	-	6.2	RI, MS, Co-GC
β -Thujon	1121	-	7.1	RI, MS
Borneol	1176	-	1.2	RI, MS
Terpinen-4-ol	1184	-	0.7	RI, MS
Mirtenol	1197	-	1.4	RI, MS
γ -Terpineol	1200	-	3.6	RI, MS
β -Kariofilen	1424	0.3	-	RI, MS, Co-GC
α -Ionon	1427	18.5	8.7	RI, MS
β -Kopaen	1429	2.9	-	RI, MS
(Z)- β -Farnesen	1454	-	1.2	RI, MS
α -Humulen	1456	-	0.7	RI, MS
<i>allo</i> -Aromadendren	1465	5	-	RI, MS
Germakren D	1481	0.3	-	RI, MS
β -Ionon	1487	20.4	15.9	RI, MS
Miristicin	1520	-	10.3	RI, MS
Spatulenol	1577	-	0.4	RI, MS
Kariofilen oksid	1581	-	1.9	RI, MS, Co-GC
α -Kadinol	1655	0.6	-	RI, MS
Palmitinska kiselina	1959	19.9	2.7	RI, MS
Heneikosan	2100	0.2	-	RI, MS, Co-GC
Oleinska kiselina	2139	3.6	6.9	RI, MS
Dokosan	2200	6.6	4.8	RI, MS, Co-GC
Trikosan	2300	-	0.4	RI, MS, Co-GC
Tetrakosan	2400	-	0.6	RI, MS, Co-GC
Totalno identificirano (%)		78.3	75.7	
Iskorištenje (%)		0.1		

* RI = VF-5MS, RI identifikacija prema literaturi (Adams, 2007) i/ili prema našoj bazi podataka; MS = identificirani spojevi prema NIST02 i Wiley 7 bazi podataka; S = identifikacija pomoću referentnih spojeva, - = nije pronađeno.

2. uzorak

Datum sakupljanja: 06. 01. 2018.

Sastav eteričnog ulja:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 27 spojeva koji predstavljaju 88.8% sveukupnog ulja s postotkom ulja u 50 g suhog materijala od 0.1%. Spojevi zastupljeni u najvećem postotku su germakren D (31.2%) i miristicin (21.8%) (tablica 2).

Sastav hidrolata:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 13 spojeva koji predstavljaju 76.5% sveukupnog hidrolata.

Spojevi zastupljeni u najvećem postotku su β -ionon (40.3%) i n-dekanol (18.6%).

Tablica 2*. Fitokemijski sastav eteričnog ulja i hidrolata (uzorak 2) listova vrste *Olea europaea* L.

Komponente	RI VF-5MS	% (ulje)	(%) hidrolat	Identifikacija
α -Pinen	935	0.3	2.6	RI, MS, Co-GC
n-Dekanal	1201	-	3.9	RI, MS
n-Dekanol	1266	0.9	18.6	RI, MS
β -Elemen	1336	0.6	-	RI, MS
Eugenol	1370	0.3	-	RI, MS, Co-GC
β -Kariofilen	1424	2.8	-	RI, MS, Co-GC
α -Ionon	1427	0.6	-	RI, MS
β -Kopaen	1429	3.2	-	RI, MS
(Z)- β -Farnesen	1454	0.2	-	RI, MS
α -Humulen	1456	0.7	-	RI, MS
<i>allo</i> -Aromadendren	1465	2.9	0.3	RI, MS
Germakren D	1481	31.2	4.7	RI, MS
β -Ionon	1487	2.1	40.3	RI, MS
β -Bisabolen	1494	0.6	-	RI, MS
δ -Kadinen	1517	0.7	-	RI, MS
Miristicin	1520	21.8	1.1	RI, MS
Spatulenol	1577	0.3	-	RI, MS
Kariofilen oksid	1581	0.9	-	RI, MS, Co-GC
α -Kadinol	1655	0.7	-	RI, MS
Palmitinska kiselina	1959	0.9	-	RI, MS
Heneikosan	2100	0.2	-	RI, MS, Co-GC
Oleinska kiselina	2139	6.7	2.6	RI, MS
Dokosan	2200	4.5	0.6	RI, MS, Co-GC
Trikosan	2300	0.1	0.3	RI, MS, Co-GC
Tetrakosan	2400	0.4	0.6	RI, MS, Co-GC
Pentakosan	2500	1.5	0.4	RI, MS, Co-GC
Heksakosan	2600	2.9	0.5	RI, MS, Co-GC
Heptakosan	2700	0.8	-	RI, MS, Co-GC
Totalno identificirano (%)		88.8	76.5	
Iskorištenje (%)		0.1		

*RI = VF-5MS, RI identifikacija prema literaturi (Adams, 2007) i/ili prema našoj bazi podataka; MS = identificirani spojevi prema NIST02 i Wiley 7 bazi podataka; S = identifikacija pomoću referentnih spojeva, - = nije pronađeno.

3. uzorak

Datum sakupljanja: 03. 02. 2018.

Sastav eteričnog ulja:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 28 spojeva koji predstavljaju 88.4% sveukupnog ulja s postotkom ulja u 50 g suhog materijala od 0.1%.

Najzastupljeniji spojevi su *endo*-fenhil acetat (12.7%) i linalil acetat (11.2%) (tablica 3).

Sastav hidrolata:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 11 spojeva koji predstavljaju 77.6% sveukupnog hidrolata.

Najzastupljeniji spoj je β -ionon (42.8%).

Tablica 3*. Sastav eteričnog ulja i hidrolata (uzorak 3) listova vrste *Olea europaea* L.

Komponente	RI (VF-5MS)	% (ulje)	% (hidrolat)	Identifikacija
α -Pinen	935	-	1.3	RI, MS, Co-GC
Linalol	1099	9.3	-	RI, MS, Co-GC
<i>n</i> -Nonanal	1100	-	1.2	RI, MS
β -Thujon	1121	0.2	-	RI, MS
(E,Z)-2,6- Nonadienal	1150	-	3.3	
Borneol	1176	0.1	-	RI, MS
Terpinen-4-ol	1184	0.3	-	RI, MS
Mirtenol	1197	-	0.3	RI, MS
γ -Terpineol	1200	-		RI, MS
<i>endo</i> -Fenhil acetat	1218	12.7	2.7	RI, MS
Linalil acetat	1252	11.2	9.6	RI, MS
α -Kubeben	1345	10.5	-	RI, MS
β -Kubeben	1387	1.3	-	RI, MS, Co-GC
β -Kariofilen	1424	1.8	-	RI, MS, Co-GC
β -Kopaen	1429	2.2	-	RI, MS
α -Humulen	1456	0.7	-	RI, MS
<i>allo</i> -Aromadendren	1465	1.4	-	RI, MS
Germakren D	1481	4.7	-	RI, MS
β -Ionon	1487	1.2	42.8	RI, MS
β -Bisabolen	1494	0.6	-	RI, MS
δ -Kadinen	1517	0.7	-	RI, MS
Miristicin	1520	1.1	3.3	RI, MS
Spatulenol	1577	0.3	-	RI, MS
Kariofilen oksid	1581	0.9	-	RI, MS, Co-GC
Palmitinska kiselina	1959	2.9	0.2	RI, MS
Heneikosan	2100	0.2	-	RI, MS, Co-GC
Oleinska kiselina	2139	5.4	12.5	RI, MS
Dokosan	2200	7	3.2	RI, MS, Co-GC
Trikosan	2300	0.1	-	RI, MS, Co-GC
Tetrakosan	2400	3.4	-	RI, MS, Co-GC
Pentakosan	2500	1.5	-	RI, MS, Co-GC
Heksakosan	2600	2.9	-	RI, MS, Co-GC
Heptakosan	2700	3.8	-	RI, MS, Co-GC
Totalno identificirano (%)		88.4	77.6	
Iskorištenje (%)		0.1		

* RI = VF-5MS, RI identifikacija prema literaturi (Adams, 2007) i/ili prema našoj bazi podataka; MS = identificirani spojevi prema NIST02 i Wiley 7 bazi podataka; S = identifikacija pomoću referentnih spojeva, - = nije pronađeno.

4. uzorak

Datum sakupljanja: 14. 03. 2018.

Sastav eteričnog ulja:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 14 spojeva koji predstavljaju 95.5% sveukupnog ulja s postotkom ulja u 50 g suhog materijala od 0.04%.

Spojevi zastupljeni u najvećem postotku su dokosan (40.1%) i *allo*-aromadendren (23.9%) (tablica 4).

Sastav hidrolata:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 12 spojeva koji predstavljaju 76.6% sveukupnog hidrolata.

Spoj zastupljen u najvećem postotku je biciklogermakren (39.5%).

Tablica 4*. Fitokemijski sastav eteričnog ulja i hidrolata (uzorak 4) listova vrste *Olea europaea* L.

Komponente	RI VF-5MS	% (ulje)	% (hidrolat)	Identifikacija
α -Pinen	935	-	1.7	RI, MS, Co-GC
Z(2)-Nonenol	1162	-	3.7	RI, MS
3-Dekanon	1185	-	5.1	RI, MS
Linalil acetat	1252	-	9.9	RI, MS
Eugenol	1370	0.9	-	RI, MS, Co-GC
β -Kariofilen	1424	10.4	1.2	RI, MS, Co-GC
α -Ionon	1427	1.5	0.6	RI, MS
α -Humulen	1456	0.7	-	RI, MS
<i>allo</i> -Aromadendren	1465	23.9	-	RI, MS
Germakren D	1481	0.2	-	RI, MS
β -Ionon	1487	2.1	0.3	RI, MS
Biciklogermakren	1500	-	39.5	RI, MS
Miristicin	1520	1.1	0.2	RI, MS
Palmitinska kiselina	1959	1.1	-	RI, MS
Oleinska kiselina	2139	10.9	11.1	RI, MS
Dokosan	2200	40.1	3.1	RI, MS, Co-GC
Trikosan	2300	0.5	-	RI, MS, Co-GC
Tetrakosan	2400	1.2	-	RI, MS, Co-GC
Heptakosan	2700	0.9	0.2	RI, MS, Co-GC
Totalno identificirano (%)		95.5	76.6	
Iskorištenje (%)		0.04		

*RI = VF-5MS, RI identifikacija prema literaturi (Adams, 2007) i/ili prema našoj bazi podataka; MS = identificirani spojevi prema NIST02 i Wiley 7 bazi podataka; S = identifikacija pomoću referentnih spojeva, - = nije pronađeno.

5. uzorak

Datum sakupljanja: 14. 04. 2018.

Sastav eteričnog ulja:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 15 spojeva koji predstavljaju 88% sveukupnog ulja s postotkom ulja u 50 g suhog materijala od 0.2%.

Spoj prisutan u najvećem postotku je n-dodekanol (30.6%) (tablica 5).

Sastav hidrolata:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 19 spojeva koji predstavljaju 80.5% sveukupnog hidrolata.

Spojevi prisutni u najvećem postotku su β -ionon (25.3%) i miristicin (11.7%).

Tablica 5*. Fitokemijski sastav eteričnog ulja i hidrolata (uzorak 5) listova vrste *Olea europaea* L.

Komponente	RI VF-5MS	% (ulje)	% (hidrolat)	Identifikacija
α -Pinen	935	-	7.2	RI, MS, Co-GC
Linalol	1099	-	0.9	RI, MS, Co-GC
Mirtenol	1197	-	1.1	RI, MS
γ -Terpineol	1200	-	0.6	RI, MS
β -Elemen	1336	0.6	-	RI, MS
α -Kopaen	1374	13.7	3.5	RI, MS, Co-GC
β -Kariofilen	1424	1.2	-	RI, MS, Co-GC
α -Ionon	1427	0.7	9	RI, MS
β -Kopaen	1429	2.3	0.8	RI, MS
α -Humulen	1456	1.1	4.5	RI, MS
<i>allo</i> -Aromadendren	1465	3.7	-	RI, MS
n-Dodekanol	1469	30.6	-	RI, MS
β -Ionon	1487	3.2	25.3	RI, MS
β -Bisabolen	1494	-	0.7	RI, MS
δ -Kadinen	1517	-	1.2	RI, MS
Miristicin	1520	2.9	11.7	RI, MS
Kariofilen oksid	1581	-	0.6	RI, MS, Co-GC
Palmitinska kiselina	1959	0.7	7.6	RI, MS
Heneikosan	2100	-	0.3	RI, MS, Co-GC
Oleinska kiselina	2139	8.9	2.3	RI, MS
Dokosan	2200	13.4	1.1	RI, MS, Co-GC
Trikosan	2300	0.4	0.9	RI, MS, Co-GC
Tetrakosan	2400	4.6	1.2	RI, MS, Co-GC
Totalno identificirano (%)		88	80.5	
Iskorištenje (%)		0.2		

*RI = VF-5MS, RI identifikacija prema literaturi (Adams, 2007) i/ili prema našoj bazi podataka; MS = identificirani spojevi prema NIST02 i Wiley 7 bazi podataka; S = identifikacija pomoću referentnih spojeva, - = nije pronađeno.

6. uzorak

Datum sakupljanja: 14. 05. 2018.

Sastav eteričnog ulja:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 30 spojeva koji predstavljaju 75.3% sveukupnog ulja s postotkom ulja u 50 g suhog materijala od 0.08%.

Spojevi prisutni u najvećem postotku su kariofilen oksid (17.1%) i heptakosan (11.3%) (tablica 6).

Sastav hidrolata:

GC/MS analizom korištenom u ovom radu identificirano je 15 spojeva koji predstavljaju 85.1% sveukupnog hidrolata.

Spoj prisutan u najvećem postotku je miristicin (35%).

Tablica 6*. Fitokemijski sastav eteričnog ulja i hidrolata (uzorak 6) listova vrste *Olea europaea* L.

Komponente	RI (VF-5MS)	% (ulje)	% (hidrolat)	Identifikacija
α -Tujen	924	0.6	-	RI, MS
α -Pinen	935	0.3	2.6	RI, MS, Co-GC
Mircen	988	0.7	0.2	RI, MS
Linalol	1099	0.8	-	RI, MS, Co-GC
β -Thujon	1121	0.2	-	RI, MS
Borneol	1176	0.7	-	RI, MS
Terpinen-4-ol	1184	0.3	-	RI, MS
Mirtenol	1197	-	0.7	RI, MS
γ -Terpineol	1200	-	2.1	RI, MS
β -Elemen	1336	1.6	8.1	RI, MS
Eugenol	1370	1.3	7.4	RI, MS, Co-GC
β -Kariofilen	1424	2.8	-	RI, MS, Co-GC
α -Ionon	1427	-	3.2	RI, MS
β -Kopaen	1429	0.2	-	RI, MS
(Z)- β -Farnesen	1454	0.2	-	RI, MS
α -Humulen	1456	0.7	-	RI, MS
<i>allo</i> -Aromadendren	1465	2.9	-	RI, MS
Germakren D	1481	0.4	-	RI, MS
β -Ionon	1487	5.2	19.9	RI, MS
β -Bisabolen	1494	0.6	-	RI, MS
δ -Kadinen	1517	0.7	-	RI, MS
Miristicin	1520	1.1	35	RI, MS
Spatulenol	1577	0.3	0.4	RI, MS
Kariofilen oksid	1581	17.1	0.9	RI, MS, Co-GC
α -Kadinol	1655	2.4	1.2	RI, MS
Palmitinska kiselina	1959	3.2	1.9	RI, MS
Heneikosan	2100	0.2	-	RI, MS, Co-GC
Oleinska kiselina	2139	8.1	1.1	RI, MS
Dokosan	2200	5.2	0.4	RI, MS, Co-GC
Trikosan	2300	0.1	-	RI, MS, Co-GC
Pentakosan	2500	1.5	-	RI, MS, Co-GC
Heksakosan	2600	4.6	-	RI, MS, Co-GC
Heptakosan	2700	11.3	-	RI, MS, Co-GC
Totalno identificirano (%)		75.3	85.1	
Iskorištenje (%)		0.08		

*RI = VF-5MS, RI identifikacija prema literaturi (Adams, 2007) i/ili prema našoj bazi podataka; MS = identificirani spojevi prema NIST02 i Wiley 7 bazi podataka; S = identifikacija pomoću referentnih spojeva, - = nije pronađeno

5. RASPRAVA

List masline, iako nusproizvod u procesu branja i obrade maslina, bogat je izvor važnih bioaktivnih komponenti. Kvantitativni i kvalitativni sastav lišća varira u ovisnosti o različitim čimbenicima, a neki od njih su vrsta masline, podrijetlo, klimatski uvjeti te stupanj zrelosti lišća (14). Sastav i udio eteričnog ulja u biljkama mijenja se i ovisno o razvojnom stadiju biljne vrste, i to zbog različite aktivnosti biljnih enzima koji sudjeluju u biosintezi hlapljivih spojeva (42). Iz naših uzoraka eteričnih ulja i hidrolata smo u različitim razvojnim fazama masline, u šestomjesečnom razdoblju, izolirali različite spojeve.

U literaturi postoji mali broj informacija o kemijskom sastavu eteričnog ulja vrste *Olea europaea* L.

U prvom uzorku sakupljenom 12. 12. 2017. godine najzastupljeniji metaboliti u eteričnom ulju bili su β -ionon (20.4%), palmitinska kiselina (19.9%) i α -ionon (18.5%), a u hidrolatu β -ionon (15.9%), miristicin (10.3%) i α -ionon (8.7%) (tablica 1).

Iononi i njihovi derivati su spojevi široko rasprostranjeni u prirodi. Važne su komponente mnogih vrsta eteričnih ulja i nastaju iz karotenoida složenim enzimatskim procesima (43). β -ionon je metabolit najviše prisutan u našim uzorcima. Spoj je iz skupine apokarotenoida te je prisutan u plodovima i cvjetovima mnogih biljaka. U prirodi se dobiva specifičnim cijepanjem beta karotena, reakcijom koju katalizira enzim CCD1 koji cijepa dvostruke veze. Među različitim spojevima apokarotenoida, β -ionon se odlikuje snažnom aromom zbog čega se koristi u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, a također je ključni intermedijer u sintezi vitamina A, E i K (44). Drugi kvantitativno najzastupljeniji metabolit u prvom uzorku eteričnog ulja (19.9%) je palmitinska kiselina. Palmitinska kiselina je zasićena masna kiselina koju najčešće pronalazimo u biljkama, životinjama i mikroorganizmima (45). Jedna je od glavnih masnih kiselina koja tvori gotovo sve prirodne lipide. I u eukariotima i prokariotima formira različite klase lipida koji služe kao lipidna pozadina masti i ulja za pohranu, kao hidrofobni matriks staničnih membrana ili kao komponenta kutikularnih voskova i polimera. Stanica koristi palmitinsku kiselinu za regulaciju svog funkcionalnog stanja tako što mijenja fluidnost membrane ovisno o uvjetima okoline (46).

U prvom uzorku hidrolata nakon β -ionona drugi kvantitativno najzastupljeniji spoj je miristicin (10.3%). Miristicin ili metoksisafrol je fenil propanoid prisutan u mnogim eteričnim uljima. Pripada benzodioksolima, skupini organskih tvari koja sadrži benzenski prsten

povezan sa izomerima dioksola. Prirodni je insekticid i akaricid s mogućim neurotoksičnim učincima na dopaminergične neurone, ali pri velikim dozama (47). Miristicin djeluje na 5-HT receptore u mozgu i pokazano je da posjeduje hipotenzivni, sedativni, antidepresivni, anestetski i halucinogeni učinak. Velike doze općenito dovode do hiperekscitabilnosti te do depresije središnjeg živčanog sustava (48). Miristicin posjeduje širok spektar bioloških aktivnosti uključujući i antiinflamatorne, antikancerogene i kemoprotektivne učinke (49). Sadržaj u biljnim organima mu varira ovisno o uvjetima uzgoja i skladištenja biljke (50). Miristicin je uz germakren D najzastupljeniji spoj našeg drugog uzorka eteričnog ulja prikupljenog 06. 01. 2018. godine. Germakren D je prisutan u količini od 31.2%, a miristicin u količini od 21.8%. Najzastupljeniji sastojci istog uzorka hidrolata su β -ionon (40.3%) i n-dekanol (18.6%) (tablica 2).

Germakreni su gorki seskviterpeni koji posjeduju antimikrobna i insekticidna svojstva, a proizvodi ih velik broj biljaka. Postoji 4 tipa germakrena, od kojih većina može postojati u obliku enantiomera. Jedan od njih je i germakren D, seskviterpen koji vrlo selektivno djeluje na neurone kukaca i koji se značajno ističe među nizom sličnih spojeva (51). Općenito je zapaženo da eterična ulja koja sadrže germakren D u visokim koncentracijama obično sadrže i seskviterpene tipa kadinana i murolana te se smatra da je germakren D biogenetski prekursor velikog broja različitih seskviterpena. Bülow i König su pokazali da germakren D podliježe kiseloj katalitičkoj ciklizaciji kojom nastaju seskviterpeni kadinana, murolana i amorfana. Štoviše, smatra se da do preslagivanja u skeletu dolazi i tijekom hidrodestilacije kojom se izoliraju eterična ulja (52). U našem uzorku smo uz germakren D izolirali i derivate kadinana, δ -kadinen (0.7%) i α -kadinol (0.7%). Jedan od metabolita iz ove skupine je i biciklogermakren kojeg smo izolirali iz jednog od uzoraka hidrolata. U ovom uzorku hidrolata najbrojniji spoj je n-dekanol (18.6%) koji je ravnolančani masni alkohol sa deset ugljikovih atoma.

Najzastupljeniji metaboliti u trećem uzorku eteričnog ulja prikupljenom 03. 02. 2018. bili su *endo*-fenhil acetat (12.7%) i linalil acetat (11.2%), a u uzorku hidrolata β -ionon (42.8%) (tablica 3).

Linalil acetat je racemat koji sadrži ekvimolarne količine (R) i (S)-linalil acetata. Glavna je komponenta eteričnih ulja bergamota i lavande, a koristi se kao agens okusa te posjeduje antimikrobna svojstva.

Najzastupljeniji metabolit u četvrtom uzorku eteričnog ulja prikupljenom 14. 03. 2018. je dokosan, metabolit iz skupine acikličkih alkana (40.1 %), a u uzorku hidrolata biciklogermakren (39.5 %) (tablica 4), spoj iz skupine germakrena spomenutih ranije. U petom uzorku eteričnog ulja prikupljenom 14. 04. 2018. najbrojniji spoj je n-dodekanol (30.6%), masni alkohol sa 12 ugljikovih atoma (53), a u uzorku hidrolata β -ionon (25.3%) i miristicin (11.7%) (tablica 5).

Kariofilen oksid je spoj iz skupine bicikličkih seskviterpena. Predstavlja najbrojniji spoj (17.1%) (tablica 6) u šestom uzorku eteričnog ulja prikupljenom 14. 05. 2018. β -kariofilen oksid pronalazimo u eteričnim ulja raznih biljaka koje se koriste u medicinske svrhe te u mnogim jestivim biljkama, a koristi se i kao agens okusa. Ima strukturu epoksida, koji su inače nestabilni spojevi te mogu formirati kovalentne adukte sa staničnim makromolekulama (54). Spoj je nisko topljiv u vodi te vodeni mediji kao što su biološke tekućine sprječavaju njegovu apsorpciju na stanicu. Kakogod, pokazalo se da kariofilen oksid ulazi u interakciju s umjetnim lipidnim dvoslojem što snažno sugerira njegov visoki afinitet prema staničnoj membrani (55). Najbrojniji spoj iz istog uzorka hidrolata je miristicin (35%).

Uspoređujući međusobno naših 6 uzoraka listova (u kojima smo gledali pojavljuje li se metabolit ili u et. ulju ili hidrolatu svakog od uzoraka) metaboliti koji se ponavljaju u svim uzorcima su: β -ionon, miristicin, α -pinen, β -kariofilen, α -humulen, *allo*-aromadendren, palmitinska kiselina, oleinska kiselina, dokosan, trikosan i tetrakosan.

α -pinen, β -kariofilen, α -humulen i *allo*-aromadendren su spojevi iz skupine terpena. α -pinen je biciklički monoterpen, jedan od dva izomera pinena. Alken je koji sadrži reaktivni četveročlani prsten. Nalazi se u eteričnim uljima mnogih vrsta crnogoričnih stabala, a posebice borova. Pokusi sa sintetičkim standardima (+) i (-) enantiomera α -pinena pokazali su njihove različite biološke učinke. Različit sastav enantiomera α -pinena direktno ili indirektno može biti razlog različite bioaktivnosti putem sinergističkog ili antagonističkog učinka sa drugim sastojcima eteričnog ulja (56). α -pinen djeluje insekticidno, spazmolitički, antikolinergično, a pokazalo se i da posjeduje antistresni potencijal. Također je poznat i po svojoj antioksidativnoj aktivnosti (57).

β -kariofilen je biciklički seskviterpen koji se nalazi u mnogim vrstama eteričnih ulja. Često se nalazi u kombinaciji sa izokariofilenom i α -humulenom, koji je izomer β -kariofilena sa otvorenim prstenom. α -humulen je pronađen sa β -kariofilenom u svim našim uzorcima. β -kariofilen je karakterističan po tome što u svojoj strukturi ima i ciklobutanski prsten i *trans*-

dvostruku vezu u deveteročlanom prstenu, što su rijetkosti u prirodi (58). Posjeduje antimikrobna, antiinflamatorna, antioksidativna i antikancerogena svojstva, a također poboljšava penetraciju kroz kožu (59). Kao i β -kariofilen, i njegov izomer α -humulen posjeduje snažnu antiinflamatornu aktivnost, kako topičku tako i sistemsku, a osim toga djeluje i analgetski te ima antineoplastični učinak (60).

Oleinska kiselina je najviše rasprostranjena nezasićena masna kiselina u prirodi. Pripada omega-9 masnim kiselinama i prisutna je u gotovo svim lipidima. Glavna je masna kiselina prisutna u maslinovom ulju koje se dobiva iz zrelih plodova masline, ali je prisutna i u većini drugih jestivih ulja (61). Oleinska kiselina nastaje u plastidima desaturacijom stearinske kiseline, koja nastaje iz palmitinske kiseline, a dalje se može konvertirati u linolnu i linolensku kiselinu (62). Palmitinska kiselina je uz oleinsku kiselinu identificirana u svim našim uzorcima.

Dokosan, trikosan i tetrakosan su ravnolančani alkani od kojih dokosan sadrži 22 ugljikova atoma, trikosan 23 a tetrakosan 24.

Važni specijalizirani metaboliti spomenuti u ovom radu su i fenolni spojevi, od kojih je najvažniji oleuropein. Oleuropein je spoj koji se iz listova masline izolira na drugačiji način od vodene destilacije kojom smo izolirali eterična ulja i hidrolate. Oleuropein je glikozid koji se kiselom ili enzimskom hidrolizom razgrađuje na elenolnu kiselinu i glukozu. Najčešće korištena metoda izolacije fenolnih spojeva iz listova masline prihvaćena od većine istraživača je ekstrakcija otapalom. Još neke od metoda su ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija mikrovalovima te superkrična fluidna ekstrakcija (63).

Ovim diplomskim radom smo ukazali na važnost različitih tehnika izolacije specijaliziranih metabolita pri čemu se identificiraju i različite skupine aktivnih komponenti važnih za farmakološku primjenu. Analizom hidrolata, koji se često odbacuju nakon procesa vodene destilacije ljekovitih biljaka, dokazujemo da se i u vodenom dijelu izdvajaju aktivne komponente pa bi se buduća istraživanja mogla temeljiti na analizi biološkog djelovanja, kako eteričnih ulja lista masline, tako i hidrolata nastalih procesom izolacije ulja.

6. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada ispitivan je kemijski sastav eteričnih ulja i hidrolata listova masline koji su sakupljeni jednom mjesečno u razdoblju od 12.12.2017. do 14.06.2018. godine sa istog stabla masline. Usporedbom njihovog sastava utvrđeno je da se od zimskog razdoblja do faze cvatnje masline u listovima pojavljuju različiti metaboliti. Metaboliti koji se pojavljuju u svim uzorcima su α -pinen, β -kariofilen, α -humulen, *allo*-aromadendren, palmitinska kiselina, oleinska kiselina, dokosan, trikosan i tetrakosan.

GC/MS analizom prvog uzorka eteričnog ulja sakupljenog 12.12.2017. identificirano je 11 spojeva od kojih je u najvećem postotku prisutan β -ionon (20.4%). Analizom hidrolata identificirano je 18 spojeva, a spoj prisutan u najvećem postotku je također β -ionon (15.9%).

GC/MS analizom drugog uzorka eteričnog ulja sakupljenog 06.01.2018. identificirano je 27 spojeva, a spoj prisutan u najvećem postotku je germakren D (31.2%). Analizom hidrolata identificirano je 13 spojeva, a spoj prisutan u najvećem postotku je β -ionon (40.3%).

GC/MS analizom trećeg uzorka eteričnog ulja sakupljenog 03.02.2018. identificirano je 28 spojeva, a spoj prisutan u najvećem postotku je *endo*-fenhil acetat (12.7%). Analizom hidrolata identificirano je 11 spojeva, a najzastupljeniji spoj je β -ionon (42.8%).

GC/MS analizom četvrtog uzorka eteričnog ulja sakupljenog 14.03.2018. identificirano je 14 spojeva od kojih je u najvećem postotku prisutan dokosan (40.1%). Analizom hidrolata identificirano je 12 spojeva, a najzastupljeniji spoj je biciklogermakren (39.5%).

GC/MS analizom petog uzorka eteričnog ulja sakupljenog 14.04.2018. identificirano je 15 spojeva od kojih je u najvećem postotku prisutan n-dodekanol (30.6%). Analizom hidrolata identificirano je 19 spojeva, a najzastupljeniji spoj je β -ionon (25.3%),

GC/MS analizom šestog uzorka eteričnog ulja sakupljenog 14.05.2018. identificirano je 30 spojeva od kojih je u najvećem postotku prisutan kariofilen oksid (17.1%). Analizom hidrolata identificirano je 15 spojeva, a najzastupljeniji spoj je miristicin (35%).

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. *Olea europaea* L. [Internet]. Plants of the World Online; 2018 [citirano 2018 Oct 26]. Dostupno na: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:610675-1>
2. Parvaiz M, Hussain K, Shoaib M, Hussain Z, Gohar D, Imtiaz S. A Review: Therapeutic Significance of Olive *Olea europaea* L. (Oleaceae Family). *Global Journal of Pharmacology*. 2018;7(3):333-6.
3. Guerrero Maldonado N, Javier López M, Caudullo G, de Rigo D. *Olea europaea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats [Internet]. ResearchGate; 2018 [citirano 2018 Oct 26]. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/299470438_Olea_europaea_in_Europe_distribution_habitat_usage_and_threats
4. *Olea europaea* subsp. *europaea* (European olive) [Internet]. Invasive Species Compendium; 2018 [citirano 2018 Oct 26]. Dostupno na: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/37336>
5. Strikić F, Gugić J, Klepo T. Stanje hrvatskog maslinarstva. *Glasilo biljne zaštite*. 2012;12:271-6.
6. *Olea europaea* [Internet]. Encyclopedia of life; 2018 [citirano 2018 Oct 26]. Dostupno na: <http://eol.org/pages/579181/literature>
7. Bartolini G, Petruccelli R. Classification, origin, diffusion and history of the olive [Internet]. Rome: FAO; 2002 [citirano 2018 Oct 26]. Dostupno na: https://books.google.hr/books?id=yOiNU2e0uhoC&printsec=frontcover&hl=hr&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
8. Barbulova A, Colucci G, Apone F. New Trends in Cosmetics: By-Products of Plant Origin and Their Potential Use as Cosmetic Active Ingredients. *Cosmetics*. 2015;2(2): 82-92.
9. Covas MI, De la Torre R, Fitó M. Scientific evidence of the benefits of virgin olive oil for human health. *Medicina Balear*. 2014;29(2):39-46.
10. Vogel P, Kasper Machado I, Garaviglia J, Zani VT, de Souza D, Morelo Dal Bosco S. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutr Hosp*. 2014;31(3):1427-33.
11. Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M. Olive Tree (*Olea europaea* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants (Basel)*. 2015;4(4):682–98.

12. Sito S, Dovečer S, Borić V, Ploh M, Borić M. Uređaji i oprema za proizvodnju čaja od maslinovog lista [Internet]. Glasnik Zaštite Bilja. 2015 [citirano 2018 Oct 27];38(6):28-32. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/162323>
13. Sabry O. Review: Beneficial Health Effects of Olive Leaves Extracts. J Natur Sci Res. 2014;4(19):1-9.
14. Sahin S, Bilgin M. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. J Sci Food Agric. 2018;98(4):1271-9.
15. Boss A, Bishop KS, Marlow G, Barnett MPG, Ferguson LR. Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. Nutrients. 2016; 8(8):513.
16. Tiwari R, Rana C. Plant secondary metabolites: a review. Int J Eng Res Gen Sci. 2015;3(5):661-70.
17. Bennett RN, Wallsgrave RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist. 1994; 127:617-33.
18. Compean KL, Ynalvez RA. Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. Res J Med Plant. 2014;8(5):204-13.
19. Pevalek – Kozlina B. Fiziologija bilja. Zagreb: Profil; 2003.
20. Guerriero G, Berni R, Muñoz-Sanchez JA, Apone F, Abdel-Salam EM, Qahtan AA, Alatar AA, Cantini C, Cai G, Hausman JF, Siddiqui KS, Hernández-Sotomayor SMT, Faisal M. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. Genes (Basel). 2018;9(6):309.
21. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in Human Diet. Blackwell; 2006.
22. Omar SH. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. Sci Pharm. 2010;78(2):133–54.
23. Hassen I, Casabianca H, Hosni K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. J Funct Foods. 2015;18:926-40.
24. Vasireddy L, Bingle LEH, Davies MS. Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the Burkholderia cepacia complex. PLoS One. 2018;13(8):e0201835.
25. Mejri J, Aydid Abdelkarim, Abderrabbab M, Mejrjic M. Emerging extraction processes of essential oils: A review. Chem Asian J. 2018;2:246-67.

26. Ali B, Al-Wabel NA, Shams S, Ahamad A, Khan SA, Anwar F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(8):601-11.
27. McGarvey DJ, Croteau R. Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell* 1995;7:1015-26.
28. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products.* 2014;62:250-64.
29. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines (Basel).* 2016;3(4):25.
30. Shaaban HAE, El-Ghorab A, Shibamoto T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. [Internet]. *Journal of Essential Oil Research.* 2012 [citirano 2018 Oct 28]. Dostupno na: <https://www.scribd.com/document/253068084/Bioactivity-of-Essential-Oils-and-Their-Volatile-Aroma-Components-Review>
31. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemoter.* 2001;47(5):565-73.
32. Mejri J, Aydib A, Abderrabbab M, Mejrjic M. Emerging extraction processes of essential oils: A review [Internet]. *Asian Journal of Green Chemistry.* 2018 [citirano 2018 Oct 28]. Dostupno na: http://www.ajgreenchem.com/article_61443_b02530a2e89cd27bda2c4f11b5a083bf.pdf
33. Stratakos AC, Koidis A. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety [Internet]. Academic Press; 2016. Chapter 4; Methods for Extracting Essential Oils [citirano 2018 Oct 28]; p. 31-8. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124166417000043>
34. Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res.* 2004;18(6):435-48.
35. Petričić J. *Vježbe iz farmakognozije I.* Zagreb: Sveučilišna naklada Liber; 1980.
36. Maimone TJ, Baran PS. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nat Chem Biol.* 2007;3(7):396-407.
37. Wagner H. *Pharmazeutische Biologie.* 5th rev. Stuttgart – New York: Gustav Fischer verlag; 1993.
38. Mann J, Davidson RS, Hobbs JB, Banthorpe DV, Banthorpe JB, Harborne JB. *Natural products.* Harlow: Longman; 1994.

39. Gershenzon J, McConkey ME, Croteau RB. Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. *Plant Physiology*. 2000;122(1):205-14.
40. Dewick PM. *Medicinal Natural Products*. 3rd ed. Wiltshire: Wiley; 2009.
41. Adams R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed, IL, Allured Publishing Co, Carol Stream; 2007.
42. Bego G.V. *Discover What's Essential About Essential Oils*. Jakin: Lausanne; 1995.
43. Yamazaki Y, Hayashi Y, Arita M, Hieda T, Mikami Y. Microbial Conversion of α -Ionone, α -Methylionone, and α -Isomethylionone. *Appl Environ Microbiol*. 1988; 54(10):2354–60.
44. Lopez J, Essus K, Kim I, Pereira R, Herzog J, Siewers V, Nielsen J, Agosin E. Production of β -ionone by combined expression of carotenogenic and plant *CCD1* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2015; 14:84.
45. Team E. hexadecanoic acid (CHEBI:15756) [Internet]. Ebi.ac.uk. 2018 [citirano 2018 Nov 25]. Dostupno na: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=15756>
46. Sidorov RA, Zhukov AV, Pchelkin VP, Tsydendambaev V. Palmitic Acid: Occurrence, Biochemistry and Health Effects [Internet]. NOVA Publishers:2014. Chapter 6, Palmitic Acid in Higher Plant Lipids; p. 125-43. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/264551796_Palmitic_Acid_in_Higher_Plant_Lipids
47. Showing Compound Myristicin (FDB014654) - FooDB [Internet]. Foodb.ca. 2018 [citirano 2018 Nov 25]. Dostupno na: <http://foodb.ca/compounds/FDB014654>
48. Fidyk K, Fiedorowicz A, Strzdała L, Szumny A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer medicine*. 2016;5(10):3007-17.
49. Chehrazimeydan M, Asgarpanah J. Essential oil chemical compositions of the fruit and seeds of the endemic species *Pycnocycla Bashagardiana* Mozaff. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2015;60(3):3038-9.
50. Sudradjat S, Timotius K, Mun'im A, Anwar E. The Isolation of Myristicin from Nutmeg Oil by Sequences Distillation. *Journal of Young Pharmacists*. 2018;10(1):20-3.
51. MetaCyc germacrene biosynthesis [Internet]. Biocyc.org. 2018 [citirano 2016 Nov 26]. Dostupno na: <https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5733>

52. Setzer W. Germacrene D Cyclization: An Ab Initio Investigation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008;9(1):89-97.
53. The PubChem Project [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [citirano 2018 Nov 27]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
54. Di Sotto A, Maffei F, Hrelia P, Castelli F, Sarpietro M, Mazzanti G. Genotoxicity assessment of β -caryophyllene oxide. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2013;66(3):264-8.
55. NCATS Inxight: Drugs — MYRISTICIN [Internet]. Drugs.ncats.io. 2018 [citirano 2018 Nov 27]. Dostupno na: <https://drugs.ncats.io/drug/04PD6CT78W>
56. Ložienė K, Švedienė J, Paškevičius A, Raudonienė V, Sytar O, Kosyan A. Influence of plant origin natural α -pinene with different enantiomeric composition on bacteria, yeasts and fungi. *Fitoterapia*. 2018; 127:20-4.
57. Haloui E, Marzouk Z, Marzouk B, Bouftira I, Bouraoui A, Fenina N. Pharmacological activities and chemical composition of the *Olea europaea* L. leaf essential oils from Tunisia. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2010;8(2):204-8.
58. Caryophyllene [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [citirano 2018 Dec 3]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-caryophyllene#section=Top>
59. Viveros-Paredes J, González-Castañeda R, Gertsch J, Chaparro-Huerta V, López-Roa R, Vázquez-Valls E Et al. Neuroprotective Effects of β -Caryophyllene against Dopaminergic Neuron Injury in a Murine Model of Parkinson's Disease Induced by MPTP. *Pharmaceuticals*. 2017;10(4):60.
60. Hartsel J, Eades J, Hickory B, Makriyannis A. Cannabis sativa and Hemp. *Nutraceuticals*. 2016:735-54.
61. Choi S, Won S, Rhee H. Oleic Acid and Inhibition of Glucosyltransferase. Academic Press: 2010. Chapter 153, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention; p. 1375-83.
62. Sidorov R, Tsydendambaev V. Biosynthesis of fatty oils in higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2013;61(1):1-18.
63. Extraction Of Antioxidant Compounds From Olive (*Olea europaea*) Leaf. [Internet]. Mro.massey.ac.nz. 2018 [citirano 2018 Nov 27]. Dostupno na: https://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/3481/02_whole.pdf

8. SAŽETAK

Maslina (*Olea europaea* L.) je jedna od glavnih poljoprivrednih kultura mediteranskog područja. Uzgaja se ponajprije zbog maslinovog ulja koje je poznato po brojnim pozitivnim učincima na zdravlje, no otkriveno je da je i lišće masline također bogat izvor komponenti s farmakološkim učinkom. Tvari koje imaju najveći učinak na zdravlje su fenolni spojevi, kojih u listovima masline ima u većoj količini nego u plodu masline. U ovom radu smo uspoređivali kvalitativni i kvantitativni sastav hlapljivih komponenti listova masline u različitim razvojnim fazama masline, u razdoblju od 6 mjeseci. Vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru smo iz nekoliko uzoraka listova masline izolirali eterična ulja i hidrolate te ih identificirali GC/MS analizom. Ovisno o vremenu branja izolirali smo različite metabolite. U uzorcima eteričnih ulja najzastupljeniji spojevi su se kvalitativno i kvantitativno mijenjali od prvog do zadnjeg uzorka: u prvom uzorku najzastupljeniji spoj je bio β -ionon (20.4%) među 11 izoliranih spojeva, u drugom germakren D (31.2%) od 27 izoliranih spojeva, u trećem *endo*-fenhil acetat (12.7%) od 28 izoliranih spojeva, u četvrtom dokosan (40.1%) od 14 izoliranih spojeva, u petom n-dodekanol (30.6%) od 15 izoliranih spojeva i u šestom kariofilen oksid (17.1%) od 30 izoliranih spojeva. U uzorcima hidrolata najzastupljeniji spoj u većini uzoraka bio je β -ionon: u prvom uzorku u količini od 15.9% među 18 izoliranih spojeva, u drugom uzorku u količini od 40.3% među 13 izoliranih spojeva, u trećem uzorku u količini od 42.8% među 11 izoliranih spojeva; u četvrtom uzorku najzastupljeniji spoj bio je biciklogermakren (39.5%) među 12 izoliranih spojeva, u petom β -ionon (25.3%) među 19 izoliranih spojeva i u šestom najzastupljeniji je bio miristicin (35%) među 15 izoliranih spojeva. Spojevi koje smo izolirali u svim uzorcima listova, ili u eteričnom ulju ili hidrolatu su: α -pinen, β -kariofilen, α -humulen, *allo*-aromadendren, β -ionon, miristicin, palmitinska kiselina, oleinska kiselina te dokosan, trikosan i tetrakosan.

9. SUMMARY

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the main agricultural crops of the Mediterranean area. It is cultivated primarily for olive oil which is known for its many positive effects on health, but it has been discovered that olive leaves are also a rich source of components with a pharmacological effect. Substances that have the greatest effect on health are phenolic compounds, which in olive leaves are found in much greater quantity than in olive fruit. In this paper we were comparing the qualitative and quantitative composition of volatile components of olive leaves in different life stages of olive, in a period of 6 months. By aqueous distillation in Clevenger's apparatus, we isolated essential oils and hydrolates from several olive leaf samples and identified them by GC / MS analysis. Depending on the time of harvest we isolated different metabolites. In the samples of essential oils the most common compounds varied qualitatively and quantitatively from the first to the last sample: in first sample the most common compound was β -ionone (20.4%) among 11 isolated compounds, in second sample germacrene D (31.2%) of 27 isolated compounds, in third *endo*-fenchyl acetate (12.7%) of 28 isolated compounds, in fourth docosane (40.1%) of 14 isolated compounds, in fifth n-dodecanol (30.6%) of 15 isolated compounds and in sixth caryophyllene oxide (17.1%) of 30 isolated compounds. In hydrolate samples, the most common compound in most of the samples was β -ionone: in first sample in the amount of 15.9% among 18 isolated compounds, in second sample in the amount of 40.3% among the 13 isolated compounds, in third sample in the amount of 42.8% among 11 isolated compounds; in fourth sample the most common compound was bicyclogermacrene (39.5%) among 12 isolated compounds, in fifth β -ionone (25.3%) among 19 isolated compounds and in sixth the most representative was myristicin (35%) among 15 isolated compounds. The compounds that we isolated from all leaf samples, either from essential oil or hydrolate are: α -pinene, β -caryophyllene, α -humulene, *allo*-aromadendrene, β -ionone, myristicin, palmitic acid, oleic acid and docosane, tricosane and tetracosane.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Tina Miletić

Datum rođenja: 06. 06. 1994.

Mjesto rođenja: Zadar

Državljanstvo: hrvatsko

e-mail: tinamilet@gmail.com

OBRAZOVANJE:

Osnovna škola: OŠ Jurja Barakovića, Ražanac (2001.-2009.)

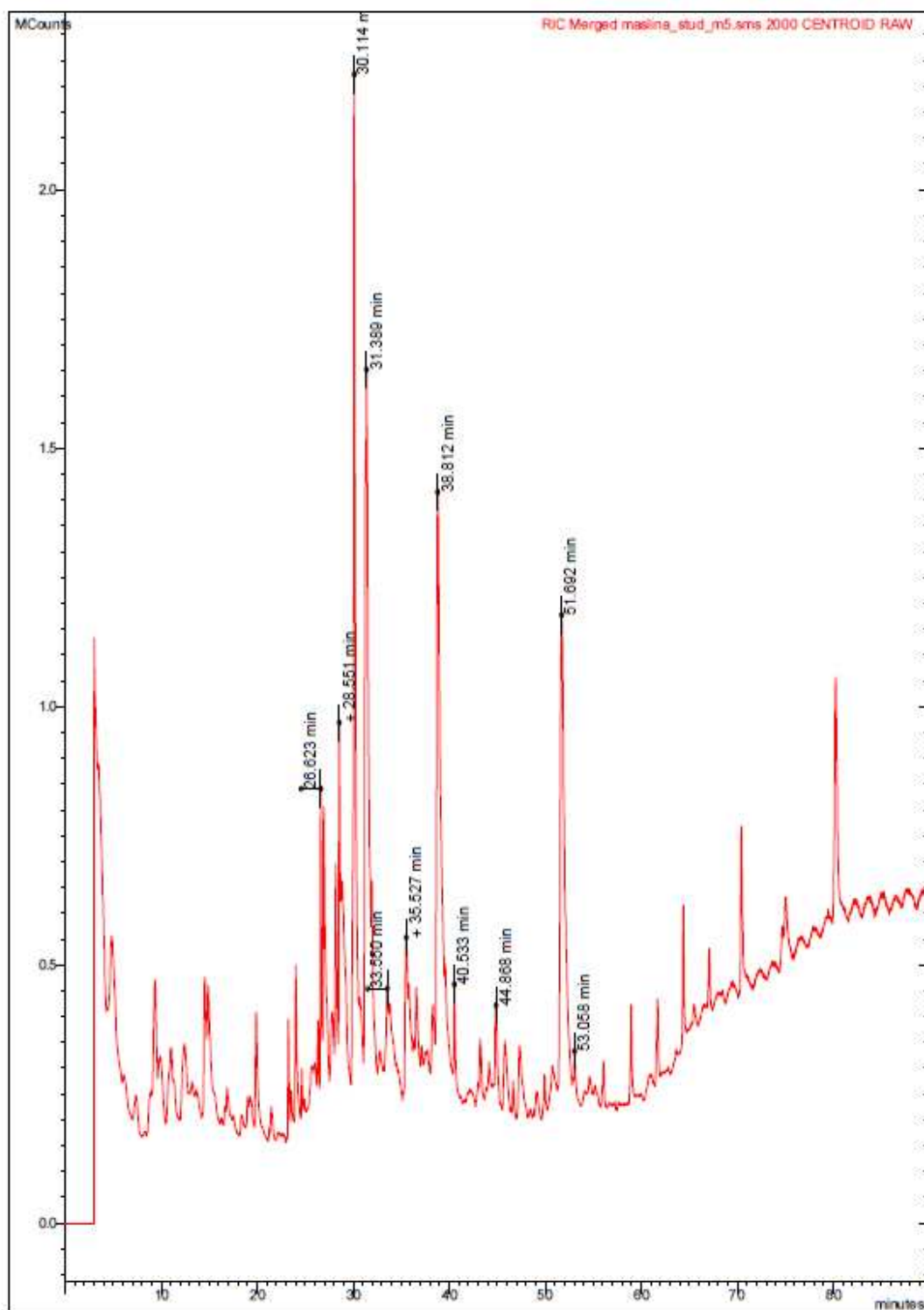
Srednja škola: Gimnazija Jurja Barakovića, opći smjer (2009.-2013.)

Fakultet: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA (2013.-2018.)

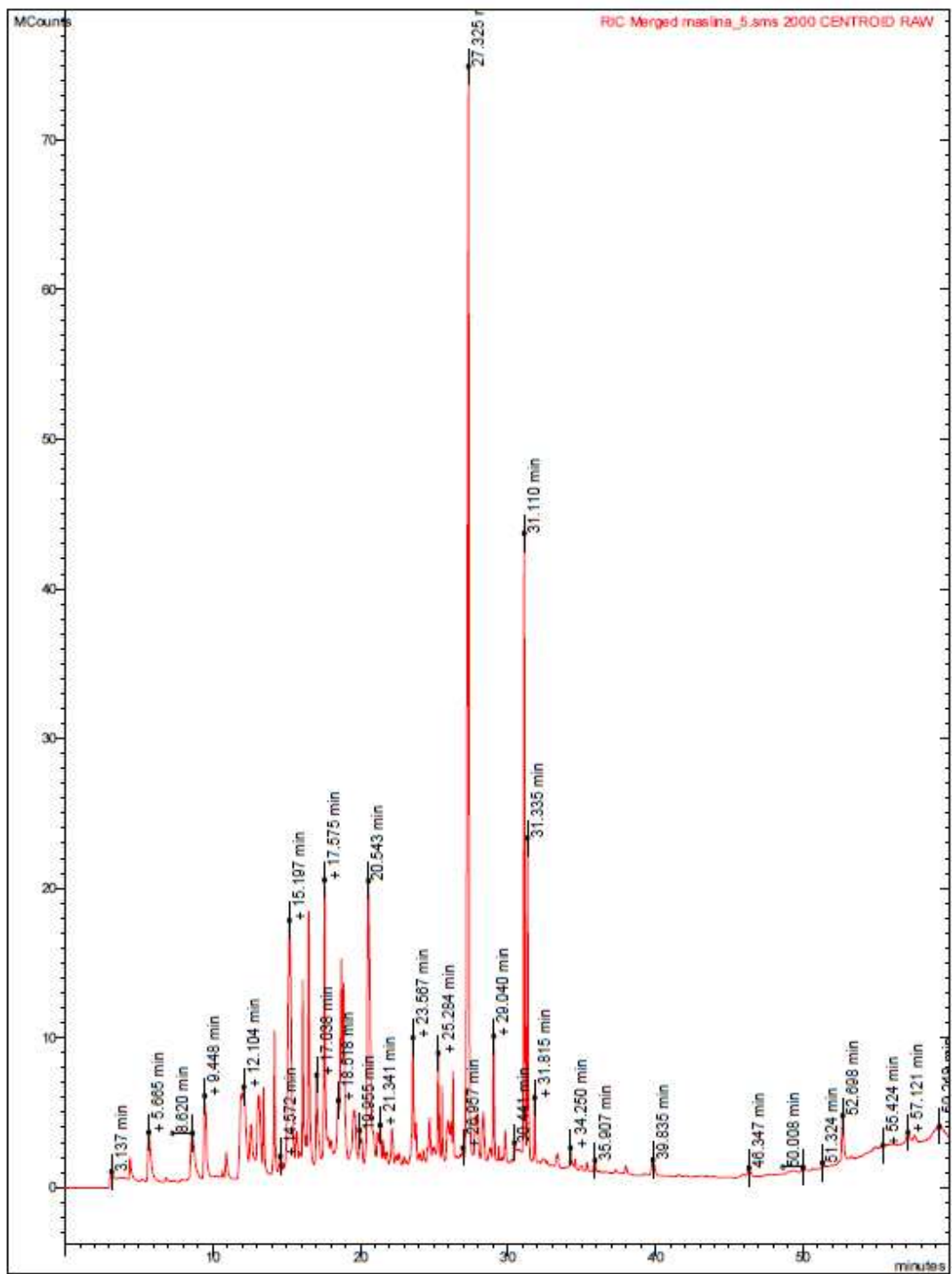
STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:

Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije; ljekarna Sućidar-Pujanke

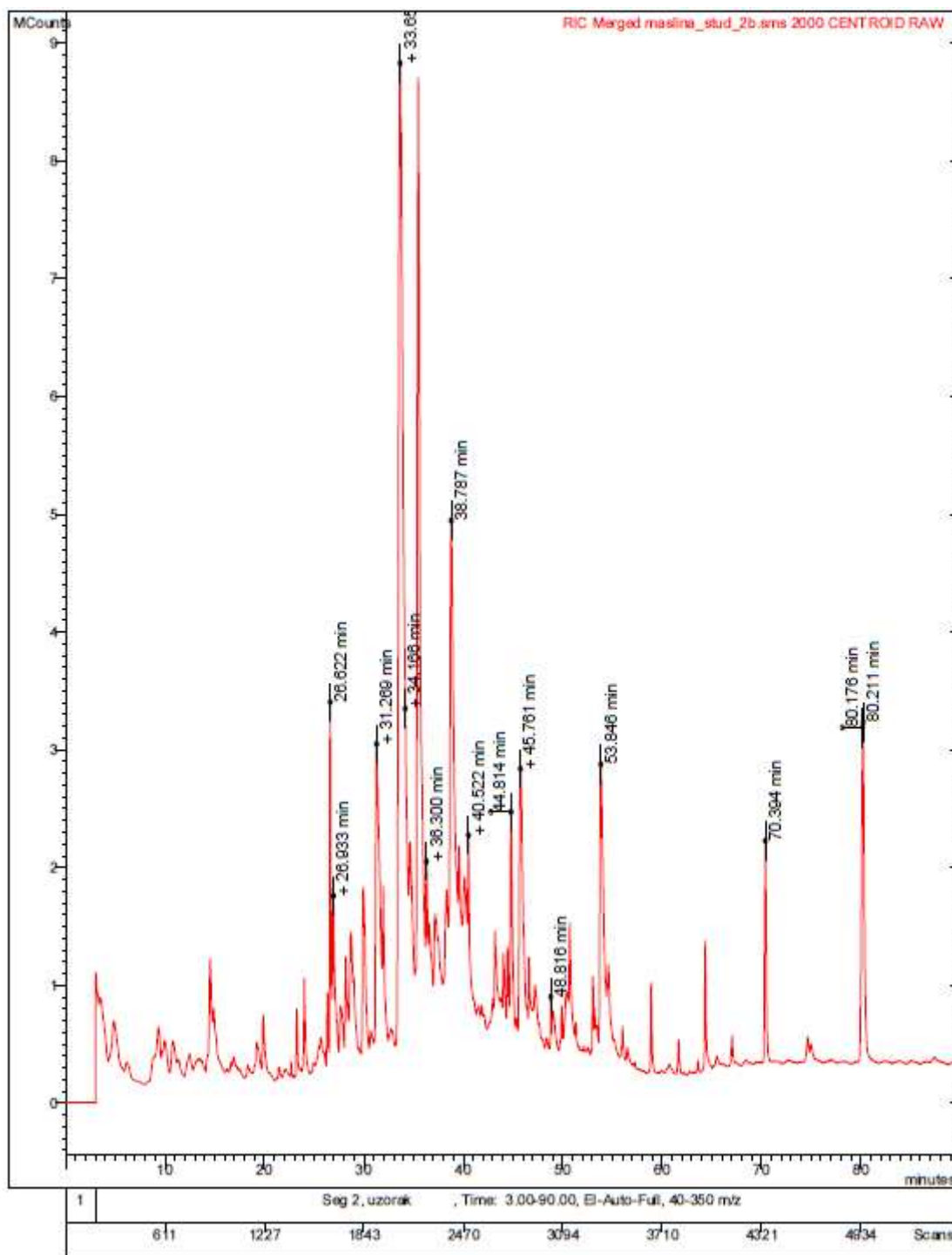
11. PRILOZI



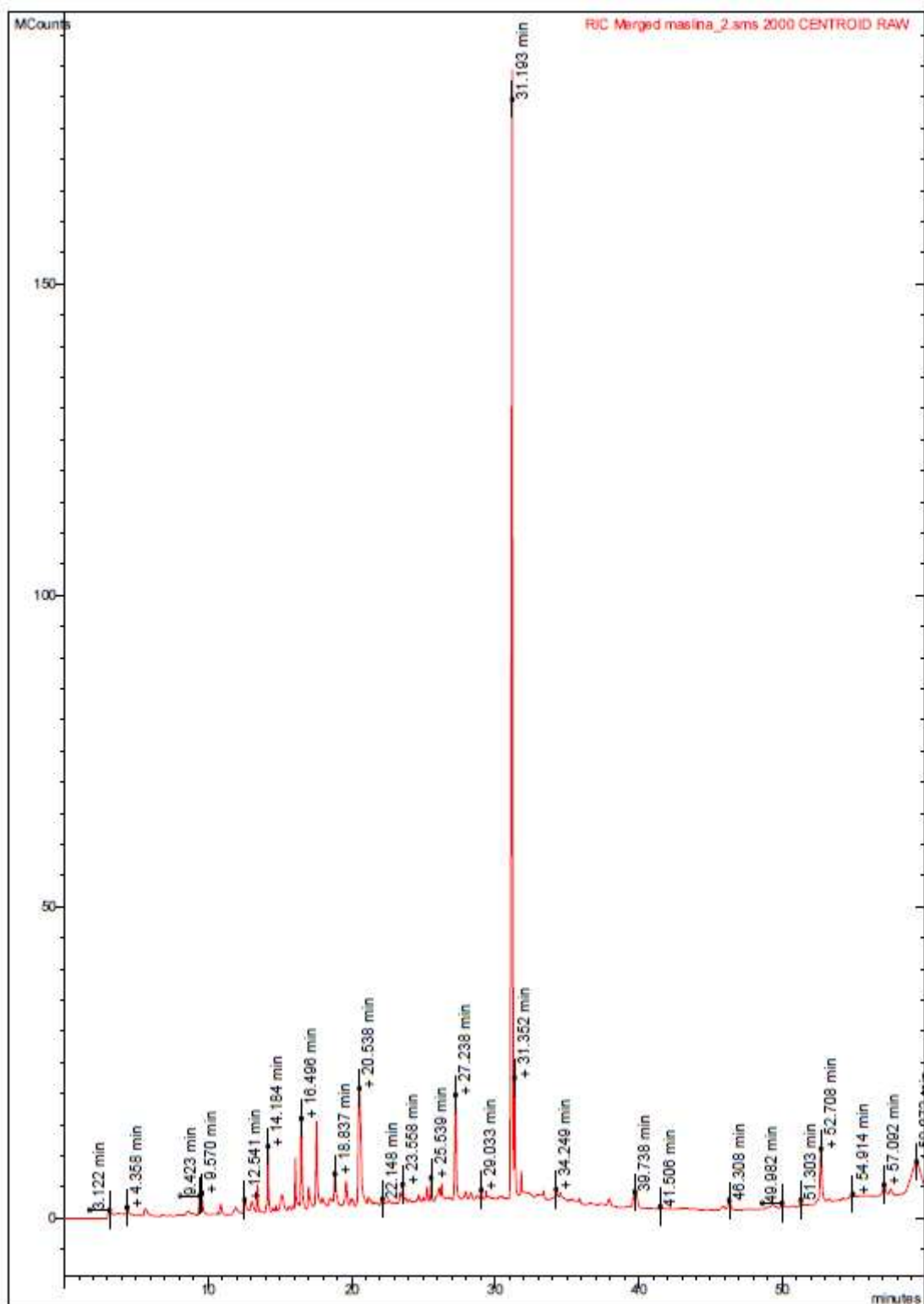
Slika 12. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje (uzorak 1) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



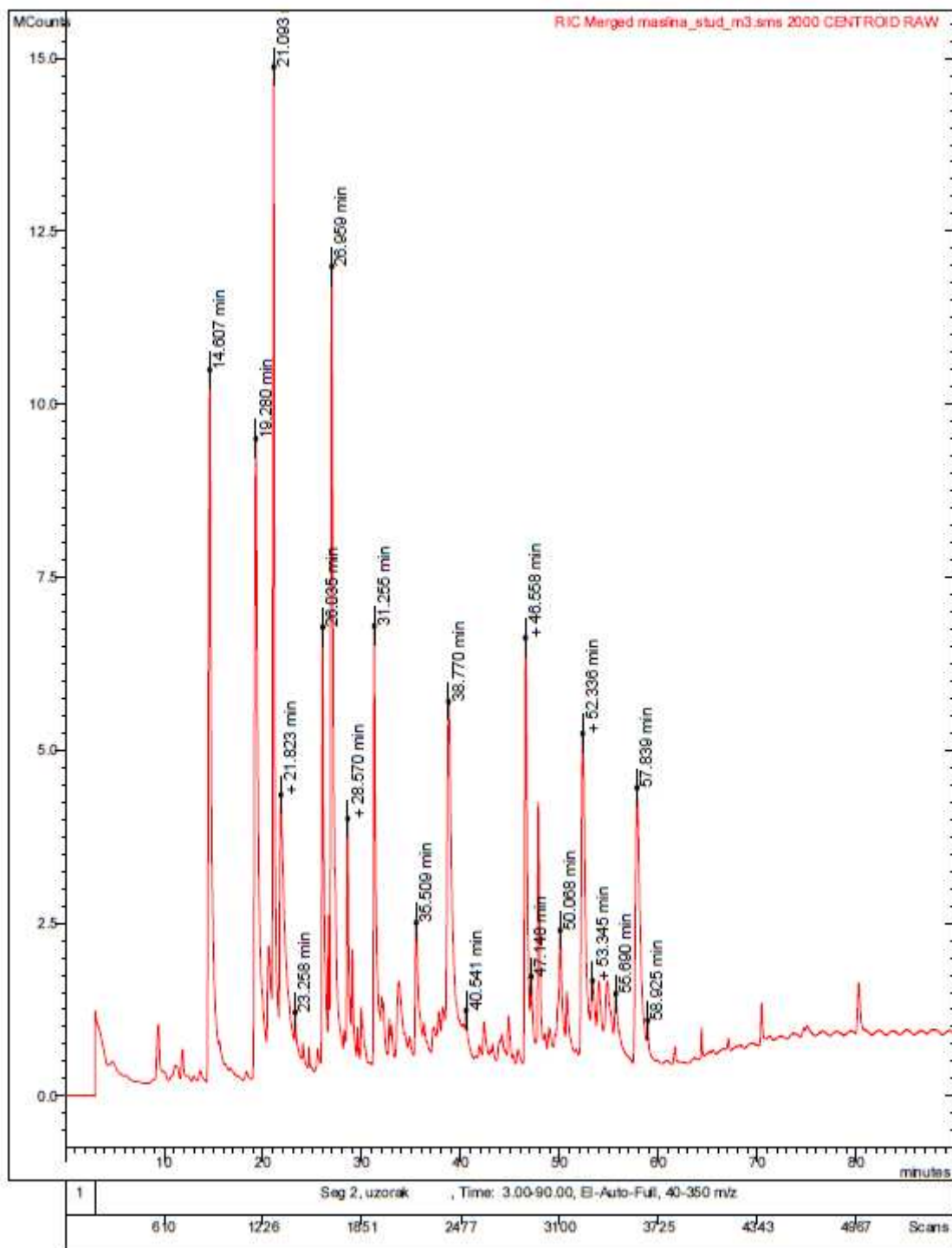
Slika 13. Kromatogram ukupne ionske struje za hidrolat (uzorak 1) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



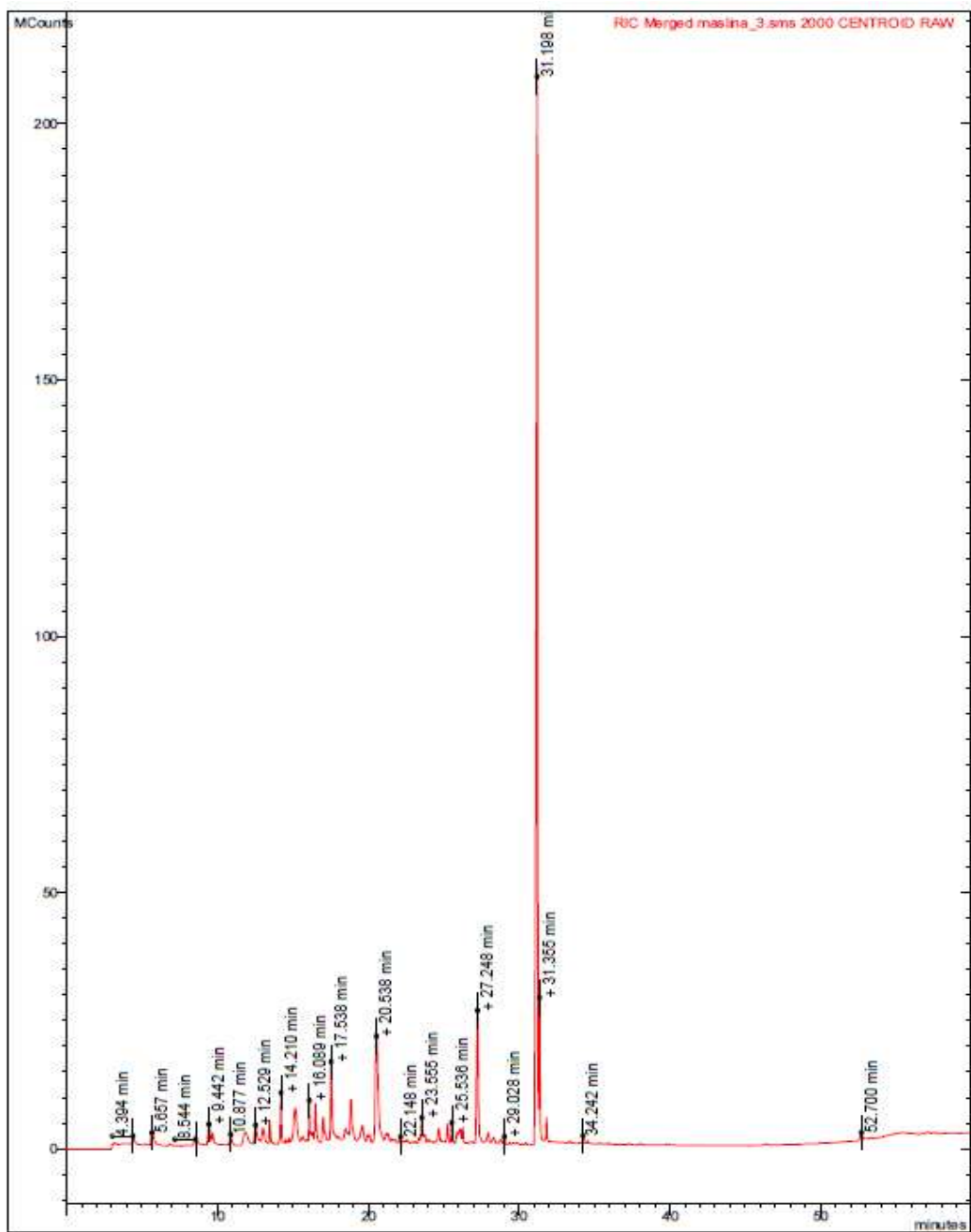
Slika 14. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje (uzorak 2) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



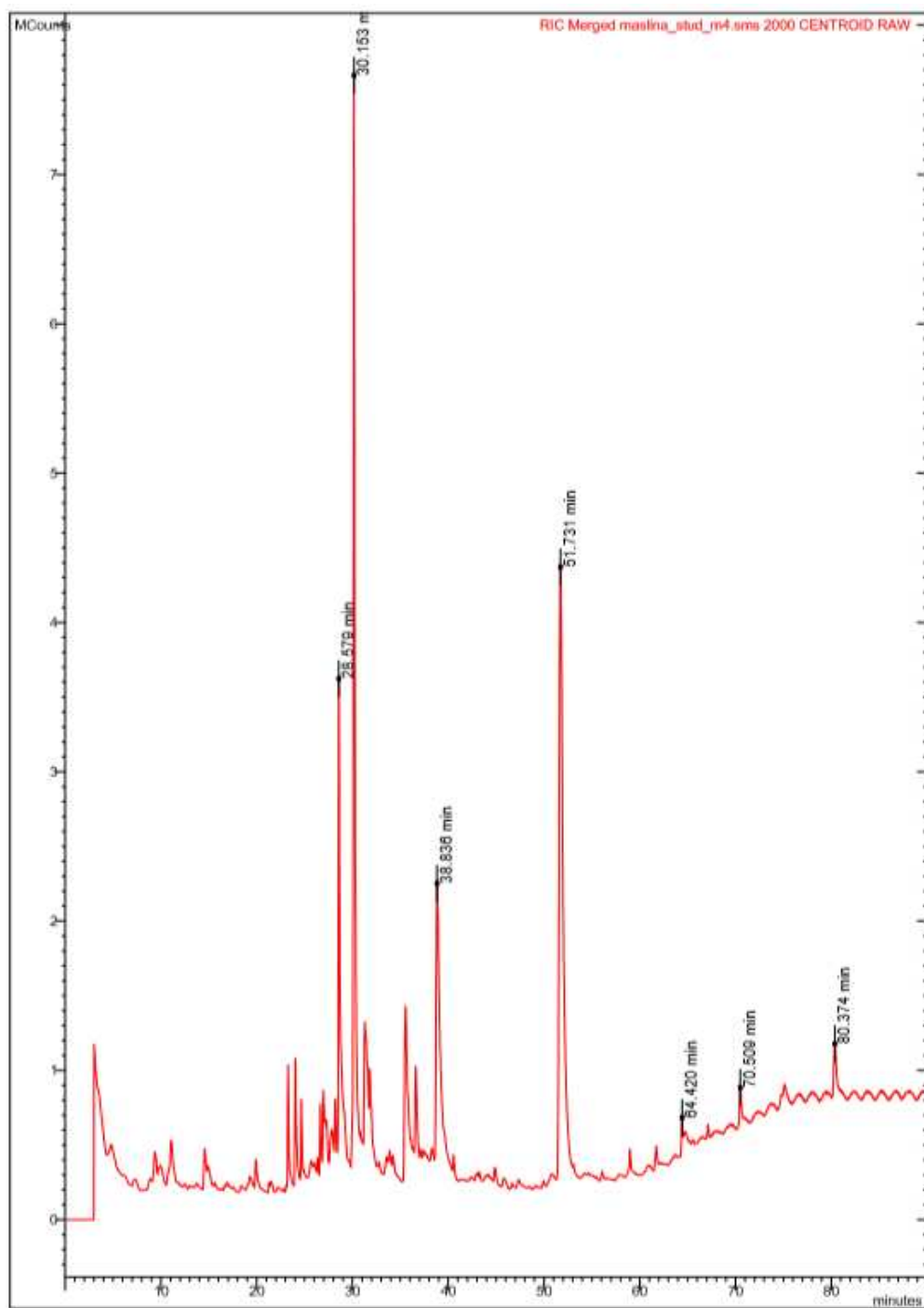
Slika 15. Kromatogram ukupne ionske struje za hidrolat (uzorak 2) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



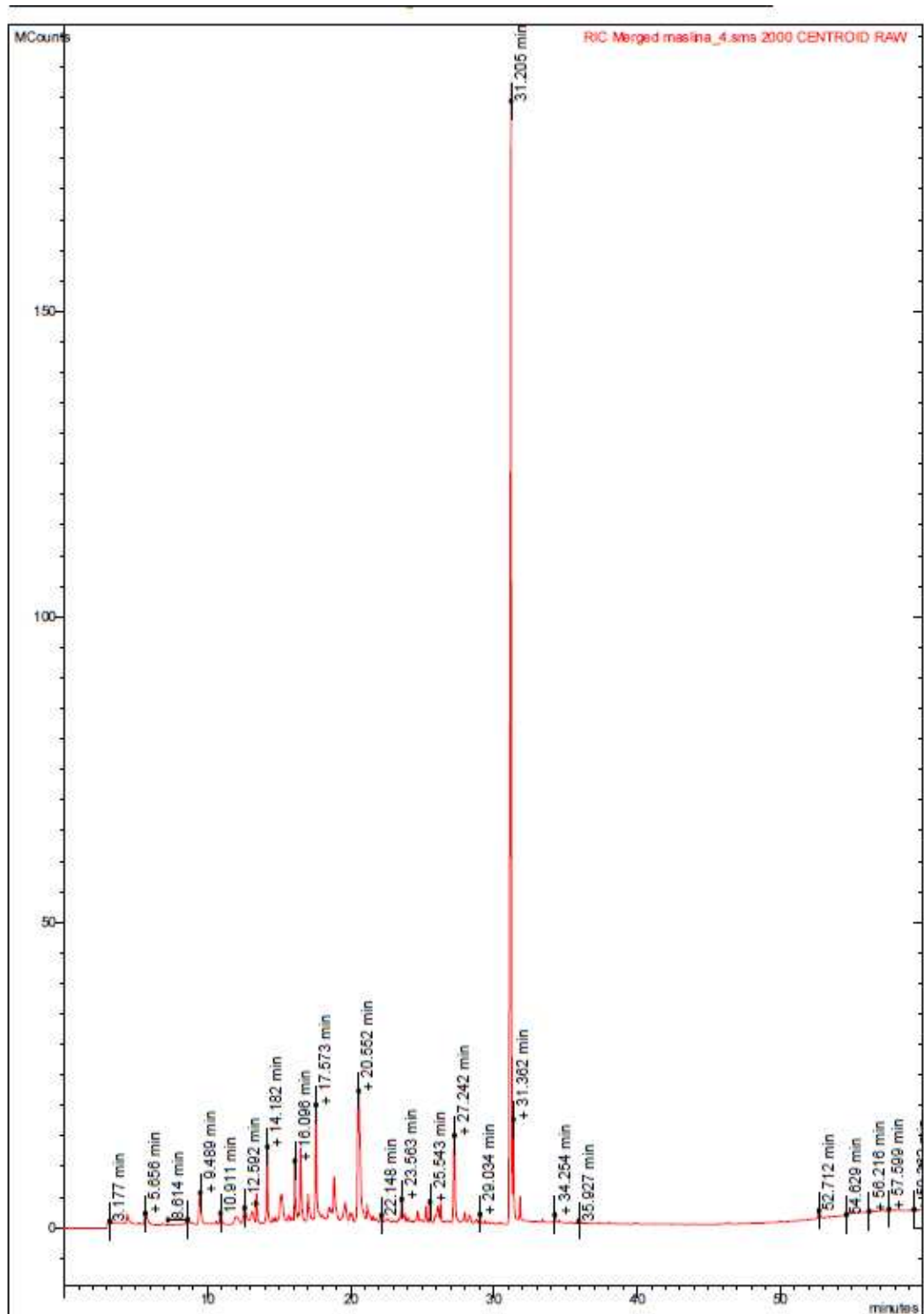
Slika 16. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje (uzorak 3) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



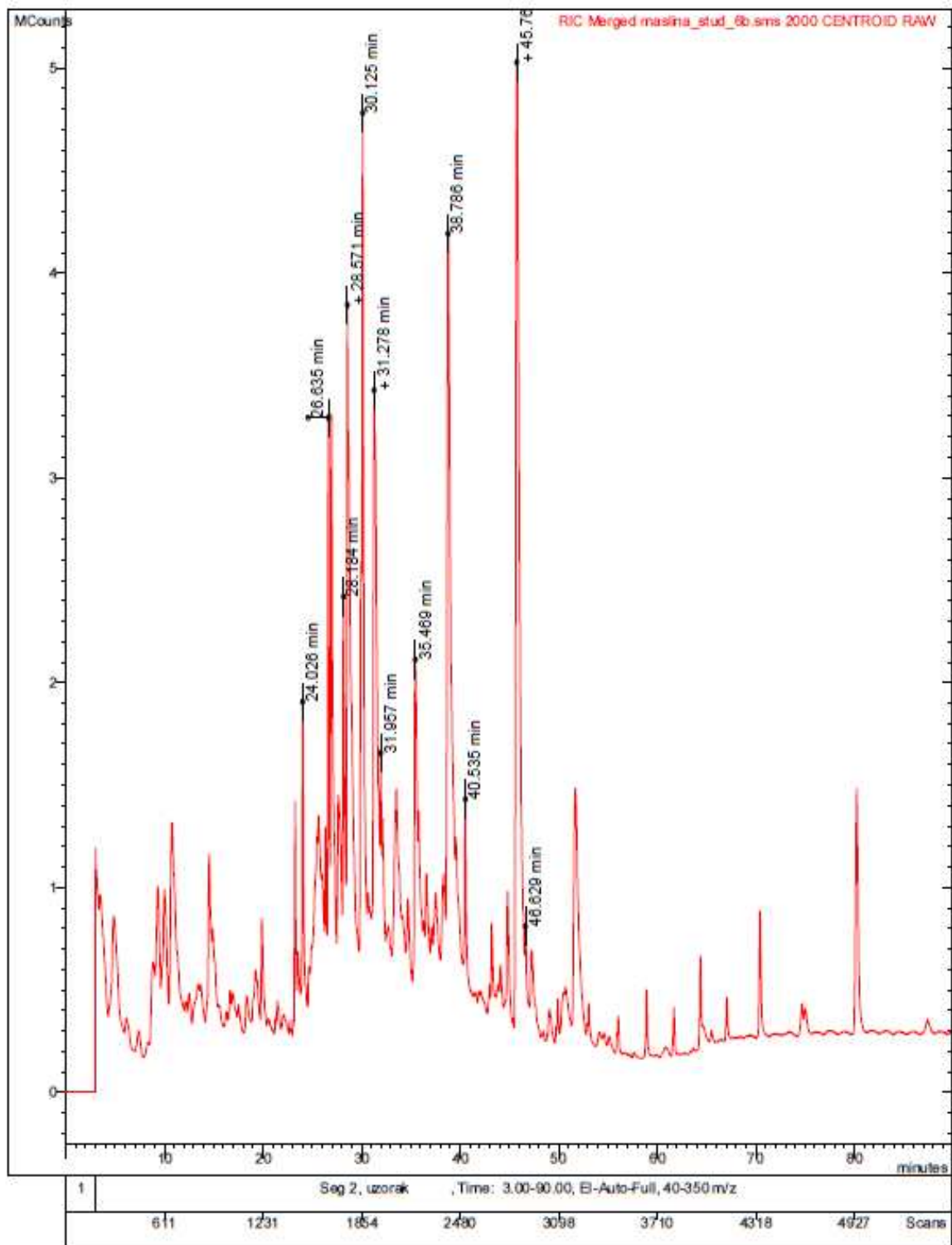
Slika 17. Kromatogram ukupne ionske struje za hidrolat (uzorak 3) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



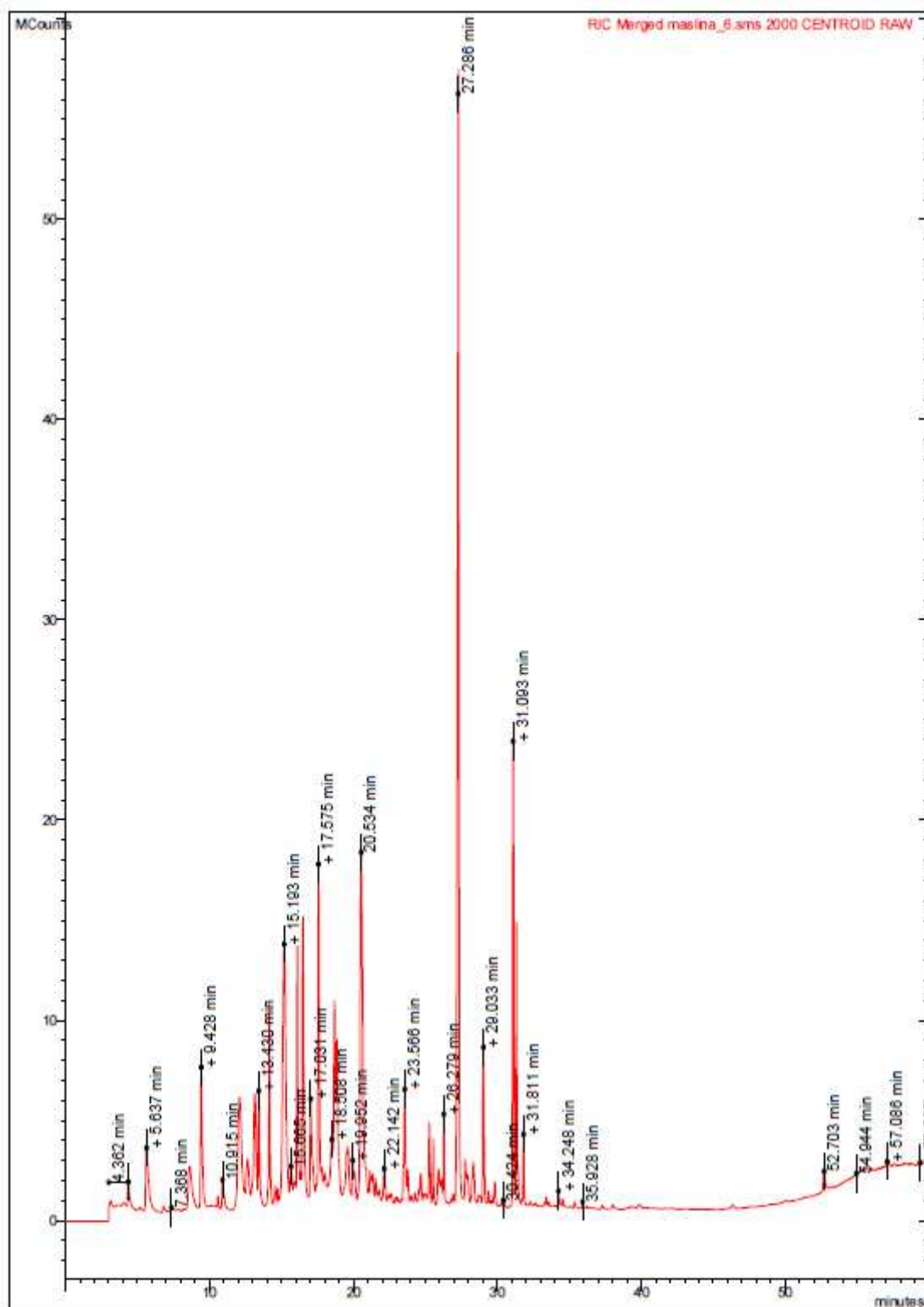
Slika 18. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje (uzorak 4) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



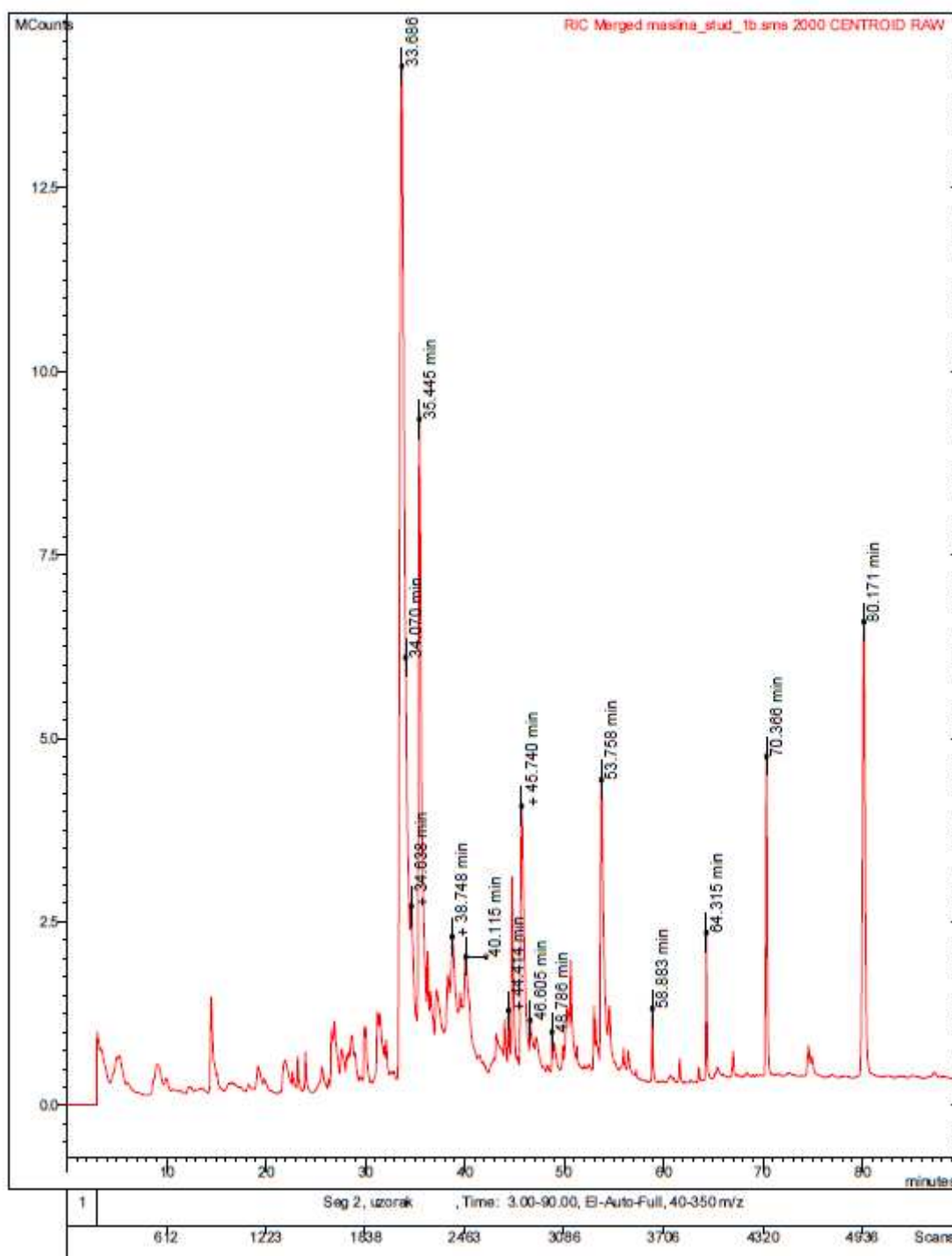
Slika 19. Kromatogram ukupne ionske struje za hidrolat (uzorak 4) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



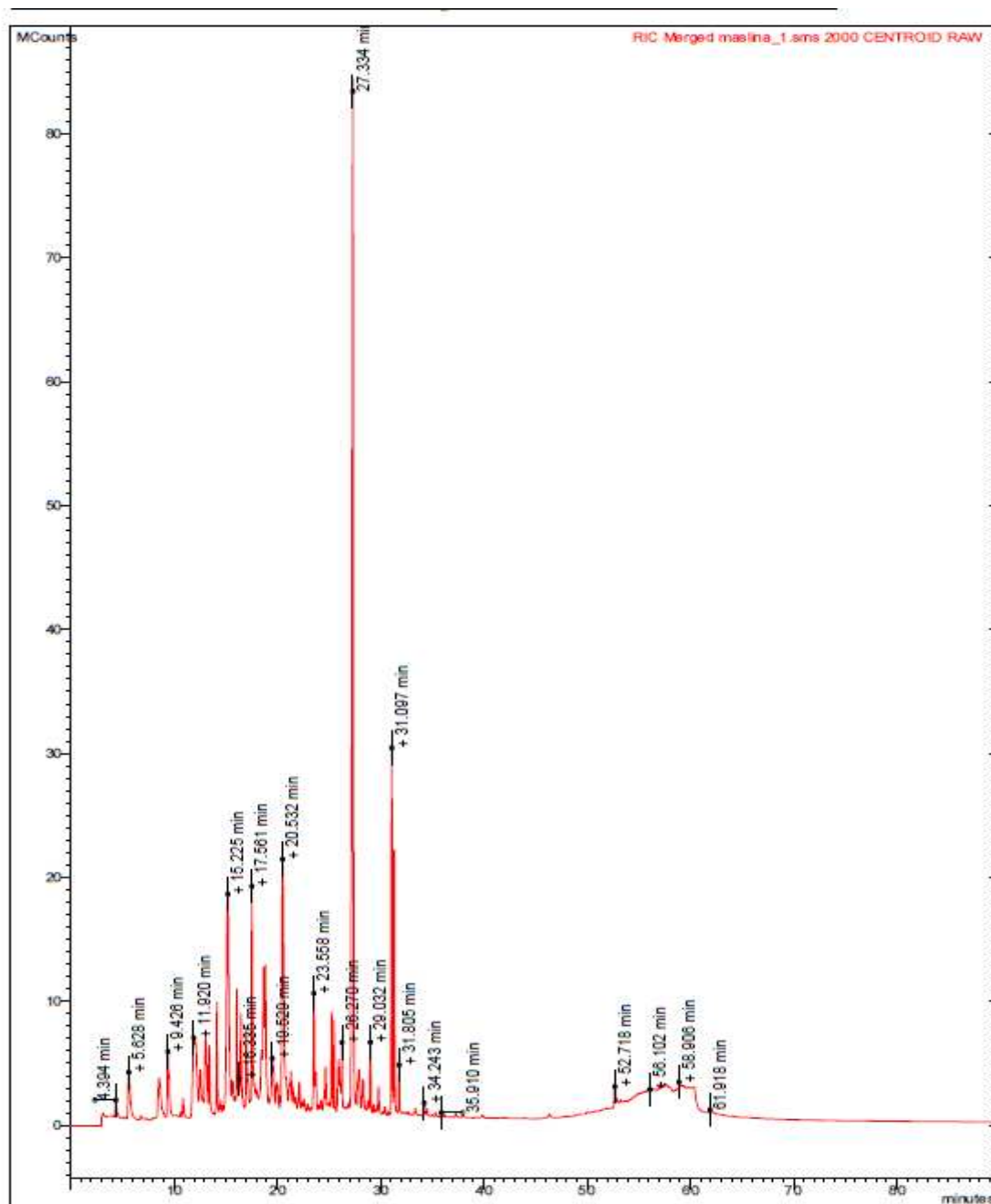
Slika 20. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje (uzorak 5) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



Slika 21. Kromatogram ukupne ionske struje za hidrolat (uzorak 5) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



Slika 22. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje (uzorak 6) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.



Slika 23. Kromatogram ukupne ionske struje za hidrolat (uzorak 6) vrste *Olea europaea* L. na koloni VF-5 MS.