

Primjena spektroskopskih metoda u analizi ulja

Laća, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:308072>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Katarina Laća

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

PRIMJENA SPEKTROSKOPSKIH METODA U ANALIZI ULJA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jana Pisk

Zagreb, 2020. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

10. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jana Pisk

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. SVOJSTVA MASLINOVOG ULJA.....	II
2.1. Maslinovo ulje –kemijski sastav i karakteristike	ii
§ 3. METODE KEMIJSKE ANALIZE MASLINOVOG ULJA.....	VI
3.1. Komercijalna analiza	vi
3.1.1. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina	vi
3.1.2. Određivanje peroksidnog broja	vi
3.1.3. Određivanje polifenola	vii
3.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	viii
3.2.1. Određivanje referentnih vrijednosti.....	ix
3.2.2. Pouzdanost FTIR analize	x
3.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom i UV-VIS spektroskopija ...	xii
3.3.1. Analizirane komponente.....	xii
3.3.2. FT-IR i UV-VIS spektri	xiii
3.3.3. Analiza podataka nakon obrade metodom najmanjih kvadrata.....	xvi
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	XVIII

§ Sažetak

Maslinovo ulje je jestivo ulje dobiveno iz pulpe ploda masline, stabla karakterističnog za mediteransko podneblje. Zbog blagotvornih utjecaja koje ekstra djevičansko maslinovo ulje ima na zdravlje, potražnja iz godine u godinu raste što je uzrokovalo i pojavu krivotvorenih uzoraka ulja na tržištu. S ciljem smanjivanja troškova (kultivacija maslina, troškovi prerade i skladištenja), ekstra djevičanskom maslinovom ulju se dodaju maslinova ulja lošije kvalitete, biljna ulja, pigmenti i pojačivači okusa. Takve adulteracije se nužno ne vide na komercijalnoj, spektrofotometrijskoj analizi maslinova ulja, već su potrebne naprednije tehnike. Spektroskopske metode analize, poput infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom i spektroskopije u vidljivom i ultraljubičastom području su se pokazale kao prikladne metode za određivanje kemijskog sastava maslinovog ulja. Dok pojedinačno daju zadovoljavajuće rezultate za pojedine komponente, kombinacijom tih dviju metoda moguće je dobiti vrlo precizne i točne rezultate analizom kojih se može dobiti uvid u klasifikaciju maslinovog ulja prema kemijskim svojstvima i prisutstvo adulteracija.

§ 1. UVOD

Maslinovo ulje je jestivo ulje dobiveno iz pulpe ploda masline, stabla karakterističnog za mediteransko podneblje. Boja i miris ulja ovisi o fazi u kojoj je plod masline u vrijeme prerade – ulje od zelenih, nedozrelih maslina će biti zelene boje, intenzivnijeg mirisa i oštrijeg okusa s naglašenom gorčinom, dok će ulje od zrelih, crnih maslina dati nešto blaže ulje, žuto-zlatne boje i voćnijeg okusa.

U 2019./2020. godini, na svijetu je proizvedeno 3 144 000 tona maslinovog ulja¹, a vodeći proizvođači su Španjolska, Grčka, Italija, Turska, Maroko, Sirija i Tunis.² Zbog blagotvornih utjecaja koje ekstra djevičansko maslinovo ulje ima na zdravlje, potražnja iz godine u godinu raste. Nažalost, to je uzrokovalo i pojavu krivotvorenih uzoraka ulja na tržištu. S ciljem smanjivanja troškova (kultivacija maslina, troškovi prerade i skladištenja), maslinovom ulju se dodaju druga biljna ulja, pigmenti i pojačivači okusa. Takve adulteracije se nužno ne vide na komercijalnoj, spektrofotometrijskoj analizi maslinova ulja, već su potrebne naprednije tehnike.

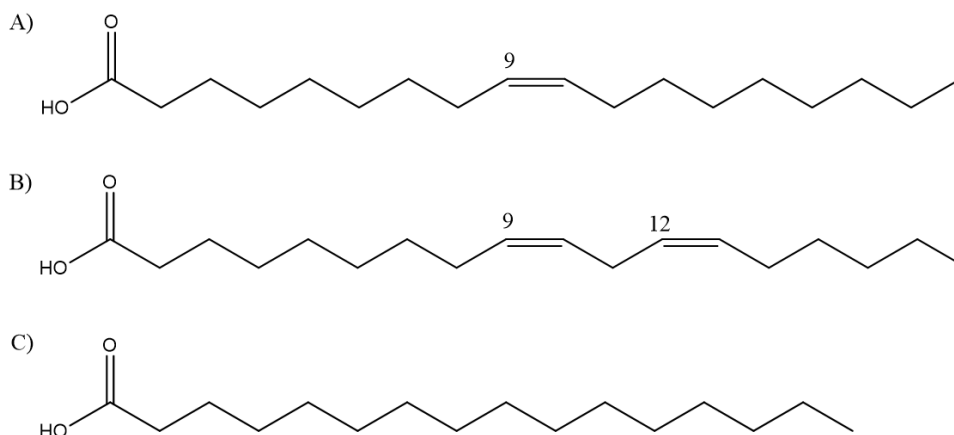
§ 2. SVOJSTVA MASLINOVOG ULJA

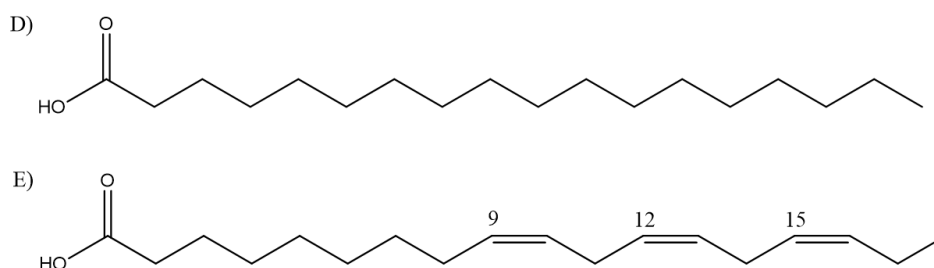
2.1. Maslinovo ulje –kemijski sastav i karakteristike

Što se tiče kemijskog sastava, maslinovo ulje se sastoji uglavnom od triglicerida, prirodnih estera masnih kiselina i trovalentnog alkohola glicerola (propan-1,2,3-triol). Biološka važnost maslinovog ulja leži u raznolikosti masnih kiselina u sastavu triglicerida, tako je analizom ulja dobiveno 25 različitih masnih kiselina. Za razliku od masti životinjskog podrijetla koje sadrže samo zasićene masne kiseline, maslinovo ulje, kao i gotovo sva biljna i riblja ulja, sadrži i nezasićene masne kiseline od kojih je najzastupljenija oleinska kiselina, mononezasićena omega-9 masna kiselina s lancem od 18 ugljikovih atoma.³

Tablica 1: Masne kiseline koje se najčešće pojavljuju u trigliceridima u maslinovom ulju⁴

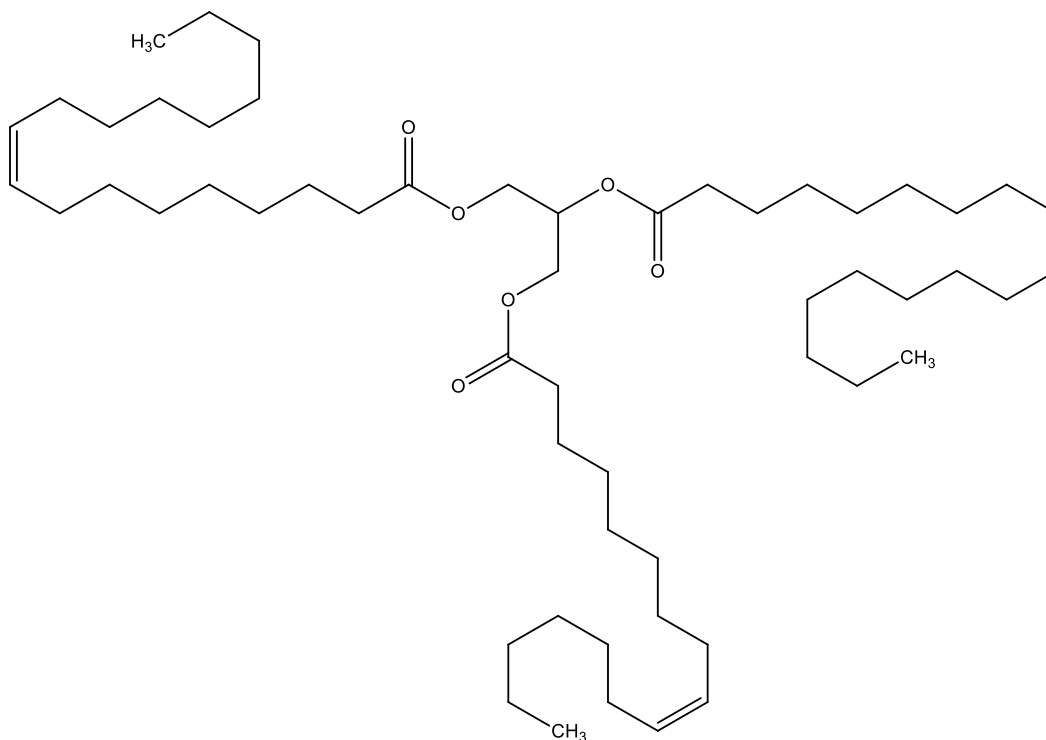
masna kiselina	kemijska formula	broj dvostrukih veza	položaj dvostruke veze	postotak u ukupnom sastavu
oleinska	$C_{18}H_{34}O_2$	1	omega-9	55 – 83%
linolna	$C_{18}H_{32}O_2$	2	omega-6	3,5 – 21%
palmitinska	$C_{16}H_{32}O_2$	0	/	7,5 – 21%
stearinska	$C_{18}H_{36}O_2$	0	/	0,5 – 5%
α -linolenska	$C_{18}H_{30}O_2$	3	omega-3	0 – 1,5%





Slika 1. strukture najzastupljenijih masnih kiselina u sastavu maslinovog ulja; A) oleinska, B) linolna, C) palmitinska, C) stearinska, E) α -linolenska kiselina

Najčešće kombinacije u trigliceridima su tri oleinske masne kiseline, zatim dvije oleinske i jedna palmitinska, i dvije oleinske i jedna linolna masna kiselina.



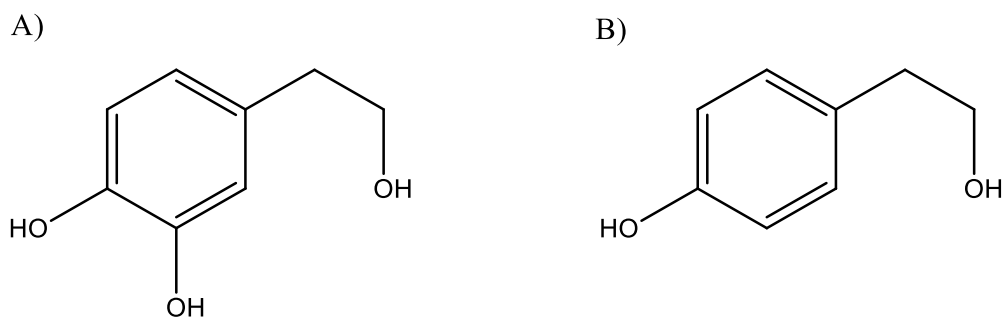
Slika 2) Triolein, simetrični triglicerid dobiven od glicerola i tri oleinske masne kiseline

Osim triglicerida, maslinovo ulje sadrži i manje količine slobodnih masnih kiselina, polifenola, tokoferola, sterola, fosfatida, pigmenta i flavonoida.⁵ Slobodne masne kiseline nastaju hidrolizom i lipolizom triglicerida i važno su mjerilo kvalitete. Do povećane koncentracije slobodnih masnih kiselina može doći ukoliko su masline sazrijevale u

neuobičajenim ekstremnim uvjetima, ali češće je to pokazatelj nepravilnog skladištenja ploda i nekvalitetne prerade.

Drugo važno mjerilo kvalitete maslinovog ulja je koncentracija peroksida koji nastaje oksidacijom masnih kiselina. Oksidacija se može odvijati na tri načina: autooksidacija, fotooksidacija i termooksidacija. Autooksidacija je proces u kojem oksidaciju vrše slobodni radikali koji nastaju vezanjem kisika iz zraka na nezasićene masne kiseline. Fotooksidacija se odvija kad je uzorak izložen prirodnom ili umjetnom izvoru svjetlosti, a do termooksidacije dolazi kad je ulje izloženo visokim temperaturama, vodenoj pari i kisiku iz zraka. Sva tri procesa uzrokuju ubrzano starenje ulja i, budući da se oksidacijom uništavaju esencijalne masne kiseline poput linolne i linolinske, maslinovo ulje gubi nutritivnu vrijednost.³

Oksidaciju djelomično usporavaju antioksidansi, točnije polifenoli, koji su treće važno mjerilo kvalitete maslinovog ulja. Termin "polifenoli" se često koristi u opisivanju kemijskog sastava prirodnih proizvoda, a podrazumijeva spojeve koji se sastoje od benzenskog prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina i njihove funkcionalne derivate. Ti spojevi su odgovorni za oksidativnu stabilnost maslinovog ulja, a mogu se prepoznati i senzornom analizom – viša koncentracija polifenola daje ulju oštar, gorak okus. Najzastupljeniji iz skupine polifenola su hidroksitirozol i tirozol, a prikazani su na Slici 3.⁶



Slika 3. Najzastupljeniji spojevi iz skupine polifenola u maslinovom ulju; A) hidroksitirozol, B) tirozol

Ovisno o kemijskom sastavu, načinu dobivanja i organoleptičkim obilježjima, maslinovo ulje se dijeli na 6 kategorija:⁴

1. Djevičanska maslinova ulja
2. Rafinirano maslinovo ulje
3. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja
4. Sirovo ulje komine maslina
5. Rafinirano ulje komine maslina
6. Ulje komine maslina

Djevičanska maslinova ulja su ulja dobivena isključivo mehaničkim postupcima iz ploda masline i, s obzirom na količinu slobodnih masnih kiselina, dijele se na još 3 vrste:⁴

1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje – sadrži najviše 0,8 g slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 g ulja
2. Djevičansko maslinovo ulje – sadrži najviše 2,0 g slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 g ulja
3. Maslinovo ulje lampante – ulje neprihvatljivih organoleptičkih svojstava koje sadrži više od 2,0 g slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 g uzorka

§ 3. METODE KEMIJSKE ANALIZE MASLINOVOG ULJA

3.1. Komercijalna analiza

Komercijalna analiza maslinovog ulja se sastoji od spektrofotometrijskog određivanja koncentracija triju komponenti: masnih kiselina, peroksida i polifenola. Analiza je brza, praktična, zadovoljavajuće točnosti i cjenovno dostupna.

3.1.1. Određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina

Slobodne masne kiseline u uzorku maslinovog ulja se određuju kao masa oleinske kiseline u gramima na 100 g uzorka. Iako su prisutne i druge slobodne masne kiseline, oleinska je daleko najzastupljenija pa određivanje koncentracije samo slobodne oleinske masne kiseline daje rezultate zadovoljavajuće točnosti. Princip određivanja se temelji na interakcijama slobodnih masnih kiselina sa kromogenom pri $\text{pH} = 7,0$ pri čemu nastaje obojeni kompleks. Mjeri se apsorbancija tako obojenog uzorka pri valnoj duljini od 630 nm koja se pomoću Beer-Lambertovog zakona može preračunati u koncentraciju oleinske kiseline u uzorku:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

pri čemu je ε molarni apsorpcijski koeficijent vrste, l duljina kivete (put koji emitirana zraka mora prijeći kroz uzorak), a c koncentracija vrste. Ukoliko uzorak ima manje od 0,8 g slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 g uzorka, zadovoljava jedan od kriterija za klasifikaciju kao ekstra djevičansko maslinovo ulje.⁷

3.1.2. Određivanje peroksidnog broja

Oksidacija maslinovog ulja je proces koji započinje odmah pri preradi ulja, a podrazumijeva vezanje kisika iz zraka na masne kiseline čime nastaju hidroperoksidi, primarni produkti oksidacije i sekundarni produkti oksidacije (cikličke masne kiseline, konjugirani dieni, trieni itd.). Osim određivanja peroksidnog broja, može se mjeriti i K broj, odnosno koncentracija sekundarnih produkata oksidacije. Oksidacija značajno narušava kemijski sastav ulja, ali pravilnim skladištenjem ulja se može značajno usporiti. Povišena temperatura, uvjeti visoke vlažnosti, izlaganje svjetlu, prisutnost teških metala i razne nečistoće su neki od faktora koji uzrokuju rapidnu degradaciju ulja pospješujući oksidaciju.³

Peroksidni broj se određuje također spektrofotometrijski. Analiziranom uzorku maslinovog ulja se doda reagens koji sadrži Fe^{2+} ione pri čemu dolazi do redukcije peroksidnih mostova nastalih oksidacijom (R-O-O-R) i oksidacije željeza iz Fe^{2+} u Fe^{3+} ione koji imaju karakterističnu crvenu boju. Promjena boje uzrokuje promjenu apsorbancije koja je proporcionalna s koncentracijom peroksida u uzorku. Mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 505 nm i preračunava u količinu peroksida u uzorku koja se izražava kao $\text{m}_{\text{eq}}\text{O}_2/\text{kg}$, odnosno kao količina vezanog molekuskog kisika. Dijeljenjem dobivene vrijednosti u $\text{m}_{\text{eq}}\text{O}_2/\text{kg}$ sa dva, dobiva se vrijednost peroksidnog broja u mmol/kg. Ukoliko je vrijednost peroksidnog broja manja od 10, uzorak zadovoljava drugi kriterij za klasifikaciju kao ekstra djevičansko maslinovo ulje.⁷

3.1.3. Određivanje polifenola

Prirodni fenolni spojevi, u literaturi često nazivani polifenoli, su važna komponenta neosapunjivog dijela maslinovog ulja. Sadrže benzenski prsten, jednu ili više hidroksilnih skupina i različite funkcionalne skupine, a njihova uloga je antioksidativna – služe kao "hvatači" slobodnih radikala kisika koji u ulju mogu oksidirati masne kiseline, a u organizmu mogu narušavati strukturu DNA, lipidnih membrana, lipoproteina i slično. Najzastupljeniji polifenolni spojevi u maslinovom ulju su hidroksitirozol i tirozol. Dodatkom obojene alkoholne otopine koja sadrži kromogen u uzorak ulja, reakcijska smjesa se obezboji. Mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 505 nm i preračunava u količinu galne kiseline izražene u mg/kg, koja se izravno povezuje s koncentracijom polifenola u uzorku. Ukoliko je koncentracija galne kiseline nakon takve analize viša od 150 mg/kg, smatra se da je razina polifenola u analiziranom ulju visoka.^{3,6,7}

3.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Još jedna metoda za procjenu kvalitete ulja je FTIR spektroskopija koja omogućava brzu i preciznu analizu s minimalnom količinom otpadnog uzorka. IR spektroskopija se temelji na interakciji materije s infracrvenim zračenjem pri čemu će uzorak apsorbirati zračenje samo onih valnih duljina koje odgovaraju vibracijama i istezanjima veza u molekuli. Apsorpcijom zračenja odgovarajuće energije dolazi do pobude pripadajućih vibracija i rastezanja pojedinih funkcijskih skupina. Da bi vibracija bila vidljiva u IR spektru, apsorpcijom zračenja mora doći do promjene električnog dipolnog momenta. IR spektar je prikazan kao funkcija ovisnosti intenziteta apsorbancije i transmitancije o valnoj duljini.⁸ U tablici 2 prikazane su vrijednosti valne duljine, valnog broja i frekvencije za infracrveno područje.

Tablica 2: Vrijednosti valne duljine, valnog broja i frekvencije zračenja za infracrveno područje⁹

IR područje	valna duljina $\lambda / \mu\text{m}$	valni broj $\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	frekvencija ν / Hz
blisko	0.78 – 2.50	12 800 – 4 000	$3.8 \times 10^{14} - 1.2 \times 10^{14}$
srednje	2.50 – 50	4 000 – 200	$1.2 \times 10^{14} - 6.0 \times 10^{12}$
daleko	50 – 1 000	200 – 10	$6.0 \times 10^{12} - 3.0 \times 10^{12}$
uobičajeno	2.50 - 25	4 000 - 400	$1.2 \times 10^{14} - 2.0 \times 10^{13}$

IR spektrometar s Fourierovom transformacijom je češće korišten u analizi jestivih ulja jer pokriva veći dio spektra i može se nadograditi naprednim kemometričkim softverima za utočnjavanje kalibracije.¹⁰ U sljedećem poglavlju, predstavljena je metoda analize maslinovog ulja koristeći infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom.

Za validaciju podataka FT-IR analize, potrebno je prvo napraviti klasičnu analizu maslinovog ulja koristeći metode poput spektrofotometrije za određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina, ukupne količine polifenola, oksidacijskog broja i koncentracije pigmenta, konkretno klorofila i karotenoida. Ukoliko je prije kvantitativne analize potrebno izdvojiti promatranu komponentu iz smjese, koriste se kromatografske metode (npr. HPLC, plinska kromatografija). Uzorak istog maslinovog ulja se zatim podvrgne FT-IR analizi sa deuteriranim triglicin sulfatom kao detektorom (DTGS). Priloženi podatci su uzeti iz spektara snimljenih u srednjem infracrvenom području (valni broj: $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$), a rezultati su obrađeni korištenjem metode najmanjih kvadrata (eng. *partial least squares*, PLS).¹¹

3.2.1. Određivanje referentnih vrijednosti

Vrijednosti indeksa oksidativne stabilnosti (OS) mogu se odrediti korištenjem Rancimatove tehnike. Indeks oksidativne stabilnosti neposredno govori o količini polifenolnih spojeva u uzorku. Što je koncentracija takvih spojeva viša, uzorak bolje podnosi izlaganje kisiku, a polifenolni spojevi (ili antioksidansi) stanicama ljudskog organizma pomažu u borbi protiv oksidativnog stresa. Tehnika služi za određivanje ubrzanog starenja biljnih ulja, a metoda izvođenja se temelji na protoku zraka kroz staklenu kapilaru s uzorkom što uzrokuje ubranu oksidaciju masnih kiselina. Hlapljivi sekundarni produkti se strujanjem zraka odvođuju u kapilaru napunjenu najčešće deioniziranom vodom. Mjerenjem električne vodljivosti, određuje se količina sekundarnih produkata oksidacije.¹² Ukupna količina polifenola se najčešće određuje spektrofotometrijski, korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdata i fosfotvolframata, a koristi se za određivanje polifenolnih spojeva. Metoda koja koristi FC reagens se još naziva i *gallic acid equivalente method* jer se rezultati izražavaju kao količina galne kiseline (mg (galna kiselina)/kg (uzorak)).¹³ Daljnja analiza sastava polifenola se može provesti izdvajanjem iz smjese pomoću HPLC metode, zatim primjenom neke od kvantitativnih analitičkih metoda (npr. spektrofotometrija). Karotenoidi i klorofili se u uzorku određuju korištenjem UV spektrofotometrije. Slobodne masne kiseline u uzorku mogu biti određene plinskom kromatografijom, pri čemu je prethodno potrebno povrgnuti masne kiseline metilnoj esterifikaciji, zatim uzorak centrifugirati i kvantitativno analizirati nastale produkte u supernatantu.

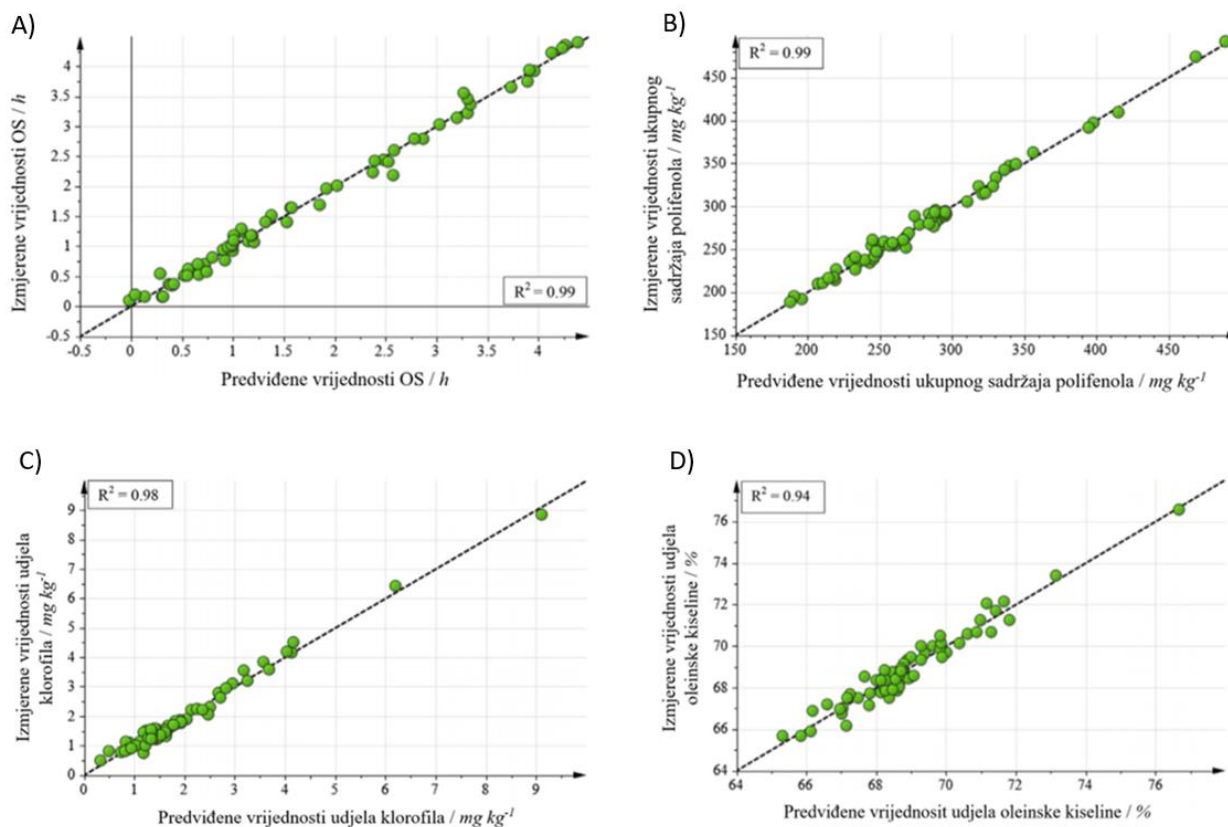
3.2.2. Pouzdanost FTIR analize

Nakon određivanja referentnih vrijednosti, uzorak je snimljen FTIR spektrometrom u srednjem dijelu infracrvenog spektra ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$). Dobiveni podaci su obrađeni korištenjem metode najmanjih kvadrata (PLS) i prikazani u tablici 3.¹¹

Tablica 3: Kemijski sastav uzorka maslinovog ulja dobiveni FTIR analizom u srednjem području infracrvenog spektra ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$)¹¹

	Konstituent	Srednja vrijednost / mg kg^{-1}	Raspon vrijednosti / mg kg^{-1}	PC	R^2_{calc}	R^2_{cv}	RMSEC	RMSECV
	OS (h)	1,72	0,10 - 4,41	5	0,99	0,81	0,11	0,68
Pigmenti (%)	klorofili	1,97	0,51 - 8,84	5	0,98	0,69	0,18	0,95
	karotenoidi	4,11	0,11 - 25,63	3	0,95	0,46	0,93	3,01
masne kiseline (%)	oleinska	68,88	65,66 - 76,59	4	0,94	0,81	0,44	0,97
	linolna	11,99	4,90 - 15,13	4	0,97	0,91	0,36	0,76
	palmitinska	13,41	10,35 - 15,22	4	0,87	0,70	0,35	0,55
	stearinska	2,98	2,42 - 3,94	4	0,61	0,35	0,24	0,31
	α -linolenska	0,32	0,24 - 0,83	4	0,09	0,00	0,08	0,08
	zasićene	17,32	13,51 - 19,93	4	0,91	0,79	0,35	0,61
	mononezasićene	70,66	66,91 - 78,61	4	0,94	0,82	0,45	0,93
polinezasićene	12,02	4,90 - 15,82	4	0,97	0,91	0,36	0,77	
Polifenoli (mg / kg)	ukupna količina	279,32	188,46 - 491,95	5	0,99	0,74	6,06	45,26
	hidroksitirosol	5,11	0,09 - 30,72	6	0,97	0,68	1,02	4,66
	tirosol	11,07	0,73 - 44,19	6	0,96	0,52	1,94	7,97

Kratice PC u tablici 1 označava glavne komponente (eng. *principal components*), odnosno broj komponenti uzet za obradu podataka. Raspon vrijednosti označava interval u kojem se nalaze dobivene vrijednosti za pojedine konstituente, dok srednja vrijednost (eng. *mean*) označava njihovu srednju vrijednost. R^2 predstavlja korelacijski koeficijent u PLS koji opisuje korelaciju i smjer linearne povezanosti između dviju komponenti. Što je vrijednost R^2 bliža 1, korelacija je bolja. R^2_{calc} vrijednost koeficijenta za kalibraciju, dok je R^2_{cv} vrijednost koeficijenta unakrsne provjere (eng. *cross-validation*). RMSEC i RMSECV (eng. *root mean square error of calibration* i *root mean square error of cross-validation*) označavaju srednju kvadratnu pogrešku kalibracije i unakrsne provjere. RMSEC i RMSECV ukazuju na pogrešku između mjerenih i očekivanih vrijednosti za kalibraciju i unakrsnu provjeru, stoga njihove vrijednosti trebaju biti slične i što bliže nuli.



Slika 4. Usporedba izmjerenih (referentnih) vrijednosti s vrijednostima predviđenima na temelju FTIR analize za; A) oksidativnu stabilnost, B) ukupni sadržaj polifenola, C) udio klorofila i D) oleinsku kiselinu¹¹

Usporedbom izračunatih vrijednosti i vrijednosti predviđenih na temelju FTIR analize, dobiveni su zadovoljavajući rezultati za većinu promatranih parametara. Analiza se pokazala pouzdana za određivanje nekih masnih kiselina poput oleinske, linolne, palmitinske i ukupne količine zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih kiselina. Što se tiče pigmenta, sadržaj klorofila je određen potpuno u skladu s referentnim vrijednostima, dok je sadržaj karotenoida određen s nešto manjom preciznošću. Oksidativna stabilnost je određivana pomoću FTIR analize, ali i pomoću kombinacije drugih izmjerenih parametara (količina polifenolnih spojeva, karotenoida itd.). FTIR analiza je dala gotovo nepogrješive rezultate, dok je model računanja indeksa oksidativne stabilnosti preko količine polifenolnih spojeva, masnih kiselina, klorofila i karotenoida dao aproksimativne rezultate. Analiza ukupne količine polifenola i količine hidroksitirosole je dala zadovoljavajuće rezultate, dok su količine drugih fenolnih spojeva (vanilna kiselina, cinaminska kiselina, kofeinska kiselina, p-kumarinska kiselina) određene s manjom preciznošću. Treba uzeti u obzir da je ipak uloga hidroksitirosole

u maslinovom ulju ključna za oksidativnu stabilnost, stoga je ova metoda i dalje pouzdana za određivanje OS, usprkos nešto slabijim rezultatima za ostale fenolne spojeve.¹¹

FTIR spektroskopija se pokazala brzom, učinkovitom i preciznom metodom za simultano određivanje važnih parametara kemijskog sastava maslinovog ulja s minimalnom količinom otpadnog uzorka. Ipak, za detekciju adulteracija maslinovog ulja, potrebno je koristiti još neku od spektroskopskih metoda.

3.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom i UV-VIS spektroskopija

Porastom potražnje za maslinovim uljem, došlo je do povećanja krivotvorenih uzoraka na tržištu što je nametnulo potrebu za preciznijim analizama pomoću kojih bi se mogle prepoznati adulteracije (npr. ulje komine maslina). Jedna od tih metoda je kombinacija FTIR i UV-VIS spektroskopskih analiza koja daje precizniji uvid u sastav analiziranog ulja.¹¹

UV-VIS spektroskopija je analitička metoda koja se temelji na interakciji molekula uzorka s elektromagnetskim zračenjem iz vidljivog i ultraljubičastog dijela spektra (700 – 10 nm). Rezultati su prikazani kao funkcija ovisnosti intenziteta apsorbancije o valnoj duljini. Kvantitativna analiza UV-VIS spektra se temelji na Beer-Lambertovom zakonu koji je opisan u poglavlju 3.1.¹⁴

3.3.1. Analizirane komponente

Za razliku od dosad spomenutih parametara (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, polifenoli), kao novi parametri procjenu kvalitete ulja uvedene su koncentracije pigmenta (karotenoidi, klorofil i derivati klorofila, feofitin a, feofitin b, β -karoten, luteini, ksantofili), diacilglicerola i estera alkohola i masnih kiselina.

Esteri alkohola i masnih kiselina nastaju reakcijom slobodnih masnih kiselina i nižih alkohola u kiselim uvjetima djelovanjem enzima. Ovisno o alkoholu koji sudjeluje u reakciji, nastaju esteri masnih kiselina i metanola (FAME) i esteri masnih kiselina i etanola (FAEE). Povišena koncentracija FAEE (> 35 mg(FAEE) / kg (uzorak)) ukazuje na lošiju kvalitetu ulja ili adulteracije rafiniranim maslinovim uljem.

Za određivanje ulja komine maslina u uzorku, mjeri se koncentracija voštanih estera koji nastaju esterifikacijom masnih kiselina i dugolančanih alkohola (voštanih alkohola),

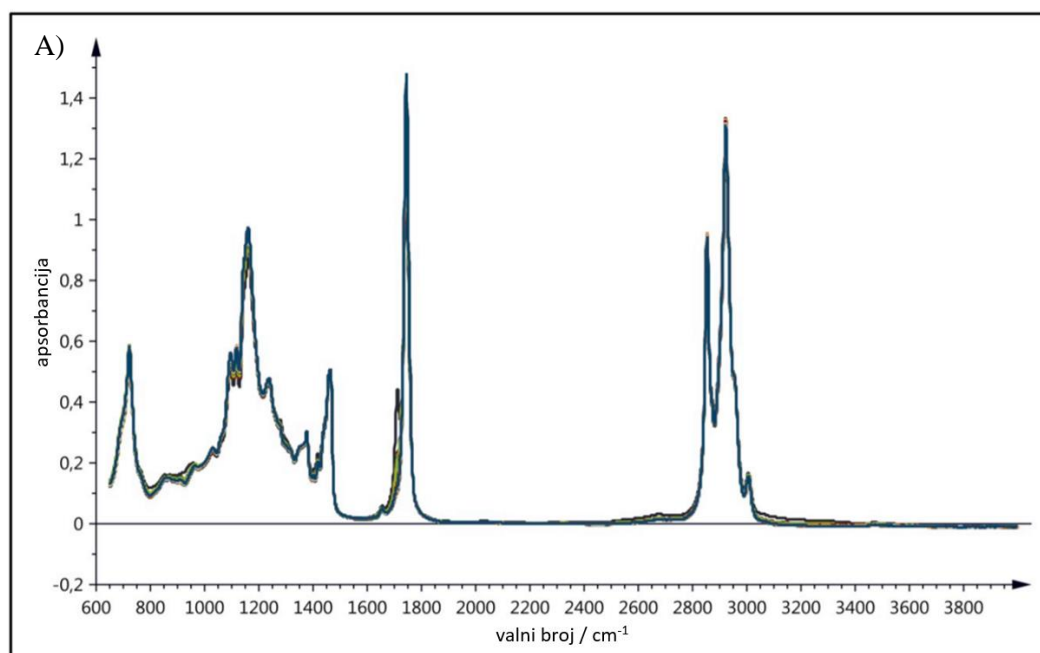
alkoholnih analoga masnih kiselina. Takvi alkoholi nastaju na površini (kori) ploda masline, stoga povišena koncentracija voštanih estera ukazuje da je uzorak onečišćen uljem komine maslina.^{15, 16}

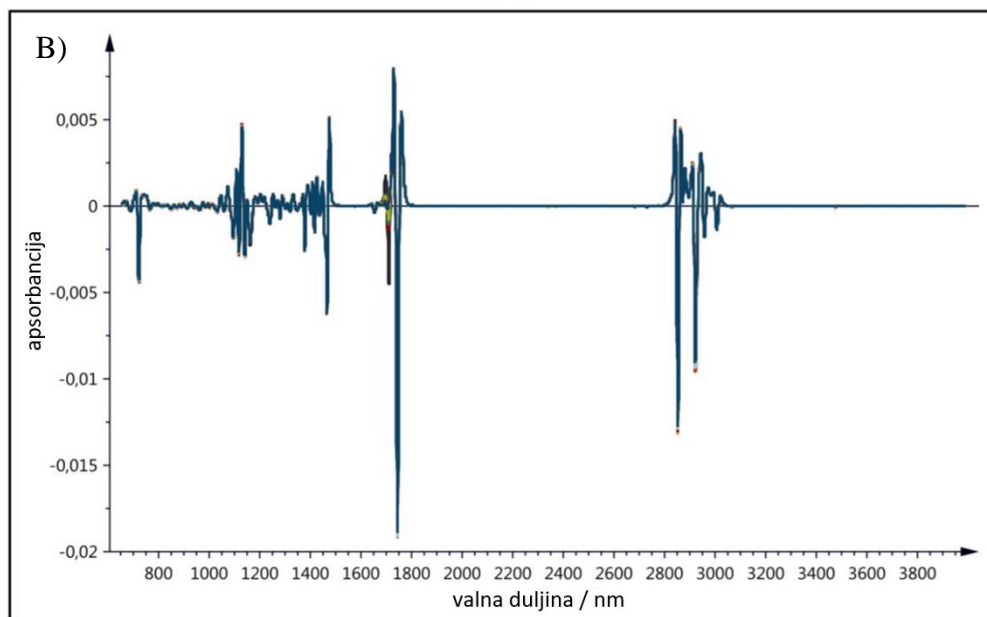
Diacilgliceroli (DAG) se u maslinovom ulju pojavljuju kao 1,2 DAG i 1,3 DAG izomeri. Da bi se maslinovo ulje svrstalo u kategoriju ekstra djevičanskog, mora sadržavati $\geq 35\%$ 1,2 izomera diacilglicerola.

Ukupna količina pigmenata i njihovi međusobni omjeri su još jedan od parametara za autentikaciju maslinovog ulja. Najzastupljeniji pigmenti u ulju su klorofili, karotenoidi, lutein, feofitini.¹⁵

3.3.2. FT-IR i UV-VIS spektri

Kombinacijom spektroskopije u srednjem dijelu infracrvenog spektra (valni broj 4000 – 650 cm^{-1}) s Fourierovom transformacijom i spektroskopije u ultraljubičastom i vidljivom području (valna duljina 200 – 800 nm), moguće je dobiti podatke o sastavu maslinovog ulja i detektirati prisutne adulteracije. Dobiveni podatci se mogu poboljšati predobradom podataka, npr. korištenjem prvih i drugih derivacija, čime se omogućava točnija identifikacija manjih i bliskih vrpca koji se u originalnom spektru teže razaznaju.¹⁷ Također se koristi i multiplikativna korekcija raspršenja (eng. *multiplicative scatter correction*, MSC) koja služi za korekciju, tj. kompenzaciju aditivnih i/li multiplikativnih efekata u podacima dobivenim spektroskopijom.¹⁸ Primjeri spektara su prikazani na slici 5 i 6.

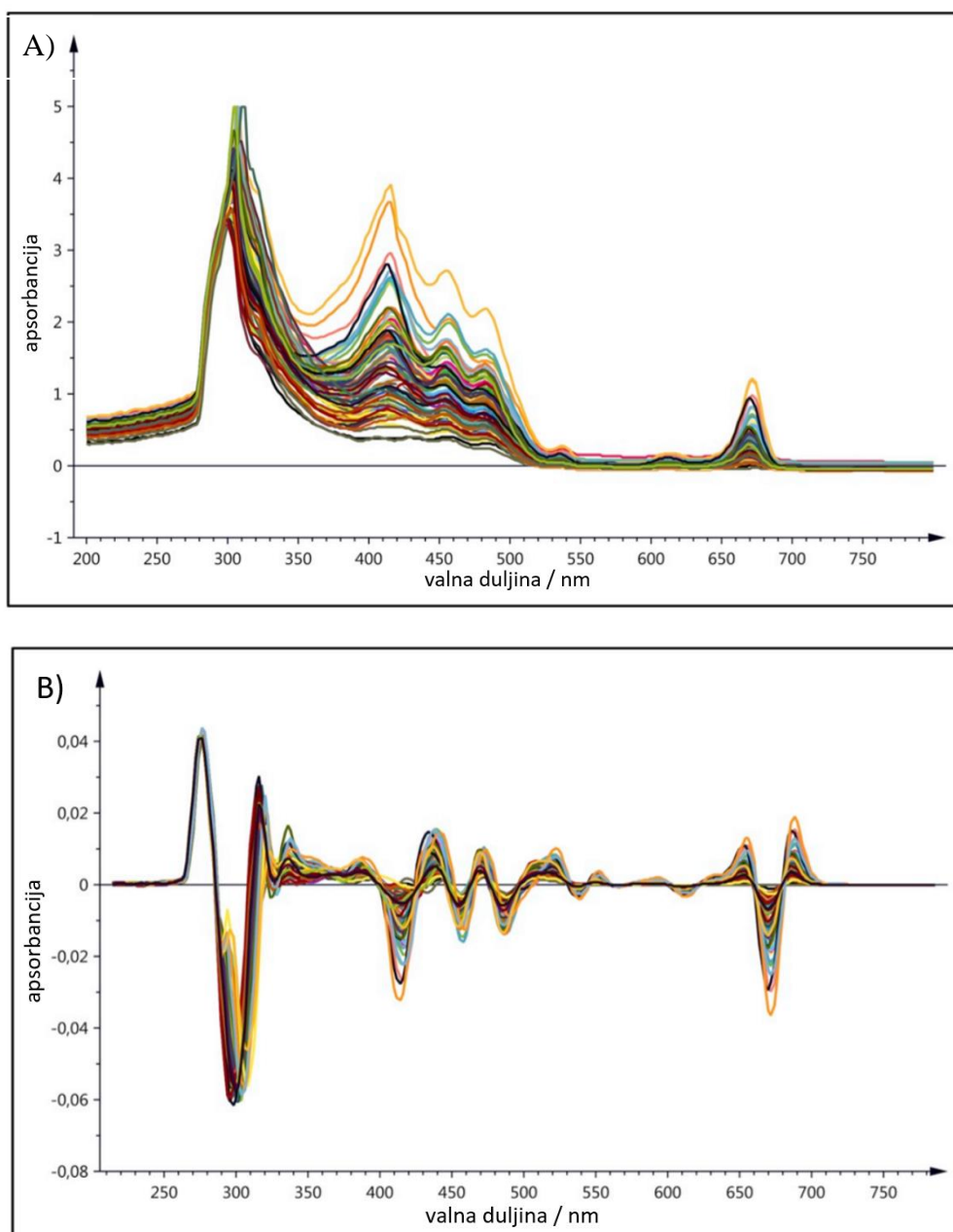




Slika 5. FT-IR spektar uzorka maslinovog ulja; A) izvorni spektar, B) spektar nakon druge derivacije podataka ¹⁵

Značajni pikovi na spektru predloženom slikom 5 se mogu pripisati sljedećim funkcionalnim skupinama:

- vrpca pri 3009 cm^{-1} – rastezanje C-H veze na dvostrukim C=C vezama olefinske kiseline
- vrpce pri 2924 cm^{-1} i 2854 cm^{-1} – vibracije C-H veze u $-\text{CH}_2$ i $-\text{CH}_3$ skupinama
- vrpca pri 1745 cm^{-1} – vibracije C=O veze (esteri; trigliceridi)
- vrpca pri 1654 cm^{-1} – rastezanje C=C veze u *cis*-olefinima
- vrpca od 1464 do 983 cm^{-1} (područje otiska prsta) – vibracije $-\text{CH}_2$ i $-\text{CH}_3$ alifatskih skupina
- vrpca pri 1377 cm^{-1} – simetrično svijanje H-C-H veza u mono-, di- i trigliceridima
- vrpca pri 1462 cm^{-1} – $-\text{CH}_2$ strižna vibracija
- vrpca od 1125 do 1095 cm^{-1} – C=O (esteri)



Slika 6. UV-VIS spektar uzorka maslinovog ulja; A) izvorni spektar, B) spektar nakon druge derivacije podataka¹⁵

UV-VIS spektar daje detaljniji uvid u sastav pigmenata koji se nalaze u ulju. Istaknuti su pikovi pri 486, 455 i 432 nm (lutein), 490 i 463 nm (β -karoten), 670 i 414 nm (feofitin a) i 657 i 437 nm (feofitin b).

3.3.3. Analiza podataka nakon obrade metodom najmanjih kvadrata

Za određivanje količinu FAME, FT-IR analiza se pokazala točnijom i preciznijom ($R^2_{\text{cal.}} = 0,99$, $R^2_{\text{cv}} = 0,87$) od UV-VIS analize koja daje nešto lošije rezultate ($R^2_{\text{cal.}} = 0,72$, $R^2_{\text{cv}} = 0,60$). Kombinacija tih dviju analiza daje slične rezultate kao sama FT-IR spektroskopija. Što se tiče ukupne količine FAEE, FT-IR daje također zadovoljavajuće rezultate ($R^2_{\text{cal.}} = 0,99$, $R^2_{\text{cv}} = 0,85$), dok UV-VIS ponovno pokazuje slabije predviđanje sastava ($R^2_{\text{cal.}} = 0,77$, $R^2_{\text{cv}} = 0,78$). Kombinacija tih dviju metoda daje nešto bolje rezultate od same FT-IR analize. Kvantifikacija FAEE se može preciznije odrediti koristeći FT-IR, dok UV-VIS ne daje dobar uvid u sastav pojedinih FAEE. Kombiniranje tih dviju metoda rezultira robusnijim podacima, manje preciznim od same FT-IR analize. Slično kao i za masne kiseline, kod određivanja ukupnog sastava voštanih spojeva, FT-IR analiza daje zadovoljavajuće rezultate ($R^2_{\text{cal.}} = 0,99$, $R^2_{\text{cv}} = 0,77$), dok UV-VIS nije dostatna za određivanje ukupnog sastava. Kombinacija dviju metoda daje nešto bolje rezultate od same FT-IR spektroskopije. U pretraživanoj literaturi, za određivanje voštanih estera u maslinovom ulju nije pronađena alternativna metoda. Za analizu ukupne količine diacilglicerola, pouzdanom metodom se pokazala FT-IR spektroskopija ($R^2_{\text{cal.}} = 0,99$, $R^2_{\text{cv}} = 0,79$), dok su rezultati za pojedinačne DAG nešto neprecizniji ($R^2_{\text{cal.}} = 0,88 - 0,99$, $R^2_{\text{cv}} = 0,62 - 0,83$). Ipak, kombiniranje FT-IR i UV-VIS analize ne daje bolje rezultate od same FT-IR spektroskopije što se može pripisati neobojenosti DAG komponenti, zbog čega UV-VIS ne doprinosi utočnjavanju ukupne analize. Koncentracije i ukupne udjele pojedinih pigmenta je nepraktično svrstati kao parametre za određivanje kvalitete maslinovog ulja jer je analizama pokazano da sastav pigmenta ovisi o kultivaciji, geografskom podrijetlu, zrelosti maslina i načinima skladištenja.¹⁹ Što se tiče same analize pigmenta, preciznija mjerenja daje UV-VIS spektroskopija zbog obojenosti komponenti. FTIR analiza nije dovoljno osjetljiva za male količine pigmenta u uzorku stoga su dobiveni rezultati manje pouzdani. UV-VIS analiza također pokazuje obećavajuće rezultate za detekciju pojedinačnih pigmenta, ali uglavnom onih koji se pojavljuju u većim koncentracijama (lutein i derivati, feofitin i derivati, ksantofili), dok je za ostale pigmente (klorofil a i derivati, feofitin b i derivati, klorofil b i derivati) točnost dobivenih rezultata nešto lošija, ali i dalje zadovoljavajuća. Kombinacija UV-VIS i FT-IR analiza daje bolje rezultate od same UV-VIS spektroskopije, konkretno za četiri glavna pigmenta korelacijski koeficijenti iznose $R^2_{\text{cal.}} \geq 0,96$ i $R^2_{\text{cv}} = 0,71 - 0,85$. Ipak,

za manje zastupljene pigmente, vrijednosti korelacijskih koeficijenata su nešto niže ($R^2_{cal.} \geq 0,95$, $R^2_{cv} = 0,60 - 0,76$).¹⁵

FT-IR analiza se pokazala prikladnom za određivanje većine komponenti u sastavu maslinovog ulja (FAEE, FAME, DAG), dok je za obojene komponente ipak prikladnija UV-VIS spektroskopija. Kombinacijom podataka dobivenim tim dvjema metodama, moguće je dobiti točne i precizne podatke o sastavu maslinovog ulja. Za razliku od komercijalno dostupnijih, "mokrkih" postupaka analize, spektroskopske analize ne zahtijevaju tretiranje uzorka reagensima i indikatorima, a količina otpada i uništenog uzorka nakon analize je značajno manja, što ove metode čini ekološki prihvatljivijima.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

- 1 <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/04/HO-W901-29-11-2019-P.pdf>, (datum pristupa 8. rujna 2020).
- 2 https://en.wikipedia.org/wiki/Olive_oil#Global_market, (datum pristupa 8. rujna 2020).
- 3 D. Škevin, *Zbornik stručnih radova*, Split, 2007, 129–137.
- 4 Narodne novine (2009), *Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina*, Zagreb: NN 7/2009
- 5 M. Gugić, M. Šarolić, M. Šuste, Z. Marijanović, *Hrana u Zdr. i Boles. Znan. časopis za Nutr. i dijetetiku*, 2014, **3**, 38–43.
- 6 P. Andrewes, J. L. H. C. Busch, T. De Joode, A. Groenewegen and H. Alexandre, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 1415–1420.
- 7 A. Gugić, I. Ordulj, *Zbornik stručnih radova*, Split, 2007, 106–112.
- 8 Y. J. Chabal, *Surf. Sci. Rep.*, 1988, **8**, 211–357.
- 9 P. Novak, *Analitička kemija 2 - predavanja* (ppt), 2018.
- 10 A. Rohman, *Int. J. Food Prop.*, 2017, **20**, 1447–1456.
- 11 O. Uncu, B. Ozen, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2015, **63**, 978–984.
- 12 M. W. Läubli, P. A. Bruttel, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1986, **63**, 792–795.
- 13 https://en.wikipedia.org/wiki/Folin-Ciocalteu_reagent, (datum pristupa 8. rujna 2020).
- 14 A. C. Power, J. Chapman, S. Chandra, D. Cozzolino, *Ultraviolet-visible spectroscopy for food quality analysis*, Elsevier Inc., 2019.
- 15 O. Uncu, B. Ozen and F. Tokatli, *Talanta*, 2019, **201**, 65–73.
- 16 F. Angerosa, L. Giansante, *Encycl. Food Chem.*, 2019, 13–40.
- 17 L. Rieppo, S. Saarakkala, T. Närhi, H. J. Helminen, J. S. Jurvelin and J. Rieppo, *Osteoarthr. Cartil.*, 2012, **20**, 451–459.
- 18 M. R. Maleki, A. M. Mouazen, H. Ramon, J. De Baerdemaeker, *Biosyst. Eng.*, 2007, **96**, 427–433.
- 19 C. Lazzerini and V. Domenici, *Foods*, 2017, **6**, 25.