

# Aromatični profil maslinovog ulja

---

**Pavlinović, Klara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:495656>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-04**

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**AROMATIČNI PROFIL MASLINOVOG ULJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KLARA PAVLINOVIĆ**

**Matični broj: 352**

**Split, rujan 2020.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**AROMATIČNI PROFIL MASLINOVOG ULJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KLARA PAVLINOVIĆ**

**Matični broj: 352**

**Split, rujan 2020.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**AROMATIC PROFILE OF OLIVE OIL**

**BACHELOR THESIS**

**KLARA PAVLINOVIĆ**

**Parent number: 352**

**Split, September 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij Kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

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

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

### AROMATIČNI PROFIL MASLINOVOG ULJA

Klara Pavlinović, 352

#### Sažetak:

Maslina (*Olea europea* L.) je jedna od najstarijih kultiviranih biljaka i jedna od najvažnijih kultura u jadranskom dijelu Hrvatske. Maslina se uzgaja uglavnom zbog proizvodnje maslinovog ulja. Jedinstvena i delikatna aroma maslinovog ulja pripisuje se hlapljivim spojevima koji se razvijaju tijekom i poslije ekstrakcije ulja iz ploda masline. Svrha ovog rada bilo je istražiti spojeve arome u maslinovom ulju proizvedenom za domaću upotrebu. Hlapljivi spojevi arome izolirani su dvjema metodama, vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Dobiveni uzorci hlapljivih spojeva, destilat i vršne pare, analizirani su plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MS).

Destilat maslinovog ulja karakterizira visoki udio nezasićene masne kiseline, oleinske kiseline, a slijede 5-(hidroksimetil)furfural (HMF) i alkohol glicerol. Oleinska kiselina i glicerol vjerojatno potječu od hidrolize triglicerida maslinovog ulja do koje je došlo tijekom vodene destilacije. Glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja su C<sub>6</sub> hlapljivi spojevi, aldehid *trans*-heks-2-enal i alkohol *trans*-heks-2-en-1-ol koji spadaju u skupinu nositelja tzv. "zelenih mirisnih nota". Navedeni C<sub>6</sub> hlapljivi spojevi nisu identificirani u destilatu maslinovog ulja. HS-SPME metoda je bolja metoda za izolaciju spojeva arome maslinovog ulja.

**Ključne riječi:** maslinovo ulje, spojevi arome, vodena destilacija, HS-SPME, GC-MS

**Rad sadrži:** 40 stranica, 24 slike, 4 tablice, 29 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

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

**Datum obrane:** 25. rujna 2020.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Undergraduate 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. 28

**Mentor:** Ani Radonić, PhD, associate professor

**Technical assistance:** Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor, Edita Jelinčić, ing.

### AROMATIC PROFILE OF OLIVE OIL

Klara Pavlinović, 352

#### Abstract:

Olive (*Olea europaea*) is one of the the oldest cultivated plant species, and one of the most important crops in the Adriatic part of Croatia. Olive is cultivated mainly for the production of the olive oil. The unique and delicate aroma of olive oil is attributed to the volatile compounds that develop during and after oil extraction from the olive fruit. The aim of this study was to investigate the aroma compounds in homemade olive oil. Volatile aroma compounds were isolated by two methods, hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The obtained samples, namely distillate and headspace, were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS).

The olive oil distillate was characterized by high concentration of unsaturated fatty acid, oleic acid, followed by 5-(hydroxymethyl)furfural (HMF) and alcohol glycerol. Oleic acid and glycerol probably derived from the hydrolysis of olive oil triglycerides. The main constituents of olive oil headspace are C<sub>6</sub> volatile compounds, namely aldehyde *trans*-hex-2-enal and alcohol *trans*-hex-2-en-1-ol, which belong to the so-called "green" aroma compounds. On the other hand, C<sub>6</sub> volatile compounds were not identified in olive oil distillate. So, headspace solid-phase microextraction is more suitable method for the investigation of olive oil aroma compounds.

**Keywords:** olive oil, aroma compounds, hydrodistillation, HS-SPME, GC-MS

**Thesis contains:** 40 pages, 24 figures, 4 tables, 29 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Marina Zekić, PhD, assistant prof.         | member       |
| 3. Ani Radonić, PhD, associate prof.          | supervisor   |

**Defence date:** September 25<sup>th</sup>, 2020.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited** 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 srpnja 2020. godine.*



*Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na stručnim savjetima, posvećenom vremenu, strpljenju i uloženom trudu oko izrade ovog završnog rada.*

*Također, zahvaljujem doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću i ing. Editi Jelinčić na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci i razumijevanju tijekom studiranja.*

*Klara Pavlinović*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

- Istražiti spojeve arome maslinovog ulja, odnosno izolirati hlapljive spojeve iz maslinovog ulja vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) te ih identificirati vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS).
- Usporediti dobivene rezultate.

## SAŽETAK

Maslina (*Olea europea* L.) je jedna od najstarijih kultiviranih biljaka i jedna od najvažnijih kultura u jadranskom dijelu Hrvatske. Maslina se uzgaja uglavnom zbog proizvodnje maslinovog ulja. Jedinstvena i delikatna aroma maslinovog ulja pripisuje se hlapljivim spojevima koji se razvijaju tijekom i poslije ekstrakcije ulja iz ploda masline. Svrha ovog rada bilo je istražiti spojeve arome u maslinovom ulju proizvedenom za domaću upotrebu. Hlapljivi spojevi arome izolirani su dvjema metodama, vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Dobiveni uzorci hlapljivih spojeva, destilat i vršne pare, analizirani su plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MS).

Destilat maslinovog ulja karakterizira visoki udio nezasićene masne kiseline, oleinske kiseline, a slijede 5-(hidroksimetil)furfural (HMF) i alkohol glicerol. Oleinska kiselina i glicerol vjerojatno potječu od hidrolize triglicerida maslinovog ulja do koje je došlo tijekom vodene destilacije. Glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja su C<sub>6</sub> hlapljivi spojevi, aldehid *trans*-heks-2-enal i alkohol *trans*-heks-2-en-1-ol koji spadaju u skupinu nositelja tzv. "zelenih mirisnih nota". Navedeni C<sub>6</sub> hlapljivi spojevi nisu identificirani u destilatu maslinovog ulja. HS-SPME metoda je bolja metoda za izolaciju spojeva arome maslinovog ulja.

**Ključne riječi:** maslinovo ulje, spojevi arome, vodena destilacija, HS-SPME, GC-MS

## SUMMARY

Olive (*Olea europea* L.) is one of the the oldest cultivated plant species, and one of the most important crops in the Adriatic part of Croatia. Olive is cultivated mainly for the production of the olive oil. The unique and delicate aroma of olive oil is attributed to the volatile compounds that develop during and after oil extraction from the olive fruit. The aim of this study was to investigate the aroma compounds in homemade olive oil. Volatile aroma compounds were isolated by two methods, hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The obtained samples, namely distillate and headspace, were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The olive oil distillate was characterized by high concentration of unsaturated fatty acid, oleic acid, followed by 5-(hydroxymethyl)furfural (HMF) and alcohol glycerol. Oleic acid and glycerol probably derived from the hydrolysis of olive oil triglycerides. The main constituents of olive oil headspace are C<sub>6</sub> volatile compounds, namely aldehyde *trans*-hex-2-enal and alcohol *trans*-hex-2-en-1-ol, which belong to the so-called “green” aroma compounds. On the other hand, C<sub>6</sub> volatile compounds were not identified in olive oil distillate. So, headspace solid-phase microextraction is more suitable method for the investigation of olive oil aroma compounds.

**Key words:** olive oil, aroma compounds, hydrodistillation, HS-SPME, GC-MS

# SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Biološke karakteristike masline.....	2
1.2. Građa ploda masline .....	3
1.3. Kemijski sastav ploda masline .....	5
4. Razvoj i zrenje ploda masline .....	6
1.5. Sorte maslina .....	7
1.6. Maslinovo ulje .....	10
1.6.1. Kemijski sastav maslinovog ulja.....	10
1.6.1.1. Osapunjivi dio maslinovog ulja .....	10
1.6.1.2. Neosapunjivi dio maslinovog ulja .....	12
1.7. Metode izolacije hlapljivih spojeva .....	17
1.7.1. Destilacija .....	17
1.7.2. Ekstrakcija .....	19
1.7.3. Sorpcijske tehnike .....	20
1.7.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi .....	20
1.8. Analiza hlapljivih spojeva.....	22
1.8.1. Kromatografija .....	22
1.8.1.1. Plinska kromatografija .....	22
1.8.1.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa.....	24
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	26
2.1. Materijal.....	26
2.2. Kemikalije i aparatura.....	26
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva .....	26
2.3.1. Vodena destilacija .....	27
2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi.....	28
2.4. GC - MS analiza hlapljivih spojeva.....	29
3. REZULTATI.....	31
3.1. GC-MS analiza hlapljivih spojeva.....	31
4. RASPRAVA .....	33

4.2. Hlapljivi spojevi vršnih para .....	35
6. LITERATURA .....	39

## UVOD

Maslina se uzgaja u mediteranskom području još od 4. tisućljeća prije Krista. U tom razdoblju maslina, porijeklom iz Armenije, dolazi u Palestinu. Iz Egipta se rasprostire cijelim Mediteranom, počevši od Krete. Pojavom masline u antičkoj Grčkoj, maslinovo ulje, kao njen prirodni sok, postaje jednim od najvećih blaga čovječanstva.<sup>1</sup>

Maslinovo ulje dobiva se iz ploda nekoliko sorti stabla *Olea europaea* L. Svaku sortu karakteriziraju specifična fizička i biokemijska obilježja zahvaljujući kojima daje ulja različitog sastava i svojstava. Osim o sorti, sastav maslinovog ulja ovisi i o klimi, podneblju, razdoblju ubiranja te načinu prerade plodova.

Maslinovo ulje je bogato prirodnim antioksidansima kao što su tokoferoli, karotenoidi, steroli i fenoli. Najveći dio ulja (više od 95%) čine trigliceridi tj. triacilgliceroli, u kojima je najzastupljenija mononezasićena oleinska kiselina (65–85%). Studije su pokazale da tvari prisutne u maslinovom ulju, pogotovo polifenoli, imaju važnu ulogu u zaštiti organizma od štetnog djelovanja slobodnih radikala čime se smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih oboljenja, raka i cerebralnog starenja.<sup>2</sup>

Jedno od osnovnih pozitivnih senzorskih svojstava maslinovog ulja, uz pikantnost i gorčinu, jest i voćnost. Voćnost je ukupnost mirisnih svojstava (ovisno o sorti) karakterističnih za ulje od zdravih i svježih plodova, bilo zelenih ili zrelih, zapaženih izravno ili neizravno. Miris maslinovog ulja (voćnost) pripisuje se hlapljivim tvarima koje nastaju tijekom i nakon ekstrakcije ulja iz ploda masline. Za jedinstven miris maslinovog ulja zaslužna je složena mješavina spojeva niske molekulske mase koji brzo hlape na sobnoj temperaturi.<sup>3</sup>

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Biološke karakteristike masline

Maslina (*Olea europaea* L.) je zimzeleno stablo ili grm te jedna od najraširenijih kultiviranih voćaka u svijetu. Tijekom godina postala je simbol mira, mudrosti, slave, plodnosti, snage i čistoće. Uzgaja se za proizvodnju maslinovog ulja, maslinovog lišća te samih maslina. 90% svih ubranih maslina pretvara se u ulje, a samo 10% se koristi kao stolna maslina.<sup>4</sup>

Maslina (slika 1) može doseći visinu od 8 do 10 m, dok na položajima zaštićenim od vjetra može narasti i viša. Samonikla maslina raste grmoliko, 4 do 5 m visoko, grančice su joj bodljikave, lišće tvrdo, kožasto i manje nego kod kultivirane masline. Deblo masline kod nas ipak nije jako visoko te se krošnja počinje granati na visini od 1 m, rijetko od 2 m ili više od 2 m nad zemljom. Debljina debla doseže do 1 m u promjeru, a može biti i deblje, ako deblo ne istrune zbog lošeg održavanja. Drvo masline je prilično tvrdo, no također je krhko i vrlo cijenjeno.



Slika 1. *Olea europaea* L.<sup>5</sup>



Korijen masline razvija se dublje ili pliće, ovisno o sastavu tla, o udaljenosti stabala u maslinjaku te o tome je li stablo uzgojeno iz sjemena ili od izboja. Stablo uzgojeno iz sjemena prodire žilom provodnicom vrlo duboko u zemlju te se širi koliko je široka krošnja. Takvo stablo najbolje se razvija, odolijeva jakim vjetrovima i ne trpi posljedice suše, dok stablo uzgojeno od mladica slabije napreduje i neotporo je na sušu i vjetrove jer se korijen grana nalazi malo dublje od pedlja ispod površine zemlje.

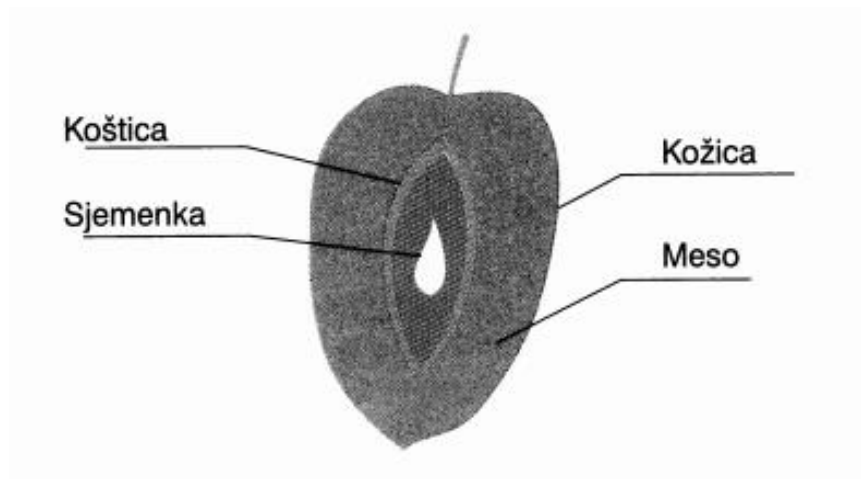
Listovi su mali, duguljasti, kožasti i vrlo slični lišću vrbe. Lice lista je svjetlozelene, a naličje je sivkasto-bijele boje. U podnožju listova smješteni su šiljasti ili okrugli pupovi. Šiljasti su pupovi drveni, a okrugli su cvjetni. Samo na jednogodišnjim (prošlogodišnjim) granama rastu cvjetovi i kasnije plodovi. Cvjetovi su grozdasti, žućkasto bijeli i ugodnog mirisa. Nakon cvatnje i oplodnje razvija se plod. Plod je prvo zelen, a pred zriobu mijenja boju u tamnoljubičastu ili gotovo crnu. Dok je plod zelen, meso je gorko. Dozrijevanjem se gubi gorčina i povećava se sadržaj ulja u plodu.

Maslina uspijeva samo u umjereno toplim krajevima u kojima se temperatura rijetko spušta ispod 0° C. Krajevi gdje se temperatura spušta do -7° C nisu pogodni za uzgoj masline. Maslina podnosi temperaturu i do -10° C, no tako niske temperature ne smiju biti dugotrajne. Potraju li niske temperature 2 do 3 dana, obično pozebu grančice, a potraju li dulje, pozebu i grane i deblo. Zbog toga se masline uzgajaju uglavnom uz more, iako se mogu naći i na nadmorskim visinama od 500 i više metara (Kunovska visoravan na Pelješcu, Klenove zidine kod Jablanca i Baški dolac kod Karlobaga).

Maslina je osjetljiva na nagle promjene vremena te na položaj. Otvoreni položaji, izloženi jakim vjetrovima, ne odgovaraju maslinama jer joj vjetar lomi grane i skida plodove. Zato se preporučuje masline saditi na zaklonjenim položajima, barem od sjevernih vjetrova (bure).<sup>6</sup>

## **1.2. Građa ploda masline**

Plod masline građen je od tri osnovna anatomska dijela: kožice (epikarpa), pulpe (mezokarpa) i koštice (endokarpa). Unutar koštice nalazi se sjemenka (endosperm) koja čini svega 2-4% ukupne mase cijelog ploda (slika 2).<sup>7</sup>



**Slika 2.** Dijelovi ploda masline<sup>8</sup>

Veličina ploda uvjetovana je genetskim i okolnim čimbenicima. Mase zrelih plodova mogu se kretati od 2 do 12 g, iako ima i onih koji dostižu i do 20 g.<sup>9</sup>

**Kožica masline** građena je od sloja epidermalnih stanica iznad kojeg se nalazi kutikula prekrivena masno-voštanom prevlakom, sastavljenom od oko 40% triacilglicerola, 30% triterpenskikh kiselina, 20% alifatskih i triterpenskikh alkohola te oko 10% voskova i drugih tvari. Prilikom prerade maslina, masno-voštana prevlaka dolazi u kontakt s uljem pa se dio ovih tvari u njemu otapa i postaje njegov sastavni dio. Kožica je i dio ploda koji u najvećoj mjeri sadrži tvari boje – lipofilne klorofile, karotene i ksantofile, te hidrofilne antocijane. Tijekom dozrijevanja koncentracija klorofila, ksantofila i karotena se progresivno smanjuje i boja kožice se mijenja od zelene preko zeleno-žute nijanse do pojave ljubičastih ili crvenih mrlja koje ukazuju na početak sinteze antocijana.<sup>10</sup>

**Pulpa ploda masline** je građena od stanica čija je primarna stanična stijenka sastavljena od celuloze, pektoceluloze i hemiceluloze. U međustaničnom prostoru nalazi se tanka središnja lamela sastavljena od pektina koji povezuje susjedne stanice i tkivo, dajući mu čvrstoću. Pulpa masline sadrži ulje unutar staničnih vakuola te značajne količine fenolnih tvari, biološki aktivnih spojeva s izrazitim antioksidacijskim djelovanjem. Fenolne tvari se u plodu nalaze u nakupinama smještenim neposredno uz staničnu stijenku. U ulju se otopi tek 0,5-1% od ukupne količine fenolnih tvari, a one su od izuzetno velike važnosti za okusno-mirisna i nutritivna svojstva te za trajnost maslinovih ulja.<sup>7,10</sup>

**Sjemenka masline** sadrži znatan dio ulja (35-40%), no s obzirom na njen mali maseni udio u plodu, to ulje predstavlja tek 5-7% od ukupne količine ulja u svježem plodu. Za sjemenku i ulje sjemenke karakteristično je da sadrži veći udio tokoferola i sterola od ulja iz pulpe te specifičan fenolni spoj nuzhenid. Sjemenka sadrži i nekoliko enzima bitnih za sintezu hlapljivih mirisnih tvari te oblikovanje fenolnog sustava djevičanskog maslinova ulja tijekom prerade ploda. Lipoksigenaze iz sjemenke i pulpe sudjeluju u sintezi poželjnih mirisnih tvari djevičanskih maslinovih ulja, a aktivnost peroksidaza iz sjemenke tijekom prerade maslina može smanjiti udio fenolnih tvari u ulju, zbog čega se pojedini proizvođači odlučuju za uklanjanje koštice na početku procesa prerade maslina u ulje.<sup>7,10</sup>

### 1.3. Kemijski sastav ploda masline

Kemijski sastav plodova, pa tako i ulja, ovisi o genetskim osnovama te o klimatskim, agrotehničkim i pedološkim čimbenicima uzgojnog područja.

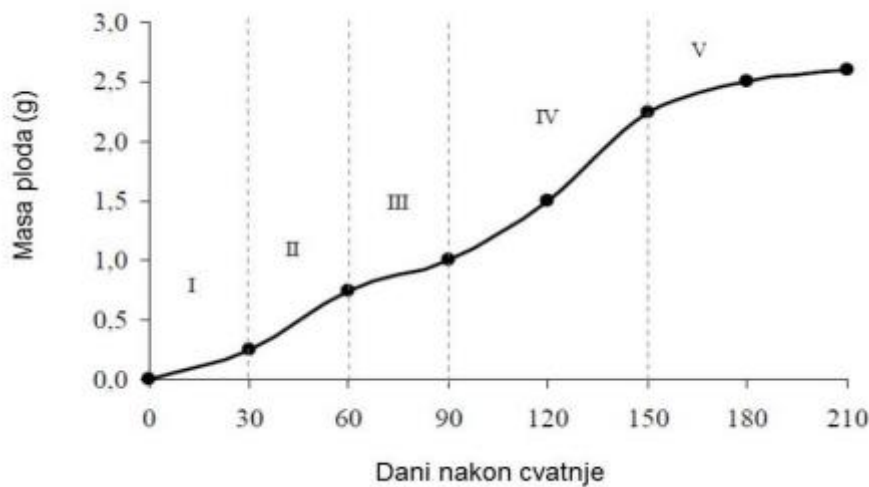
U plodu kultiviranih sorti nalaze se voda, proteini, ulje, ugljikohidrati, celuloza i pepeo, dok kemijski sastav divljih maslina, osobito sadržaj vode u plodu, značajno varira (37-64%) (tablica 1).<sup>9,11</sup>

**Tablica 1.** Kemijski sastav ploda masline<sup>11</sup>

SASTOJAK	%
VODA	50-70
ULJE	22
ŠEĆERI	19,1
CELULOZA	5,8
PROTEINI	1,6
PEPEO	1,5

#### 4. Razvoj i zrenje ploda masline

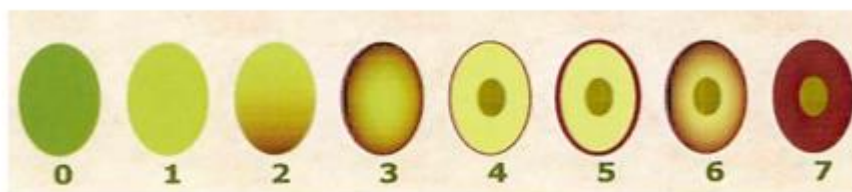
Razvoj i zrenje ploda predstavlja kombinaciju biokemijskih i fizioloških procesa karakterističnih za svaku sortu i ovisi o okološkim čimbenicima. Razvojem ploda uočavaju se promjene u njegovoj veličini, sastavu, boji, teksturi, aromi i osjetljivosti na patogene. Razvoj i rast ploda odvija se kroz 4-5 mjeseci, a u tom razdoblju plod prolazi kroz 5 glavnih faza (slika 3).



**Slika 3.** Faze rasta, razvoja i zrenja ploda masline<sup>3</sup>

Faza oplodnje i zametanja ploda (I) traje tridesetak dana nakon cvatnje. Za ovu fazu karakteristična je nagla dioba stanica što stvara preduvjete brzog napredovanja embrija. Slijedi faza (II) razvoja sjemenke i period intenzivnijeg rasta ploda. Tijekom ove faze odvija se intenzivna dioba i rast stanica endokarpa te, manjim dijelom, stanica mezokarpa. Plod usporava s rastom u trećoj fazi (III), stanice endokarpa se prestaju dijeliti i očvrstnu. Razvoj mezokarpa predstavlja dugotrajniju fazu (IV) rasta ploda koja je popraćena intenzivnim razvojem pulpe, a proširenjem postojećih stanica ostvaruju se preduvjeti za akumulaciju ulja. Zadnju fazu zrenja (V), karakterizira promjena boje ploda od zelene, preko žućkaste do crveno-ljubičaste i crne. Ova faza traje i po nekoliko mjeseci i u njoj se, više no kod ostalih faza, ispoljavaju sorte osobine i utjecaj okolišnih čimbenika.

Uceda i Frias razvili su pouzdanu i jednostavnu metodu određivanja indeksa stupnja zrelosti, koja se temelji na praćenju promjena u boji potkožice i pulpe plodova tijekom procesa zrenja (slika 4).



**Slika 4.** Shematski prikaz ploda masline i pripadajućeg stupnja zrelosti<sup>3</sup>

Ulja proizvedena od plodova niskog stupnja zrelosti sadrže visoku koncentraciju fenolnih spojeva koji utječu na senzorska svojstva (pikantnost i gorčina). Ova ulja pokazuju visoku oksidacijsku stabilnost. Više autora navodi da se najbolji rezultati u kvaliteti i količini ulja, koja se odražava u sadržaju fenolnih spojeva, poželjnih hlapljivih tvari te iskorištenju proizvodnog procesa, dobiju preradom plodova stupnja zrelosti oko 3. Od plodova visokog stupnja zrelosti dobivaju se ulja s nižom koncentracijom ukupnih fenolnih spojeva i višestruko nezasićenih masnih kiselina.<sup>3</sup>

### 1.5. Sorte maslina

Sorte su botanički varijeteti iste genetske konstitucije, nastale odabiranjem (selekcijom) od iste vrste maslina s različitim botaničkim osobinama.

Međusobno se razlikuju po načinu rasta, obliku i bujnosti krošnje, obliku, boji i veličini lista, ploda i koštice, dobi cvatnje, broju cvjetova u grozdu, intenzitetu samooplodnje, dobi dozrijevanja, količini i kvaliteti ulja, otpornosti na studen, sušu i štetočine.

Po načinu uporabe plodova razlikujemo:

- sorte za jelo
- sorte sa dvojakom uporabom – za ulje i jelo.

U Hrvatskoj postoji 31 autohtona sorta i 44 introducirane sorte masline. Najpoznatije hrvatske autohtone sorte maslina su: oblica, lastovka, drobnica, levantinka, plominka, buža, istarska bjelica i dužica.<sup>12</sup>

**Oblica** (slika 5) je najraširenija sorta u Hrvatskoj i najstarija sorta u Dalmaciji. Plod je krupan i ovalnog oblika, prosječne mase 5-10 grama i sadržaja ulja do 20 %. Meso i pokožica ploda su čvrsti te se može koristiti i za konzerviranje. Dobro podnosi sušu pa se uspješno uzgaja na škrtim i plitkim tlima. Pored suše, oblica je otporna i na niske temperature i rak masline. Veliki nedostatak ove sorte je alternativna rodnost. Razlozi tome su višestruki, a najvažniji je što ona ima više od 40% funkcionalno muških cvjetova u cvatu, a mogućnost samooplodnje je veoma niska. Na temelju toga je potrebno u čiste nasade oblice unositi druge sorte – oprašivače (levantinka, lastovka).

Ulje ove sorte se opisuje kao srednjeg intenzivnog mirisa i okusa po plodu masline, travi i lišću, a gorčina i pikantnost su blago izraženi i skladni s voćnom komponentom.<sup>11-13</sup>



**Slika 5.** Plod masline sorte Oblica<sup>13</sup>

**Lastovka** (slika 6) je porijeklom s otoka Korčule i u tom se području najviše uzgaja. Lišće je maleno, kopljasto, tamnozeleno boje. Plodovi su sitni, do 3 g težine, sadrže 20% ulja i dugo ostaju na stablu. Osjetljiva je na studen, pa zahtijeva zaštićene položaje.

Maslinovo ulje sorte lastovka ima karakteristično gorkast okus koji je posljedica visokog postotka fenola sekoiridoida, oleuropeina kao i njegovih derivata. Oni čuvaju ulje od kvarenja kao i naš organizam.<sup>13,14</sup>



**Slika 6.** Plod masline sorte Lastovka<sup>15</sup>

**Levantinka** (slika 7) je veoma vrijedna sorta, podrijetlom sa otoka Šolte. Plodovi su srednje krupni, težine oko 4 g i sadržaja ulja oko 19 %. Ima bujno stablo, okruglaste krošnje, a kora grana je glatka. Iz toga je razloga i zovu „ljepotica maslinika“. Ulje dobiveno iz levantinke je slatkastog okusa.<sup>13</sup>



**Slika 7.** Plod masline sorte Levantinka<sup>15</sup>

## 1.6. Maslinovo ulje

Maslinovo ulje sastavni je dio takozvane mediteranske prehrane gdje predstavlja glavni izvor masti. Najčešće se upotrebljava kao dodatak jelima kojima, zbog svojih iznimnih senzornih svojstava, obogaćuje okus, a i olakšava probavljivost nekih namirnica. Zahvaljujući prehrambenoj, preventivnoj, ali i terapijskoj vrijednosti sredinom dvadesetih godina doživljava ekspanziju te se širi van granica Mediterana.<sup>16</sup>

### 1.6.1. Kemijski sastav maslinovog ulja

Na kemijski sastav maslinovog ulja utječe široki spektar faktora: okolina, klimatsko područje i nadmorska visina, sorta maslina, uzgojne tehnike, stupanj zrelosti ploda i način berbe, skladištenje maslina i obrada plodova.<sup>17</sup>

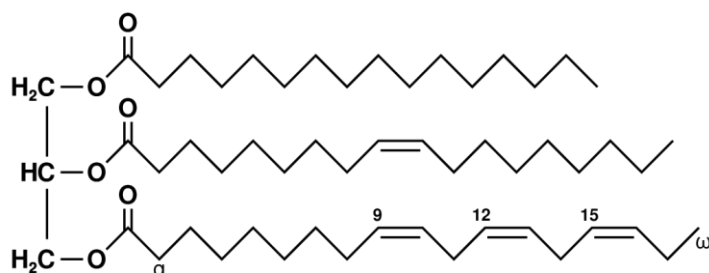
Maslinovo ulje sastavljeno je od osapunjivog dijela (99%), a samo 1% otpada na neosapunjivi dio.<sup>18</sup>

#### 1.6.1.1. Osapunjivi dio maslinovog ulja

Osapunjivi dio maslinovog ulja predstavljaju trigliceridi (triacilgliceroli) koji u svom sastavu imaju određene masne kiseline. Također tu se još ubrajaju i digliceridi, monogliceridi, voskovi, esteri sterola.<sup>11,18</sup>

#### Trigliceridi i slobodne masne kiseline

Trigliceridi (slika 8) su esteri masnih kiselina i trovalentnog alkohola – glicerola (tri masne kiseline esterski vezane na tri hidroksilne skupine glicerola). U sastav triglicerida ulaze nezasićene masne kiseline koje imaju 4-24 C atoma u svojoj molekuli, a najčešće masne kiseline sa 16 i 18 C atoma u molekuli, a to su oleinska, palmitinska i stearinska.<sup>11</sup>



Slika 8. Primjer triglicerida<sup>19</sup>



S obzirom na porijeklo maslinovog ulja, različit je i sastav masnih kiselina u trigliceridima maslinovog ulja. Međunarodno vijeće za maslinovo ulje (engl. *International Olive Oil Council*, IOOC) ustanovilo je sljedeće granične vrijednosti za sastav masnih kiselina u trigliceridima maslinovog ulja (tablica 2).

**Tablica 2.** Masne kiseline u maslinovom ulju<sup>18</sup>

Masne kiseline	Udio %
<b>Oleinska kiselina (18:1, n-9)</b>	55,0 – 83,0
<b>Palmitinska kiselina (16:0)</b>	7,5 – 20,0
<b>Linolna kiselina (18:2, n-6)</b>	3,5 – 21,0
<b>Stearinska kiselina (18:0)</b>	0,5 – 5,0
<b>Palmitoleinska kiselina (16:1, n-7)</b>	0,3 – 3,5
<b><math>\alpha</math>-linolenska kiselina (18:3, n-3)</b>	0,0 – 1,5

Iz navedenih vrijednosti vidljivo je da kvalitetno maslinovo ulje sadrži izuzetno visok udio jednostruko nezasićene oleinske kiseline, znatnu količinu esencijalnih masnih kiselina (linolne i  $\alpha$ -linolenske kiseline) te umjerenu količinu zasićenih masnih kiselina poput stearinske i palmitinske kiseline. Upravo takav sastav i omjer masnih kiselina čini maslinovo ulje vrijednijim od drugih jestivih ulja.<sup>18</sup>

### **Mono- i digliceridi**

Nepotpunom biosintezi, ali i hidrolizom ulja nastaju monogliceridi (monoacilgliceroli) i digliceridi (diacilgliceroli). Prisutnost navedenih spojeva u maslinovom ulju upućuje na ulje slabije kvalitete te se njihovo određivanje koristi kao jedan od pokazatelja kvalitete.<sup>11</sup>

### **Voskovi**

Voskovi su esteri viših masnih kiselina i viših alkohola. Sazrijevanjem ulja mijenja se sastav maslinovog ulja, skladištenjem se povećava sadržaj voskova u uljima zahvaljujući povećanju koncentracije alifatskih alkohola u uljima.<sup>11</sup>

### 1.6.1.2. Neosapunjivi dio maslinovog ulja

U neosapunjivi dio maslinovog ulja spadaju ugljikovodici, tokoferoli, steroli, fenolni spojevi i flavonoidi, pigmenti, alifatski alkoholi i hlapljivi spojevi tzv. „spojevi arome“ (engl. *aroma compounds*).<sup>11</sup>

Iako zauzimaju značajno manji udio u ukupnom sastavu maslinovog ulja, neosapunjivi spojevi imaju iznimno veliku važnost. Odgovorni su za antioksidacijsko djelovanje ( $\alpha$ -tokoferol, fenoli), aromu (fenoli), miris (okta-2,6-dienol), okus (fenoli, flavonoidi) i boju (klorofil,  $\beta$ -karoten).<sup>11</sup>

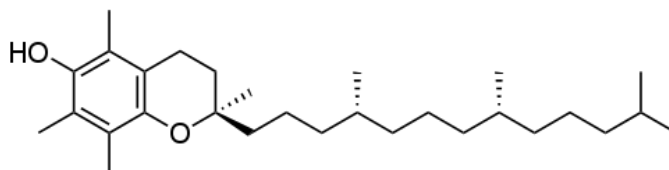
#### Ugljikovodici

Ugljikovodici čine oko 60% ukupnog sadržaja neosapunjivog dijela maslinovog ulja. U maslinovom ulju prisutno je više vrsta ugljikovodika, a to su terpenški, steroidni i policiklički ugljikovodici. Najzastupljeniji su terpenški ugljikovodici. Frakcija terpenških ugljikovodika sastavljena je od niza spojeva koji mogu služiti kao indikatori kakvoće proizvoda i prehrambenih svojstava.

Najzastupljeniji terpenški ugljikovodici u maslinovom ulju su skvalen i  $\beta$ -karoten. Skvalen je nezasićeni ugljikovodik s 30 atoma ugljika. Ima ulogu kao prekursor biosinteze sterola. Preostali dio ugljikovodika čine zasićeni alifatski ugljikovodici i produkti neoformacije koji potječu od sterola.<sup>11,18</sup>

#### Tokoferoli

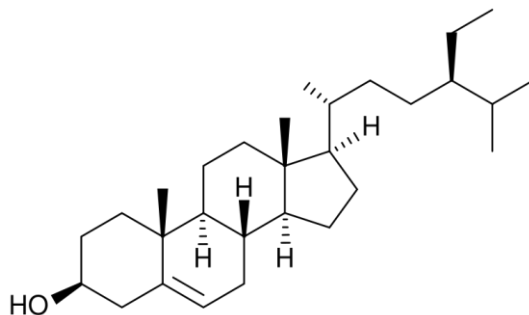
Tokoferoli imaju antioksidacijsko djelovanje i inhibiraju proces oksidacijskog kvarenja ulja. Prosječni udio tokoferola u maslinovom ulju iznosi 150-330 mg/kg. U najvećem iznosu je zastupljen  $\alpha$ -oblik tokoferola (vitamin E) (slika 9), koji ima najznačajniju biološku aktivnost. Uz  $\alpha$ -tokoferol u maslinovom ulju se još nalaze  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol.<sup>18</sup>



**Slika 9.** Strukturna formula vitamina E<sup>20</sup>

## Steroli

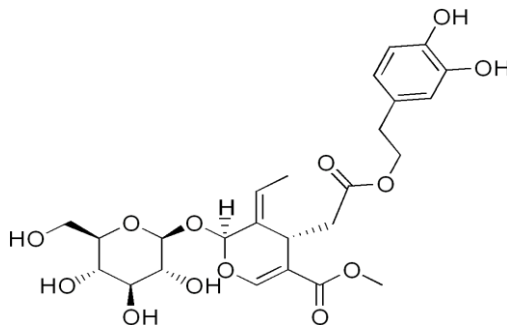
Steroli prisutni u maslinovom ulju pripadaju skupini fitosterola, a najvažniji je  $\beta$ -sitosterol (slika 10) koji ima važnu biološku ulogu jer smanjuje crijevnu apsorpciju viška kolesterola. Osim njega u ulju se nalaze: kampesterol, kampestanol, stigmasterol, klerosterol, sitostanol,  $\Delta 5$ -avenasterol,  $\Delta 5$ -24-stigmastadienol,  $\Delta 7$ -stigmasterol,  $\Delta 7$ -avenasterol,  $\Delta 7$ -kampesterol i kolesterol.<sup>11,18</sup>



**Slika 10.** Strukturna formula  $\beta$ -sitosterola<sup>21</sup>

## Fenoli

Fenoli su aromatski spojevi kod kojih je hidroksilna skupina (-OH) direktno vezana za aromatsku jezgru. Mogu biti slobodni ili vezani u kompleksne spojeve koji se starenjem ulja razgrađuju te značajno utječu na povećanu oksidacijsku stabilnost ulja. Prirodna maslinova ulja, a naročito ekstra djevičansko maslinovo ulje, sadrže značajnu količinu polifenolnih spojeva (50-500 mg/kg). Kod rafiniranih ulja to nije slučaj budući da se u procesu rafinacije gube prirodni fenolni spojevi. Polifenoli imaju izraženo antioksidacijsko djelovanje, veliku biološku i prehrambenu vrijednost, štite ulje od procesa kvarenja i odgovorni su za okus ulja. Glavni polifenolni spoj je oleuropein (slika 11) koji maslinovom ulju daje karakterističnu pikantnost. Tijekom zrenja ploda količina oleuropeina se smanjuje.<sup>11,18</sup>



**Slika 11.** Strukturna formula oleuropeina<sup>22</sup>

## Pigmenti

Pigmenti koji se nalaze u maslinovom ulju su klorofil, feofitin i karotenoidi. Oni su važni za kvalitetu proizvoda. Klorofil je zeleni pigment koji maslinovom ulju daje karakterističnu boju. Maslinovo ulje sadrži sivozeleni klorofil a i žutozeleni klorofil b te feofitin a i feofitin b koji su smeđe boje. Klorofil se lako razgrađuje u feofitin. Svježe maslinovo ulje sadrži 0-10 mg/kg klorofila i 0,2-24 mg/kg feofitina. U tami ovi pigmenti djeluju kao antioksidansi, dok u prisutnosti svjetla pospješuju oksidaciju ulja. Zbog toga je maslinovo ulje potrebno čuvati u tamnim, dobro zatvorenim bocama, bez prisutnosti zraka i svjetla te pri prikladnim temperaturama. Od karotenoida najznačajniji su  $\beta$ -karoten i likopen te oksidirani derivati karotena (ksantofili). U maslinovom ulju ukupan udio karotenoida (izražen kao  $\beta$ -karoten) je 0,5-10 mg/kg ulja.<sup>11,18</sup>

## Alifatski alkoholi

Alifatski alkoholi su prisutni u maslinovom ulju kao slobodni ili esterificirani. Ovi spojevi imaju ulogu biogenetskih posrednika (intermedijara) u transformacijama koje se odnose na skvalen i koje prethode nastajanju sterola.<sup>18</sup>

## Hlapljivi spojevi

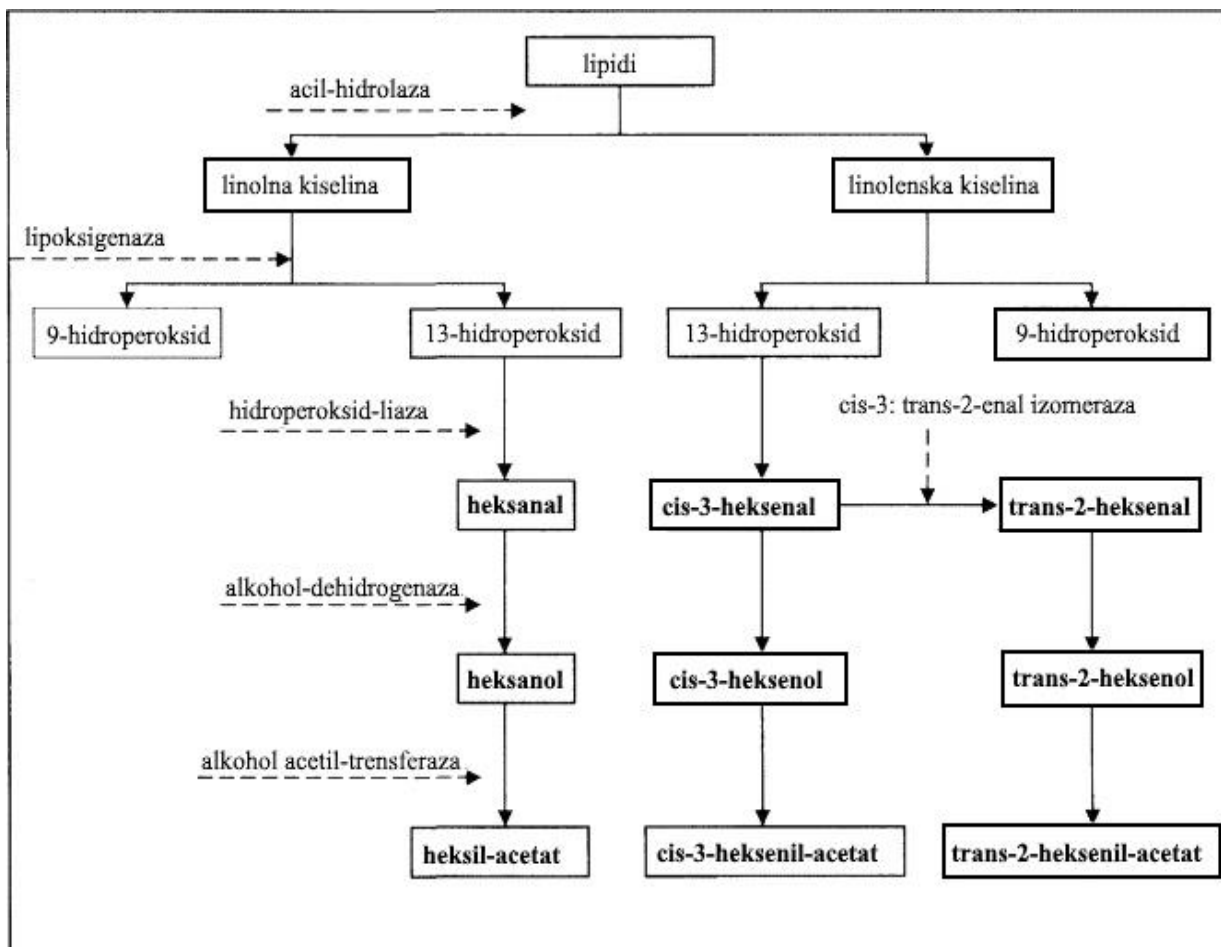
Aromu maslinovog ulja predstavlja složena smjese hlapljivih spojeva, koji uključuju uglavnom aldehide, alkohole, ketone i estere. Sastav hlapljivih spojeva ovisi o sorti, stupnju zrenja plodova i uvjetima obrade. Do sada je utvrđeno prisustvo više od 120 hlapljivih spojeva koji pozitivno ili negativno doprinose mirisu maslinovog ulja. Međutim, posebna i osjetljiva aroma djevičanskog maslinovog ulja prvenstveno se pripisuje C<sub>6</sub> i C<sub>5</sub> hlapljivim spojevima.

Najzastupljeniji C<sub>6</sub> hlapljivi spojevi su: *E*-heks-2-enal, heksanal, heksanol, *Z*-heks-3-en-1-ol, *E*-heks-3-en-1-ol, *E*-heks-2-en-1-ol, heksil-acetat, a od C<sub>5</sub> spojeva to su: *E*-pent-2-enal, *Z*-pent-2-en-1-ol, pentan-3-on, pent-1-en-3-on. Keton pent-1-en-3-on ima osjetilne karakteristike maslinovog ulja tipa "ljuto" i "gorko", a alkoholi su nositelji aroma koje se opisuju kao "voćno", "zeleno" i "aromatično". *E*-Heks-2-enal je povezan s "zelenim", "voćnim" i "gorkim" senzornim osobinama ulja, dok heksanal pridonosi senzornim karakteristikama koje se opisuju kao "zelena jabuka" i "zelena trava". Ester heksil-acetat je značajan po slatkim i voćnim notama.<sup>23</sup>

Enzimaska oksidacija maslinovog ulja, posebno putem enzima lipoksigenaze (LOX), smatra se odgovornom za formiranje arome maslinovog ulja.

Lipoksigenazni biosintetski put (slika 12) započinje oslobađanjem enzima kada se ošteti tkivo ploda masline tijekom procesa prerade. U reakcijama lipoksigenaznog biosintetskog puta sudjeluju enzimi koji oksidiraju (lipoksigenaza) i cijepaju (hidroperoksid-liaza) polinezasićene masne kiseline pri čemu nastaju aldehidi. Aldehidi se zatim oksidiraju do alkohola (alkohol-dehidrogenaza), a oni se prevode u estere (alkohol-aciltransferaza). U prvom koraku formiranja hlapljivih spojeva, lipaze (triacilglicerol-hidrolaze) hidroliziraju trigliceride te se oslobađaju slobodne masne kiseline. Zatim slijedi oksidacija dvostruko i višestruko nezasićenih masnih kiselina, prvenstveno linolne i linolenske kiseline, do hidroperoksida (9- i 13-hidroperoksida) uz pomoć enzima lipoksigenaze. Enzim hidroperoksid-liaza katalizira cijepanje hidroperoksida, s tim da izoforma enzima koja koristi 13-hidroperokside kao supstrat katalizira nastajanje hlapljivih C<sub>6</sub> aldehida koji su odgovorni za “zelenu” aromu. Cijepanjem 13-hidroperoksida nastaje zasićeni aldehyd heksanal iz linolne kiseline i nezasićeni aldehyd *cis*-3-heksenal iz linolenske kiseline.

Nezasićeni aldehyd *cis*-3-heksenal je nestabilan brzo izomerizira do stabilnog spoja *trans*-2-heksenala uz pomoć *cis*-3:*trans*-2-enal-izomeraze. Potom alkohol-dehidrogenaza katalizira reverzibilnu redukciju alifatskih aldehida u alkohole. Općenito, alkohol-dehidrogenaza je rasprostranjena u biljnom carstvu i odgovorna je za stvaranje hlapljivih alkohola koji doprinose biljnoj aromi. U konačnici, djelovanjem enzima alkohol acetil-transferaze nastaju hlapljivi acetatni esteri.<sup>24</sup>



**Slika 12.** Lipoksigenazni put biosinteze glavnih hlapljivih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima<sup>24</sup>

Poznavanje biosintetskog puta kojim nastaju hlapljivi spojevi djevičanskog maslinovog ulja važno je za poboljšanje njegovih senzorskih svojstava. Poticanje aktivnosti ili inhibicija enzima u određenoj fazi lipoksigenaznog puta rezultira povećanjem koncentracije poželjnih hlapljivih spojeva.<sup>3</sup>

## **1.7. Metode izolacije hlapljivih spojeva**

### **1.7.1. Destilacija**

Destilacija je postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para odvodi i hlađenjem kondenzira (ukapljuje). Svrha destilacije je čišćenje tekućih tvari, razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta, otparavanje organskih otapala i identifikacija tekućih tvari (određivanje vrelišta).<sup>25</sup> Destilacija ima niz prednosti u odnosu na ostale metode izolacije hlapljivih spojeva (npr. ekstrakciju), a glavna je što destilat ne sadrži nehlapljive tvari koje mogu interferirati i ometati daljnju analizu.

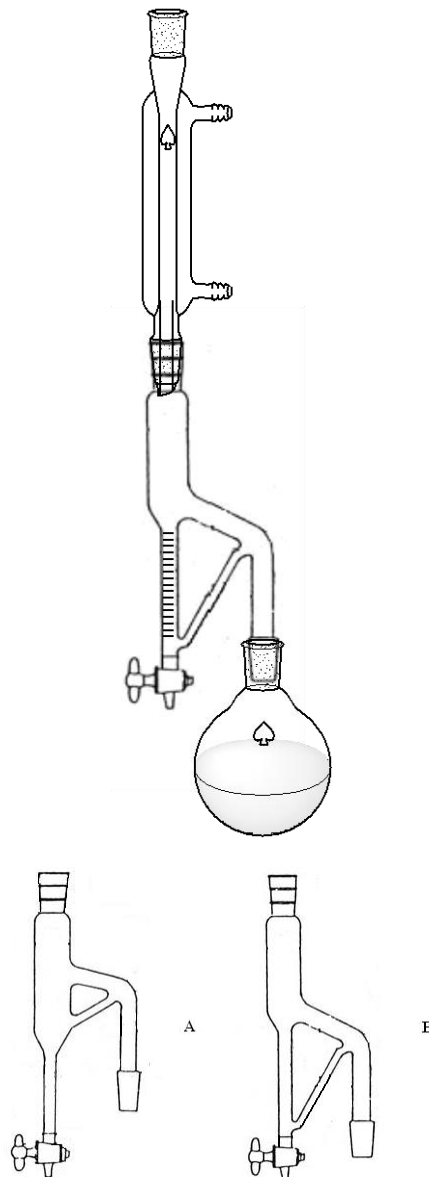
Za izolaciju hlapljivih spojeva koriste se tri vrste hidrodestilacije:

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

Sve tri vrste hidrodestilacije temelje se na istom teorijskom principu, a razlika je u kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.

#### **Vodena destilacija**

Vodena destilacija se najčešće koristi za izolaciju hlapljivih spojeva kao što su eterična ulja. Usitnjeni biljni materijal se postavlja u tikvicu s vodom koja se zagrijava do ključanja (najčešće na atmosferskom tlaku). Pare hlapljivih spojeva i vode se kondenziraju u hladilu i sakupljaju u središnjem dijelu aparature. Postoje različite izvedbe aparatura, a među ostalim se mogu razlikovati ovisno da li se koriste za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode. Standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura prema Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji, aparatura prema Clevengeru (slika 13) i razne modifikacije navedenih aparatura.



**Slika 13.** Aparatura prema Clevengeru sa nastavcima za destilaciju eteričnih ulja: **A** – za ulja manje gustoće od vode, **B** – za ulja veće gustoće od vode. Na vrh nastavka postavlja se hladilo, a na bočnu cijev nastavka postavlja se tikvica s biljnim materijalom i vodom.<sup>26</sup>

### Vodeno-parna destilacija

Kod vodeno-parne destilacije biljni materijal je postavljen na perforiranoj podlozi na određenoj udaljenosti od dna kotla koje je ispunjeno vodom (biljni materijal se nalazi neposredno iznad vode). Voda se grije, a zasićena, vlažna para niskog tlaka podiže se kroz biljni materijal. Biljni materijal je u kontaktu samo sa parom, a ne i sa kipućom vodom. Ova metoda se pretežito koristi u industriji, a rjeđe u laboratoriju.<sup>26</sup>



## **Destilacija vodenom parom (parna destilacija)**

Destilacija s vodenom parom se, općenito, primjenjuje se za izolaciju neke tvari iz smjese i za čišćenje organskih tvari visokog vrelišta. Osim toga pogodna je za izolaciju eteričnih ulja ili za izolaciju hlapljivih tvari prisutnih u niskoj koncentraciji u supstratu. Vodena para se proizvodi izvan destilacijskog kotla, u generatoru vodene pare, i dovodi u kotao s biljnim materijalom pregrijana i pod povišenim tlakom. Prednost parne destilacije je smanjena mogućnost toplinske razgradnje i nastajanja artefakata.<sup>25,26</sup>

### **1.7.2. Ekstrakcija**

Ekstrakcija je metoda za pročišćavanje i za izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće (ekstrakcija tekuće-tekuće) ili iz čvrste faze (ekstrakcija čvrsto-tekuće), organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

- mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima,
- tvar koja se ekstrahira mora imati što bolju topljivost u tom otapalu,
- otopina iz koje se ekstrahira željena tvar i otapalo moraju se što više razlikovati u gustoći,
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije, moglo lako ukloniti,
- otapalo mora biti što manje zapaljivo, otrovno i jeftino.

Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju su: dietil-eter, kloroform, petroleter i diklormetan, pentan i heksan.

#### **Ekstrakcija tekuće-tekuće**

Najjednostavnija ekstrakcija tekuće-tekuće, koja se naziva i izmućkavanje, izvodi se u lijevku za odjeljivanje. Izmućkavanjem otopine s nekim otapalom s kojim se ona ne miješa stvara se velika dodirna površina između dvije tekuće faze i povećava uspješnost ekstrakcije. Učinak ekstrakcije je bolji ako se ona provodi više puta s manjom količinom otapala, nego jedanput upotrebom ukupne količine otapala.<sup>25</sup>

Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (engl. *ultrasound-assisted solvent extraction*, USE) je veoma jednostavna i učinkovita alternativa konvencionalnim ekstrakcijskim tehnikama. Primjenom ultrazvuka ubrzavaju se procesi difuzije i omogućeno je jednostavnije istjecanje sastojka iz stanica. Metoda je brza i učinkovita, koristi male količine otapala i provodi se pri relativno niskim temperaturama (oko 25 °C). Ultrazvučna ekstrakcija, kao i izmućavanje u lijevku za odjeljivanje, je diskontinuirana metoda.

Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće provodi se u komercijalno dostupnim ekstraktorima. Ekstraktori se razlikuju po izvedbi, ovisno o tome da li su namijenjeni za ekstrakciju otapalom težim ili lakšim od vode.

### **Ekstrakcija čvrsto-tekuće**

Ekstrakcija organskih tvari iz čvrste faze izvodi se pri sobnoj temperaturi ili pri povišenoj temperaturi. Ekstrakcija pri povišenoj temperaturi može se izvesti zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim vodenim hladilom (refluksiranje), a zatim se još vruća otopina dekantira ili filtrira, a dobiveni ekstrakt se dalje obrađuje. Kontinuirana ekstrakcije tekuće-tekuće izvodi se pri povišenoj temperature (temperaturi vrenja otapala), u aparaturama različite izvedbe, od kojih je najčešća aparatura po Soxhletu.<sup>25</sup>

### **1.7.3. Sorpcijske tehnike**

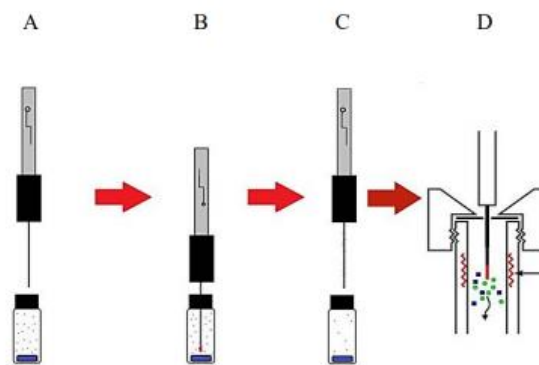
Sorpcijske tehnike su tehnike koje omogućavaju brzu ekstrakciju bez korištenja otapala i predkoncentraciju aromatičnih spojeva. Temelje se na razdiobi organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. Najčešće sorpcijske tehnike su mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću.<sup>26</sup>

#### **1.7.3.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi**

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME) je tehnika koja se često upotrebljava kod izolacije aromatičnih tvari. Ova tehnika koristi vlakno, najčešće silkonsko (1 ili 2 cm dugo), prekriveno polimernim filmom za

adsorpciju (sakupljanje) hlapljivih spojeva iz uzoraka. Na tržištu postoji široki raspon vlakana od nepolarnih, miješanih do polarnih.

Vlakno se nalazi u sastavu igle koja je postavljena na SPME držač za uzorkovanje i desorpciju (slika 14). Uzorak se postavlja u SPME posudu, tzv. vialicu, koja se zatvara septom i zagrijava (A). Tijekom zagrijavanja u prostoru iznad uzorka sakupljaju se hlapljivi spojevi, tzv. vršne pare. Potom se igla s vlaknom uvodi u prostor iznad uzorka i na vlakno se adsorbiraju hlapljivi spojevi, odnosno vršne pare (B). Zatim se igla uvlači u držač, izvlači iz posude s uzorkom (C) i umeće u injektor plinskog kromatografa gdje se vršne pare desorbiraju (D) i analiziraju. SPME vlakno se rekondicionira zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa.<sup>26</sup>



**Slika 14.** Shematski prikaz mikroekstakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)<sup>3</sup>

Prednosti HS-SPME tehnike:

- brza i laka uporaba,
- ne koristi se otapalo,
- dobra tehnika za brzu usporedbu uzoraka (najbolji rezultati za usporedbu se dobivaju upotrebom istog vlakna na svim uzorcima),
- dobra tehnika za detekciju i identifikaciju nepoželjnih hlapljivih spojeva u uzorku.

Nedostatci HS-SPME tehnike:

- aromatični profil sakupljenih hlapljivih spojeva ovisan je o vrsti, debljini i dužini korištenog vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja,

- neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve.<sup>26</sup>

## **1.8. Analiza hlapljivih spojeva**

### **1.8.1. Kromatografija**

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese na temelju različite raspodjele komponenata između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne). Naziv kromatografija potječe od ruskog botaničara i biokemičara Mihaila Semjonoviča Cveta koji ju je uveo 1906. godine za odjeljivanje biljnih boja.<sup>27</sup>

Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevina, a mobilna kapljevina ili plin. Mobilna faza putuje preko ili uzduž stacionarne faze pod utjecajem kapilarnih sila, sile teže, razlike tlakova i sl. Kromatografski proces se temelji na uspostavljanju ravnoteže nekog spoja između mobilne i stacionarne faze, a kako se mobilna faza kreće dolazi do narušavanja ravnoteže i gibanja spoja u smjeru mobilne faze. Budući da svaki spoj ima specifičnu interakciju s mobilnom i stacionarnom fazom, različiti spojevi će putovati različitim brzinama i tako se odjeljivati.<sup>25</sup>

Podjela kromatografije s obzirom na agregacijsko stanje pokretne faze je na:

- plinsku kromatografiju i
- tekućinsku kromatografiju.

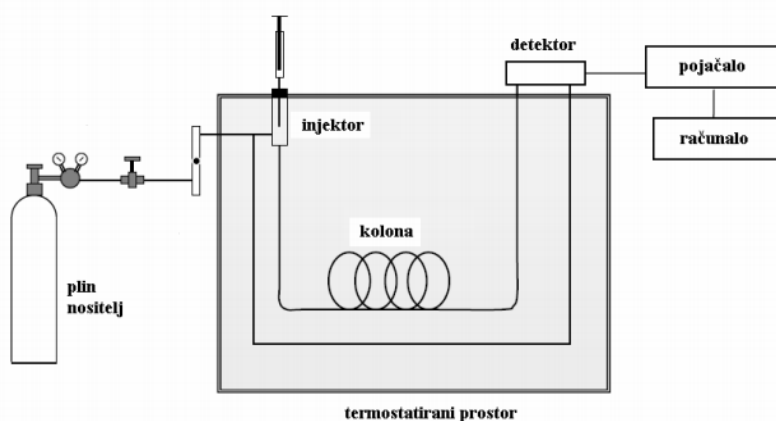
Kod plinske kromatografije pokretna je faza inertni plin, a kod tekućinske kromatografije pokretna je faza tekućina male viskoznosti.<sup>27</sup>

#### **1.8.1.1. Plinska kromatografija**

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena tehnika za odjeljivanje hlapljivih spojeva.

Plinski kromatograf se sastoji od injekcijskog bloka, kromatografske kolone sa stacionarnom fazom u termostatiranom prostoru, detektora, pojačala i računala (slika 15).<sup>25</sup>

Uzorci za plinsko-kromatografsku analizu moraju biti hlapljivi, kako bi trenutno isparili u injektoru, ali i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Pokretnu fazu čini kemijski inertan plin: argon, helij, dušik ili ugljikov dioksid. Nepokretna je faza nehlapljiva tekućina koja je nanosena na unutarnju stijenku kolone kapilarnih dimenzija. Uzorak se, pomoću injekcijske šprice, brzo injektira kroz gumenu pregradu u kolonu. Zatim uzorak zajedno s pokretnom fazom, prolazi kroz kolonu zadanom brzinom protoka, pri čemu se komponente razdvajaju, do detektora koji je spojen na računalo na kojem se prikazuje kromatogram.<sup>25,27</sup>



**Slika 15.** Shematski prikaz plinskog kromatografa<sup>25</sup>

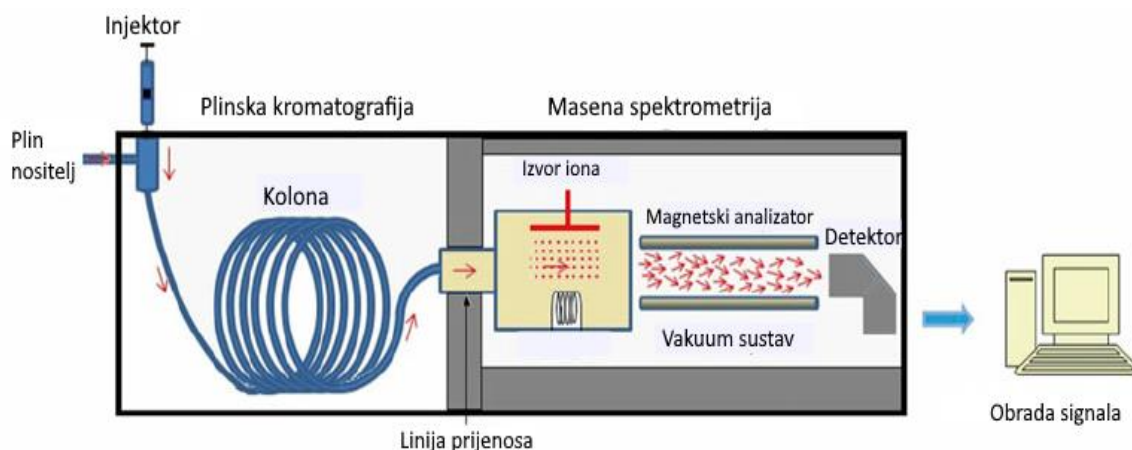
Detektor plinskog kromatografa je uređaj koji može temeljem fizikalnih ili kemijskih promjena registrirati prisutnost eluiranih komponenata. GC detektori mogu biti:

- plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID),
- detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD),
- plamenofotometrijski detektor (engl. *Flame Photometric Detector*, FPD),
- fotoionizacijski detektor (engl. *Photo-Ionization Detector*, PID),
- detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD),
- spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS).

Najveći broj podataka potrebnih za identifikaciju i određivanje strukture složenih organskih molekula pruža detektor spektrometar masa. Spektrometrija masa je analitička metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a pritom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi, odnosno prema omjeru mase i naboja. To je metoda strukturne analize, tj. metoda identifikacije ispitivane tvari jer je spektar masa karakterističan za pojedinu tvar. 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.<sup>25</sup>

### 1.8.1.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) (slika 16) koristi se za analizu smjesa hlapljivih spojeva, odnosno njihova razdvajanje i strukturnu analizu, uz korištenje minimalne količine uzorka.<sup>28</sup>



**Slika 16.** Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometar masa (GC-MS)<sup>29</sup>

Plinska kromatografija i spektrometrija masa su dvije metode idealne za povezivanje jer se vrlo dobro nadopunjuju. Plinska kromatografija je vrlo uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje, dok je spektrometrija masa vrlo pogodna za kvalitativnu analizu pa služi kao vrlo osjetljiv detektor za plinski kromatograf. Obje metode su vrlo osjetljive te se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost instrumenata u redu pikogramskih, pa čak i femtogramskih količina uzoraka. Tako

velika osjetljivost se danas ne može postići niti jednom poznatom tehnikom pa ova kombinacija zauzima posebno mjesto među analitičkim tehnikama koje se koriste za istraživanje hlapljivih spojeva.<sup>28</sup>

## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1. Materijal**

Maslinovo ulje korišteno u ovom istraživanju proizvedeno je za kućnu upotrebu iz maslina uzgojenih na području Drašnica (srednja Dalmacija – Makarsko primorje).

### **2.2. Kemikalije i aparatura**

Kemikalije:

- pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrijev klorid, p.a., Fluka Chemie, Švicarska.

Aparature korištena u radu:

- aparatura za vodenu destilaciju (modificirana aparatura po Clevenger-u, Deotto lab d.o.o., Hrvatska)
- magnetska miješalica, model EKT 3001 s termostatom i temperaturnom probom MR Hei-Standard, Heidolph, Njemačka
- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), sa SPME vlaknom PDMS/DVB (polidimetilsiloksan/ divinilbenzen), Supelco, SAD
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), Agilent Technologies, Santa Clara, SAD: plinski kromatograf model 8890 i spektrometar masa model 5977E

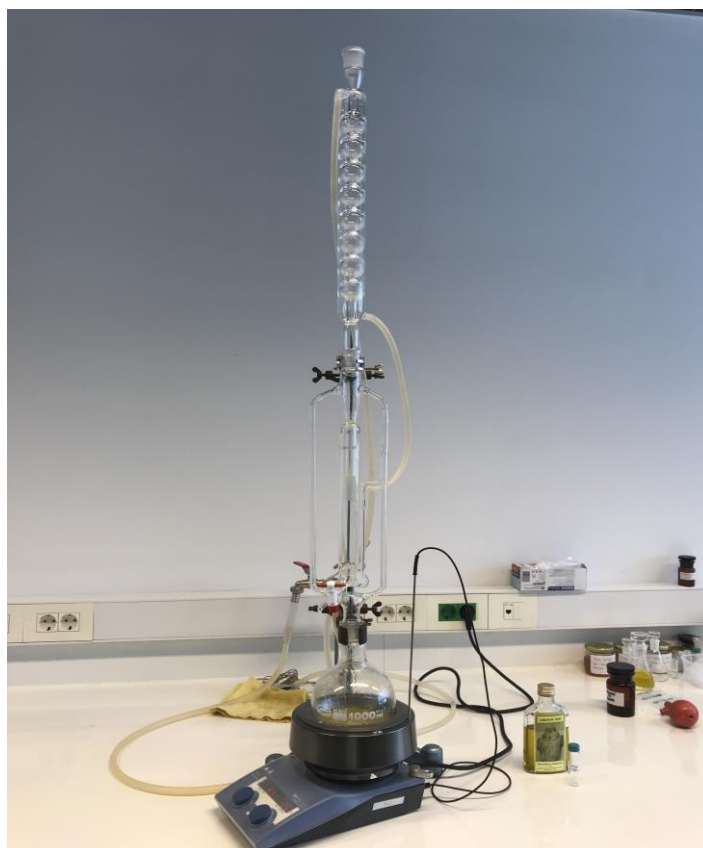
### **2.3. Izolacija hlapljivih spojeva**

Hlapljivi spojevi iz maslinovog ulja izolirani su metodama vodene destilacije i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Vodenom destilacijom dobiven je destilat u kojem su sadržani hlapljivi spojevi, a mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi dobiven je uzorak hlapljivih spojeva koji se naziva vršnim parama.



### 2.3.1. Vodena destilacija

Izolacija hlapljivih spojeva maslinovog ulja izvedena je vodenom destilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 17).



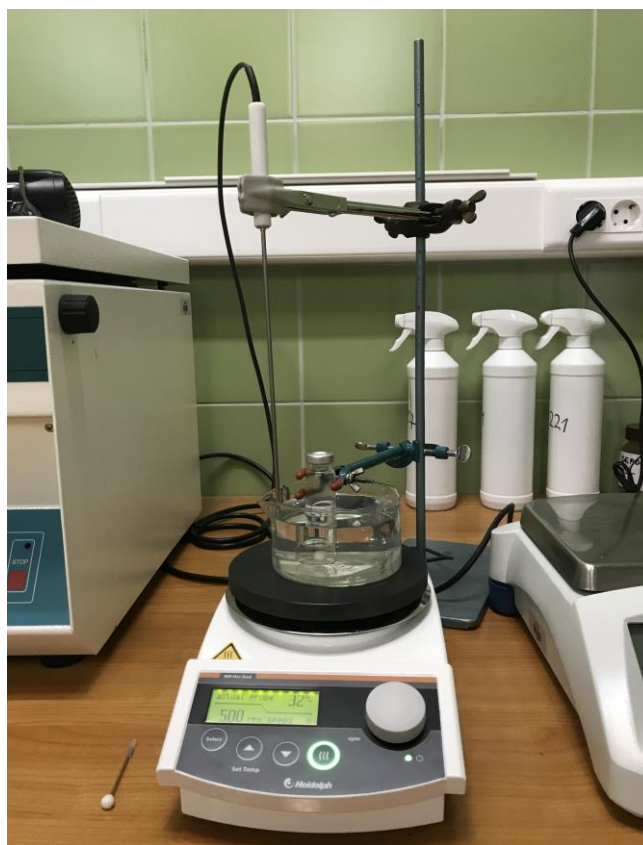
**Slika 17.** Vodena destilacija

U tikvicu s okruglim dnom (1000 ml) stavljeno je 31,5 mL uzorka maslinovog ulja te je dodano 150 ml destilirane vode i magnetići za miješanje. Tikvica je postavljena na grijaći blok za okruglu tikvicu od 1000 mL koji je postavljen na magnetsku miješalicu. Na tikvicu je vertikalno postavljen središnji dio aparature po Clevengeru. U središnji dio aparature je dodana destilirana voda i organsko otapalo pentan. Pentan služi za ekstrakciju hlapljivih spojeva čime se umanjuje mogućnost njihovog gubitka zbog djelomične topljivosti u vodi. Na aparaturu je postavljeno vodeno hladilo po Allinhu. Nakon sastavljanja aparature uspostavljen je odgovarajući protok vode i uključeno je grijanje i miješanje. Destilacija je trajala 2,5 sata. Tijekom destilacije hlapljivi spojevi su se, zajedno sa vodenom parom, uzdizali kroz bočne

cijevi aparature do hladila gdje su se kondenzirali i sakupljali u središnjem dijelu aparature. Po završetku destilacije i nakon hlađenja aparature, s aparature je uklonjeno hladilo. Organski sloj je, pažljivo, pomoću kapaljke odijeljen od vodenog sloja. Uzorak je koncentriran, odnosno otapalo je otpareno te je uzorak čuvan u hermetički zatvorenoj bočici u hladnjaku pri temp. od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do GC-MS analize.

### 2.3.2. Mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi

U staklenu bočicu, tzv. vialicu, od 15 mL stavljeno je 2 g maslinovog ulja, 1 g NaCl i magnetić za miješanje. Vialica je hermetički zatvorena PTFE/silikon septom te postavljena u vodenu kupelj temperature  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a sadržaj u njoj je miješan pomoću magnetske miješalice (slika 18).



**Slika 18.** Kondicioniranje uzorka: vialica s uzorkom u vodenoj kupelji postavljenoj na magnetskoj miješalici

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, vlakno (ružičasto) je aktivirano kondicioniranjem 30 min na 250 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka.

Kondicioniranje uzorka, odnosno sakupljanja hlapljivih spojeva-vršnih para u praznom prostoru iznad uzorka trajalo je 15 min. Nakon toga SPME igla s vlaknom je uvedena u vialicu s uzorkom, a vlakno je izvučeno te je provedeno uzorkovanje (adsorpcija) vršnih para u vremenu od 40 min uz konstantnu brzinu miješanja uzorka (1000 o/min). Nakon uzorkovanja, vlakno je vraćeno u iglu, igla je izvučena iz vialice i odmah umetnuta u GC-MS injektor. Toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu pri temperaturi od 250 °C trajala je 7 minuta.

#### 2.4. GC - MS analiza hlapljivih spojeva

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva, destilata i vršnih para, provedena je plinskom kromatografijom – spektrometrijom masa (GC - MS). Pri tome je korišten vezani sustav GC - MS proizvođača Agilent Technologies. Uređaj se sastoji od plinskog kromatografa 8890 i spektrometra masa 5977E (slika 19).



**Slika 19.** Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Analize su izvršene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS, 5% difenil-95% dimetilpolisilo ksan), proizvođača Agilent Technologies dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljine stacionarne faze 0,20  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj je helij protoka 1 mL/min, omjer cijepanja 1:50, temperatura injektora iznosila je 250 °C, temperatura detektora 280 °C, a energija ionizacije 70 eV.

Temperatura peći je programirana kako slijedi: 3 min izotermno pri 70 °C, zatim zagrijavanje od 70 °C do 200 °C brzinom od 3 °C/min i zadržavanje od 2 min pri 200 °C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara (Wiley9 i NIST17) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Za svaki uzorak analiziran GC-MS sustavom dobiveni su sljedeći rezultati:

- kromatogram ukupne ionske struje
- vrijeme zadržavanja svakog sastojka (na kromatogramu predstavljeno pikom)
- relativni udio pojedinog sastojka izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini) i
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbliži spektru nepoznate komponente (sličnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postotcima).<sup>28</sup>

### 3. REZULTATI

#### 3.1. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Hlapljivi spojevi (spojevi arome) izolirani su iz maslinovog ulja dvjema metodama, vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) (poglavlje 2.3.). Dobivena su dva uzorka, destilat i vršne pare. Uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS, a rezultati analiza su prikazani u tablicama 3 i 4. Spojevi u tablicama poredani su prema redoslijedu eluiranja (vremenu zadržavanja) sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (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

\* - točan izomer nije određen

<sup>a</sup> – spoj identificiran samo na temelju masenog spektra, odnosno usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i NIST17 biblioteka masenih spektara.

**Tablica 3.** Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u destilatu maslinovog ulja

Red. broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%)
1.	ksilen* <sup>a</sup>	4,21	0,4
2.	propan-1,2,3-triol (glicerol) <sup>a</sup>	5,67	6,5
3.	2,4-dihidroksi-2,5-dimetil-3(2H)furan-3-on <sup>a</sup>	6,12	0,9
4.	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimen	8,17	0,8
5.	3-hidroksi-2-metil-4H-piran-4-on <sup>a</sup>	9,04	2,0
6.	nonanal	10,20	0,4
7.	4,8-dimetilnona-1,3,7-trien <sup>a</sup>	10,64	1,0

8.	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi- 6-metil-4H-piran-4-on <sup>a</sup>	11,62	2,1
9.	5-(hidroksimetil)furfural	15,05	9,7
10.	$\alpha$ -kopaen	21,31	1,9
11.	$\alpha$ -murolen	26,35	0,7
12.	$\alpha$ -farnezen*	26,68	0,8
13.	seskviterpenski CH	32,13	1,0
14.	heksadekanska kiselina	42,68	4,1
15.	<i>cis</i> -oktadeka-9-enska kiselina	48,50	62,5
Identificirano			94,8

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

Red. broj	Spoj	$t_R$ (min)	Udio (%)
1.	octena kiselina	1,52	4,8
2.	pentan-3-on	1,95	0,9
3.	butanska kiselina	2,37	0,6
4.	pent-2-en-1-ol*	2,41	0,5
5.	heksanal	2,71	2,9
6.	<i>trans</i> -heks-2-enal*	3,40	32,3
7.	<i>trans</i> -heks-2-en-1-ol*	3,56	18,0
8.	ksilen* <sup>a</sup>	3,70	0,9
9.	5-etil-2(5H)furanon <sup>a</sup>	5,49	2,1
10.	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimen	8,17	3,1
11.	4,8-dimetilnona-1,3,7-trien* <sup>a</sup>	10,64	7,3
12.	$\alpha$ -kopaen	21,31	0,9
13.	<i>cis</i> -oktadeka-9-enska kiselina	48,50	7,1
Identificirano			81,4

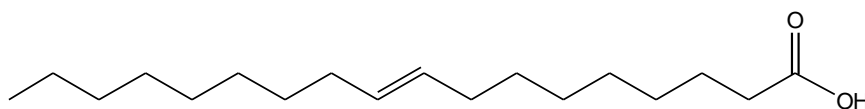
## 4. RASPRAVA

Maslina (*Olea europea* L.) je jedna od najpoznatijih voćki mediteranskog podneblja te se smatra najstarijom kultiviranom biljnom vrstom. Iz ploda masline dobiva se maslinovo ulje. Jedinstvena aroma maslinovog ulja pripisuje se hlapljivim spojevima koji nastaju tijekom i nakon izolacije ulja iz plodova masline.

Cilj ovog rada bio je istražiti hlapljive spojeve, odnosno spojeve arome maslinovog ulja, proizvedenog za kućne potrebe iz maslina uzgojenih na području Drašnica (srednja Dalmacija – Makarsko primorje). Istraživanje se sastojalo od izolacije hlapljivih spojeva te njihove analize tj. određivanja kemijskog sastava i udjela pojedinih spojeva u smjesi hlapljivih spojeva. Za izolaciju su korištene dvije metode, vodena destilacija i mikoroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Na taj su način dobivena dva uzorka hlapljivih spojeva, destilat i vršne pare. Oba uzorka su analizirana vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), a rezultati analiza su prikazani u tablicama 3 i 4.

### 4.1. Hlapljivi spojevi destilata

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u destilatu maslinovog ulja prikazan je u tablici 3. U destilatu je identificirano petnaest (15) spojeva što predstavlja 94,8 % od ukupnih hlapljivih spojeva. U destilatu dominira jedan sastojak, a to je *cis*-oktadeka-9-enska kiselina (62,5 %), trivijalnog imena oleinska kiselina (slika 20). Oleinska kiselina je mononezasićena (jedna dvostruka veza) C<sub>18</sub> masna kiselina.

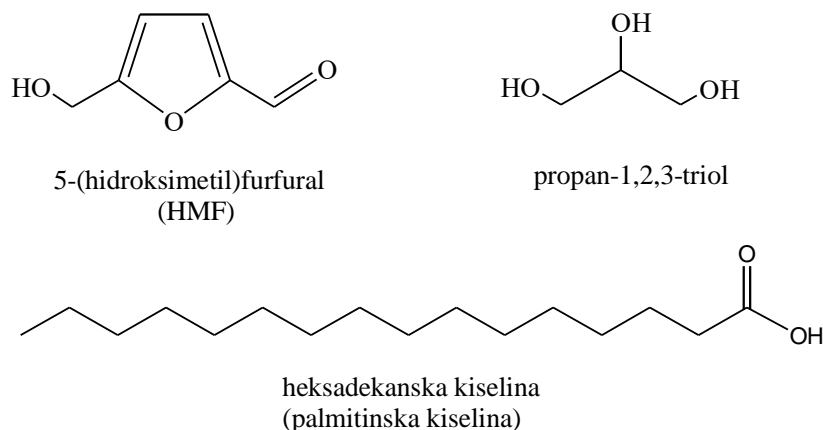


oktadec-9-enska kiselina  
(oleinska kiselina)

**Slika 20.** Oleinska kiselina

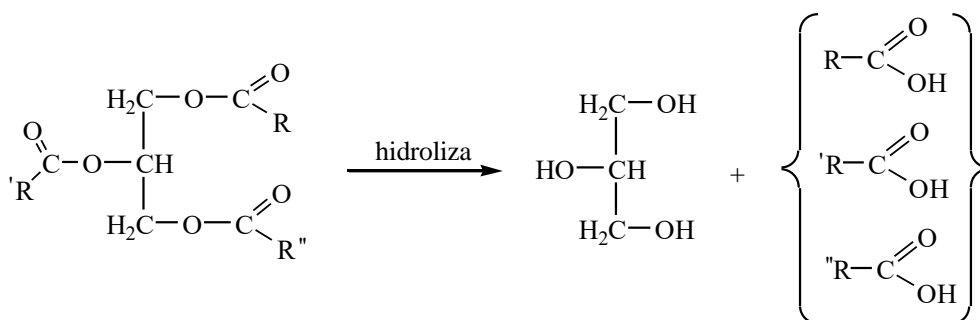
Ostali kvantitativno značajni sastojci destilata su 5-(hidroksimetil)furfural (9,7 %), propan-1,2,3-triol, trivijalnog imena glicerol (6,5 %) i heksadekanska kiselina, trivijalno palmitinska kiselina (4,1 %) (slika 21). U destilatu su identificirana dva derivata pirana, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on (2,1 %) i 3-hidroksi-2-metil-4H-piran-4-on (2,0 %). Od

terpenskih spojeva identificirana su četiri spoja, monoterpenski ugljikovodik *trans*- $\beta$ -ocimen (0,9 %) te seskviterpenski ugljikovodici  $\alpha$ -kopaen (1,9 %),  $\alpha$ -murolen (0,7 %) i  $\alpha$ -farnezen (0,8 %).



**Slika 21.** Kvantitativno značajni sastojci destilata

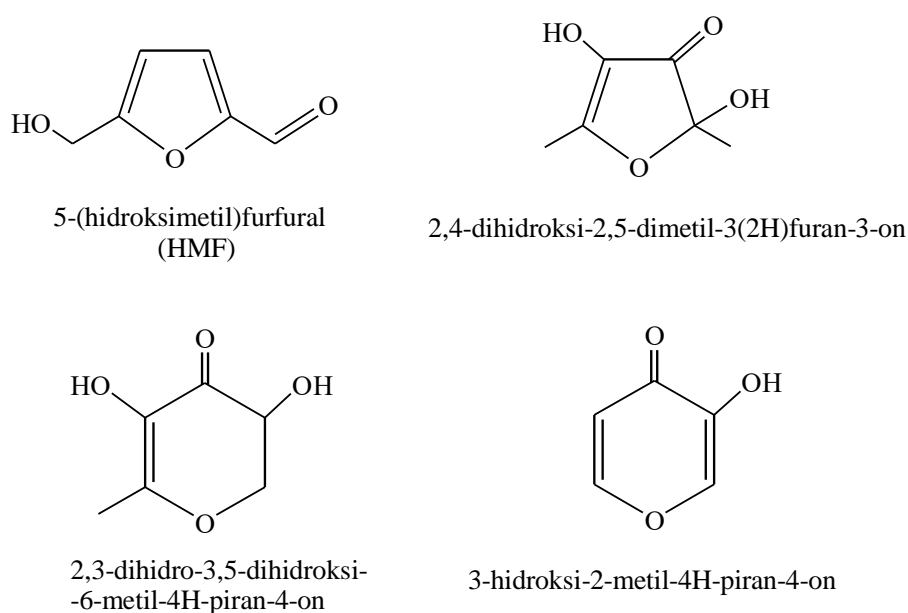
Izuzetno visoki udio oleinske kiseline u destilatu, 62,5 %, te prisustvo trovalentnog alkohola glicerola ukazuje da je tijekom izolacije vjerojatno došlo do hidrolize triglicerida maslinovog ulja (slika 22). Poznato je da je oleinska kiselina najzastupljenija masna kiselina u trigliceridima maslinovog ulja. Jedan dio od ukupnog udjela oleinske kiseline vjerojatno se odnosi na slobodnu oleinsku kiselinu, s obzirom da je identificirana i u vršnim parama maslinovog ulja. Međutim kako se radi o destilatu, tj. uzorku hlapljivih spojeva dobivenih vodenom destilacijom, dakle grijanjem uzorka na temperaturi od oko 100 °C uz dodatak vode, ne začuđuje ovako visok udio oleinske kiseline i prisustvo alkohola glicerola. Najzastupljenija zasićena masna kiselina u trigliceridima maslinovog ulja je palmitinska kiselina (heksadekanska kiselina) koja je također identificirana u destilatu.



**Slika 22.** Shematski prikaz reakcije hidrolize triglicerida



Nadalje u uzorku su identificirani spojevi, derivati furana i pirana, koji nastaju zagrijavanjem hrane. Najzastupljeniji među njima je 5-(hidroksimetil)furfural, a slijede 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on, 3-hidroksi-2-metil-4H-piran-4-on i 2,4-dihidroksi-2,5-dimetil-3(2H)furan-3-on (slika 23). 5-(Hidroksimetil)furfural (HMF) je spoj koji se smatra glavnim toplinskim artefaktom i pokazatelj je nepravilnog postupanja s uzorkom, npr. zagrijavanja uzorka, ali i starenja. HMF je vjerojatno nastao tijekom prerade maslina usljed zagrijavanja, a možda i tijekom čuvanja ulja ako temperatura nije bila primjerena.

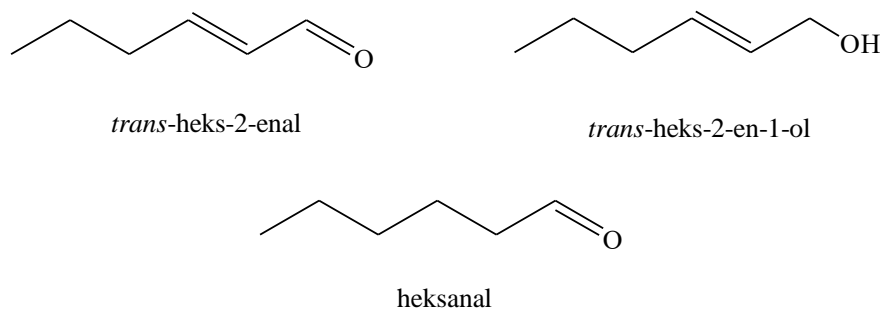


**Slika 23.** Derivati furana i pirana u destilatu

## 4.2. Hlapljivi spojevi vršnih para

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama maslinovog ulja dan je u tablici 4. U vršnim parama maslinovog ulja izoliranim korištenjem plavog vlakna identificirano je trinaest (13) spojeva, što predstavlja 81,4 % od ukupnih hlapljivih spojeva.

Glavni sastojci vršnih para su C<sub>6</sub> spojevi, aldehid *trans*-heks-2-enal (32,3 %) i alkohol *trans*-heks-2-en-1-ol (18,0 %) (slika 24). Kvantitativno značajni sastojci ovog uzorka su nezasićeni ugljikovodik 4,8-dimetilnona-1,3,7-trien (7,3 %) i *cis*-oktadeka-9-enska kiselina (oleinska kis., 7,1 %) te octena kiselina (4,8 %) Za razliku od destilata u uzorku su identificirana dva terpena, *trans*- $\beta$ -ocimen (3,1 %) i  $\alpha$ -kopaen (0,9 %).



**Slika 24.** C<sub>6</sub> spojevi vršnih para maslinovog ulja

Glavni sastojci vršnih para, aldehyd *trans*-heks-2-enal i alkohol *trans*-heks-2-en-1-ol, spadaju u skupinu tzv. "zelenih" hlapljivih spojeva. To su spojevi koji čine arome koja se opisuju kao zelene, arome zelene trave i lišća. *trans*-Heks-2-enal je glavni hlapljivi spoj u većini europskih ekstradjevičanskih maslinovih ulja.<sup>24</sup> U vršnim parama identificiran je još jedan predstavnik ove skupine spojeva, zasićeni C<sub>6</sub> aldehyd heksanal (2,9 %) (slika 24). Ukupan udio navedenih spojeva u vršnim parama je 53,2 %. Oni nastaju iz masnih kiselina linolne i linolenske kiseline u slijedu biokemijskih reakcija koje čine lipoksigenazni biosintetski put. Iz linolenske kiseline nastaje nezasićeni aldehyd *trans*-heks-2-enal, a zasićeni aldehyd heksanal nastaje iz linolne kiseline. Redukcijom *trans*-heks-2-enala nastaje odgovarajući alkohol *trans*-heks-2-en-1-ol (poglavlje 1.6.1.2., slika 11). Spojevi zelene arome nisu identificirani u destilatu istraživanog maslinovog ulja.

Prisustvo dviju karboksilnih kiselina, octene (4,8 %) i butanske kiseline (0,6 %), nije poželjno u aromi maslinovog ulja. Octena kiselina nastaje mikrobnom fermentacijom, a butanska ili maslačna kiselina ukazuje na moguće oksidacijsko kvarenje ulja (ranketljivost).<sup>24</sup>

Usporedbom dobivenih rezultata GC-MS analiza destilata i vršnih para maslinovog ulja može se zaključiti da vodena destilacija nije najbolji izbor za ovakvu vrstu analize. Zbog grijanja uzorka na temperaturi od oko 100 °C uz dodatak vode dolazi do hidrolize triglicerida maslinovog ulja, odnosno nastanka artefakata.

HS-SPME metoda je bolja metoda za izolaciju spojeva arome maslinovog ulja jer omogućuje uzorkovanje i analizu spojeva koji se smatraju nositeljima poželjnih aroma maslinovog ulja, a to su prvenstveno C<sub>6</sub> aldehydi i alkoholi. Međutim mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi ima i nedostatke kao što su ograničeni volumen vialice u koji se može smjestiti relativno malo uzorka (2-3 mL ili 2-3 g) te vrijeme i temperatura uzorkovanja, što omogućuju uzorkovanje i analizu samo hlapljivijih spojeva. Istraživanja svakako treba nastaviti korištenjem različitih vlakana kao i mijenjanjem temperature i vremena uzorkovanja vršnih para.

## 5. ZAKLJUČAK

- Cilj rada bio je istražiti hlapljive spojeve, odnosno spojeve arome maslinovog ulja proizvedenog za kućne potrebe. Spojevi arome su izolirani dvjema metodama, vodenom destilacijom i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi te analizirani plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa.
- Glavni sastojak destilata maslinovog ulja je masna kiselina *cis*-oktadeka-9-enska kiselina ili oleinska kiselina. Izuzetno visoki udio oleinske kiseline u destilatu (62,5 %) te prisustvo trovalentnog alkohola glicerola (6,5 %) ukazuje da je tijekom izolacije vjerojatno došlo do hidrolize triglicerida maslinovog ulja.
- U destilatu su identificirani derivati furana i pirana, od kojih je najzastupljeniji 5-(hidroksimetil)furfural (HMF), a slijede 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4H-piran-4-on, 3-hidroksi-2-metil-4H-piran-4-on i 2,4-dihidroksi-2,5-dimetil-3(2H)furan-3-on. Derivati pirana i furana općenito nastaju zagrijavanjem hrane, a HMF se smatra glavnim toplinskim artefaktom.
- Glavni sastojci vršnih para maslinovog ulja su C<sub>6</sub> spojevi, nezasićeni aldehid *trans*-heks-2-enal i nezasićeni alkohol *trans*-heks-2-en-1-ol koji spadaju u skupinu tzv. "zelenih" hlapljivih spojeva, odnosno nositelji su tzv. "zelenih mirisnih nota". Ovi spojevi nastaju iz linolenske kiseline u lipoksigenaznom biosintetskom putu. Zasićeni C<sub>6</sub> aldehid heksanal, koji je također identificiran u vršnim parama, nastaje iz linolne kiseline.
- Udio oleinske kiseline u vršnim parama je znatno manji nego u destilatu, a glicerol u vršnim parama nije identificiran. Oleinska kiselina identificirana u vršnim parama je vjerojatno slobodna oleinska kiselina, a ne razgradni produkt hidrolize triglicerida.
- U destilatu maslinovog ulja nisu identificirani nositelji zelenih mirisnih nota, *trans*-heks-2-enal, *trans*-heks-2-en-1-ol i heksanal.

- Vodena destilacija nije najbolji izbor za izolaciju spojeva arome maslinovog ulja zbog hidrolize triglicerida maslinovog ulja i nastanka artefakata - razgradnih produkata hidrolize, oleinske kiseline i glicerola.
- HS-SPME metoda je bolja metoda za izolaciju spojeva arome maslinovog ulja te ta istraživanja treba nastaviti korištenjem različitih vlakana kao i mijenjanjem temperature i vremena uzorkovanja vršnih para.

## 6. LITERATURA

1. M. Žanetić, M. Gugić, *Pomologia Croatica* **11** (2005) 31-41.
2. K. S. Minioti, C. A. Georgiou, *Grasas Y Aceites* **61** (2010) 45-51.
3. B. Soldo, *Utjecaj lipoksigenaze na sastav hlapljivih tvari u maslinovom ulju autohtonih dalmatinskih sorti*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
4. URL: <https://blog.agrivi.com/hr/post/maslina-drvo-%C5%BEivota> (10.8.2020.)
5. URL: <https://prirodno-lijecenje.blogspot.com/2016/11/maslina-olea-europaea-l.html> (10.8.2020.)
6. D. Kantoci, *Glasnik Zaštite Bilja* **29** (2006) 4-14.
7. V. Majetić Germek, B. Vuković, B. Lukić, O. Koprivnjak, *Glasnik Zaštite Bilja* **42** (2019) 14-21.
8. T. Ročak, *Osnovne kemijske analize kakvoće istarskih maslinovih ulja*, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2005.
9. N. Tasić, *Flora mediterana sa osvrtom na maslinu*, Specijalistički rad, Fakultet za mediteranske poslovne studije, Tivat, 2015.
10. O. Koprivnjak, *Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola*, MIH, Poreč, 2006
11. T. Klepo, Đ. Benčić, *Glasnik Zaštite Bilja* (2014) 44-53.
12. URL: <https://www.agroportal.hr/maslinarstvo/1924> (15.8.2020.)
13. URL: <https://www.agroklub.com/vinogradarstvo/sortiment-najprofitabilnijih-maslina-u-hrvatskoj/10898/> (15.8.2020.)
14. URL: <http://www.maslinovoulje-hr.com/o-maslinama> (15.8.2020.)
15. URL: <https://agrobloghortikultura.wordpress.com/> (15.8.2020.)
16. Z. Šindrak, Đ. Benčić, S. Voća, A. Barberić, *Pomologia Croatica* **13** (2007) 17-29.
17. URL: <http://www.balija.eu/hr/ulje-balija/kusanje/kemijski-sastav/> (21.8.2020.)
18. M. Žanetić, M. Gugić, *Pomologia Croatica* **12** (2006) 159-173.
19. URL: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Trigliceridi> (21.8.2020.)
20. URL: [https://en.wikibooks.org/wiki/Structural\\_Biochemistry/Chemistry\\_of\\_important\\_organic\\_molecules\\_in\\_Biochemistry/Vitamin\\_E](https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Chemistry_of_important_organic_molecules_in_Biochemistry/Vitamin_E) (21.8.2020.)
21. URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sitosterol\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sitosterol_structure.svg) (21.8.2020.)
22. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Oleuropein> (21.8.2020.)
23. K. Brkić Bubola, O. Koprivnjak, B. Sladonja, I. Lukić, *Food Tehnol. Biotechnol.* **50** (2012) 192-198.

24. C. M. Kalua, M. S. Allen, D. R. Bedgood Jr, A. G. Bishop, P. D. Prenzler, K. Robards, *Food Chemistry* **100** (2007) 273-286.
25. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
26. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2011.
27. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 654-655.
28. A. Radonić, *Izolacija i indentifikacija slobodnih i glukozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.)*, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2000.
29. URL: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-plot-of-the-main-components-of-GC-MS-instruments\\_fig1\\_273955959](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-plot-of-the-main-components-of-GC-MS-instruments_fig1_273955959) (3.9.2020.)