Određivanje omega-3 masnih kislina

Jurčević, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:123565

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Iva Jurčević

Određivanje omega - 3 masnih kiselina

Determination of omega – 3 fatty acids

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2018.

SAŽETAK

Omega – 3 masne kiseline posebna su skupina nezasićenih masnih kiselina. Često se opisuju kao dragocjene masnoće zato što su jako važne za zdravlje. Ključne su za zdravlje srca i krvnih žila, mozga i zglobova te pozitivno utječu na raspoloženje i pospješuju djelovanje antidepresiva.

Omega – 3 masne kiseline su esencijalne, što znači da ih organizam ne može proizvesti i zato se moraju unositi hranom. Najbolji izvori ovih kiselina su masna riba, lanene sjemenke, kanola, soja i orasi.

Postoji veliki broj znanstvenih publikacija koje opisuju metode određivanja i analize omega - 3 masnih kiselina iz različitih namirnica. To je donijelo veliki napredak u ljudskoj prehrani i očuvanju zdravlja. U eksperimentalnim istraživanjima za izolaciju omega – 3 masnih kiselina iz biljaka ili životinja, uglavnom se koristi ekstrakcija, a najčešće korištene su metode zelene ekstrakcije, tj. ekstrakcija superkritičnim CO_2 i druge. Najpopularnije metode analize i detekcije omega – 3 masnih kiselina su kromatografske metode. Najčešće korištena kromatografska metoda je GC – MS metoda koja ujedinjuje plinsku kromatografiju i masenu spektrometriju.

Važno je spomenuti da su sve metode određivanja omega – 3 masnih kiselina u daljnjem razvoju i svakim novim istraživanjem znanstvenici žele ostvariti što bolje rezultate.

Ključne riječi: omega – 3 masne kiseline, ekstrakcija, kromatografske metode, GC

ABSTRACT

Omega – 3 fatty acids are special group of unsaturated fatty acids. They are oft described as valuable fat because of their importance for human health. They are crucial for heart, blood vessels, brain and joints health. They also positively affect the mood and enhance the antidepressants action.

Omega – 3 fatty acids are essential, which means that the organism can´t produce it by itself, and therefore we have to eat more often food that contains omega – 3 fatty acids. The best sources of omega – 3 fatty acids are fish, flax seeds, soya bean, canola and walnuts.

There is a large number of scientific publications that describe methods for determination and analysis of omega – 3 fatty acids in different type of groceries. That is a huge step forward in human nutrition and health care. In experimental research extraction is most commonly used for isolation of omega – 3 fatty acids from plants and animals and the most commonly used are green extraction methods, i.e. extraction with supercritical CO_2 and others. Most popular methods of analysis and detection of omega – 3 fatty acids are chromatography methods. Mostly used chromatography method is GC – MS method which unites gas chromatography and mass spectrometry.

It is important to say that all methods for omega – 3 fatty acids determination are in further development and with each new research scientists want to achieve better results.

Key words: omega – 3 fatty acids, extraction, chromatography methods, GC

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. MASNE KISELINE 2

3. NAMIRNICE BOGATE POLINEZASIĆENIM MASNIM KISELINAMA 5

4. OMJER OMEGA – 6 I OMEGA – 3 MASNIH KISELINA U PREHRANI 6

5. UTJECAJ OMEGA – 3 MASNIH KISELINA NA LJUDSKO ZDRAVLJE 7

6. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINA KEMIJSKIM METODAMA 8

7. EKSTRAKCIJA 9

7.1. ZELENA EKSTRAKCIJA RIBLJEG ULJA IZ RIBE 9

7.2. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINIH U SLATKOVODNIM RIBAMA EKSTRAKCIJOM I TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM 12

8. KROMATOGRAFSKE METODE 14

8.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA 14

8.1.1. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM U MORSKIM ORGANIZMIMA 16

8.1.2. ODREĐIVANJE OMEGA – MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM U ULJU ULJARICA 18

8.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) 19

8.2.1. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINA IZ HRANE HPLC – OM I DETEKCIJA POMOĆU PUNJENJA AEROSOLOM 19

9. ALKALIMETRIJA 23

9.1. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINA ALKALIMETRIJSKOM TITRACIJOM 23

10. ZAKLJUČAK 24

11. LITERATURA 25

1. UVOD

Zanimamanje za omega – 3 masne kiseline počelo je sredinom prošlog stoljeća i sve više pažnje se pridodaje ovim izrazito važnim spojevima za čovjeka. One su značajni strukturni sastojci fosfolipidnih membrana tkiva u cijelom tijelu, a mrežnica, mozak i spermatozoidi su posebno bogati ovim spojevima [1].

Sve masne kiseline ubrajaju se u skupnu lipida, koji zajedno s proteinima i ugljikohidratima čine tri glavne skupine bioloških molekula. Masne kiseline su, također, važni energetski supstrati koji čine oko 30% ukupnog unosa energije za ljude [2].

Omega – 3 masne kiseline su esencijalne masne kiseline potrebne od začeća kroz trudnoću i, bez sumnje, tijekom cijelog života. Druga važna značajka omega – 3 masnih kiselina je njihova uloga u prevenciji od određenih bolesti koje su česte u zapadnoj civilizaciji [1].

Cilj ovog rada je pokazati i opisati kojim se sve kemijskim metodama mogu odrediti omega – 3 masne kiseline iz namirnica. Najvažniji izvori ovih spojeva bogatih energijom su riba, morski plodovi, sjemenke, biljna ulja i orašasti plodovi na kojima se najčešće i provode istraživanja. Najčešće metode izolacije i određivanja omega – 3 masnih kiselina su ekstrakcija i kromatografske metode. Od metoda ekstrakcije najprimjenjenije su metode zelene ekstrakcije, a od kromatografskih metode najviše se koristi plinska kromatografija uz masenu spektrometriju (GC - MS). Također postoje i druge metode koje nisu toliko korištene, primjerice tekućinska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i alkalimetrija. Sve metode određivanja omega - 3 masnih kiselina još uvijek su u razvoju i svakim danom postižu se nova znanstvena otkrića i sve bolji rezultati [3, 4].

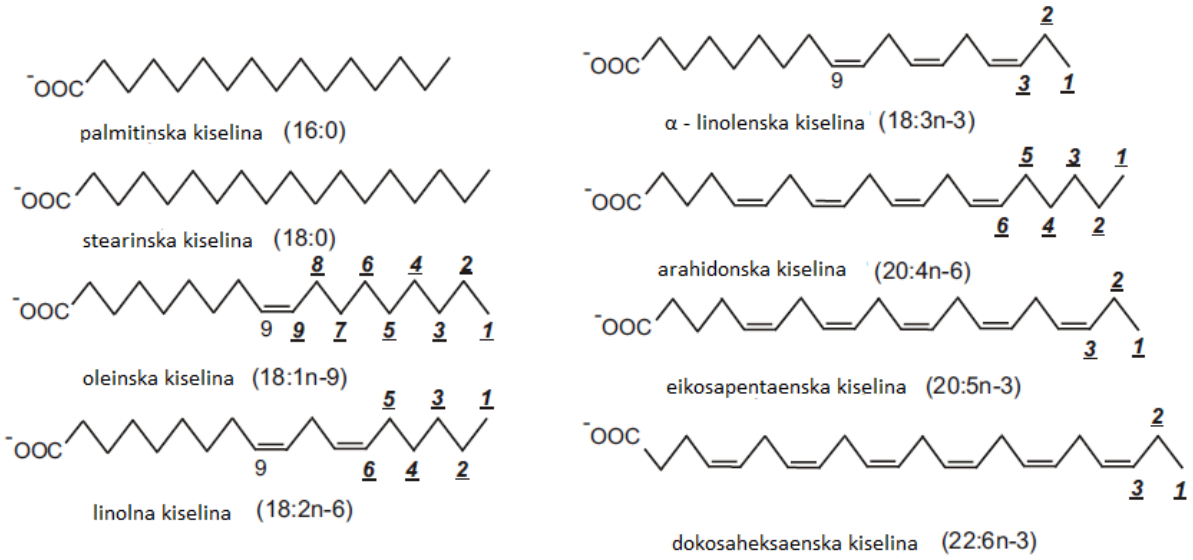
Mnoga istraživanja i studije ukazale su na pozitivni učinak omega – 3 masnih kiselina u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja pa tako tijekom posljednjih nekoliko desetljeća kontinuirano raste interes za omega – 3 masnim kiselinama. Omega-3 masne kiseline važne su u razvoju djeteta, prevenciji i terapiji kardiovaskularnih i malignih bolesti te kod raznih mentalnih bolesti, uključujući depresiju, demenciju, poremećaj aktivnosti i gubitak pažnje [5].

2. MASNE KISELINE

Masne kiseline su lančani ugljikovodici različitih dužina i stupnjeva zasićenosti. Na jednom kraju lanca imaju metilnu (- CH_3) skupinu, a na drugom karboksilnu skupinu (- COOH). Prema stupnju zasićenosti mogu se podijeliti na zasićene masne kiseline (eng. *saturated fatty acids*, SFA) i nezasićene masne kiseline (eng. *unsaturated fatty acids*, UFA), a UFA se mogu podijeliti na mononezasićene masne kiseline (eng. *monounsaturated fatty acid*s, MUFA) i polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) [2].

Zasićene masne kiseline su najčešće ravni ugljikovodični lanci zasićeni vodikom. Atomi ugljika povezani su jednostrukom vezom, a takva struktura im omogućuje stabilnost i manju podložnost kemijskim reakcijama.
Masne kiseline kojima nedostaje jedan par vodikovih atoma imaju jednu nezasićenu, dvostruku (C=C) vezu te se nazivaju mononezasićene masne kiseline. Najčešće mononezasićene masne kiseline imaju duljinu lanca od 16 do 22 ugljikova atoma i dvostruku vezu u *cis* konfiguraciji, što znači da su atomi vodika s obje strane dvostruke veze orijentirani u istom smjeru [2].

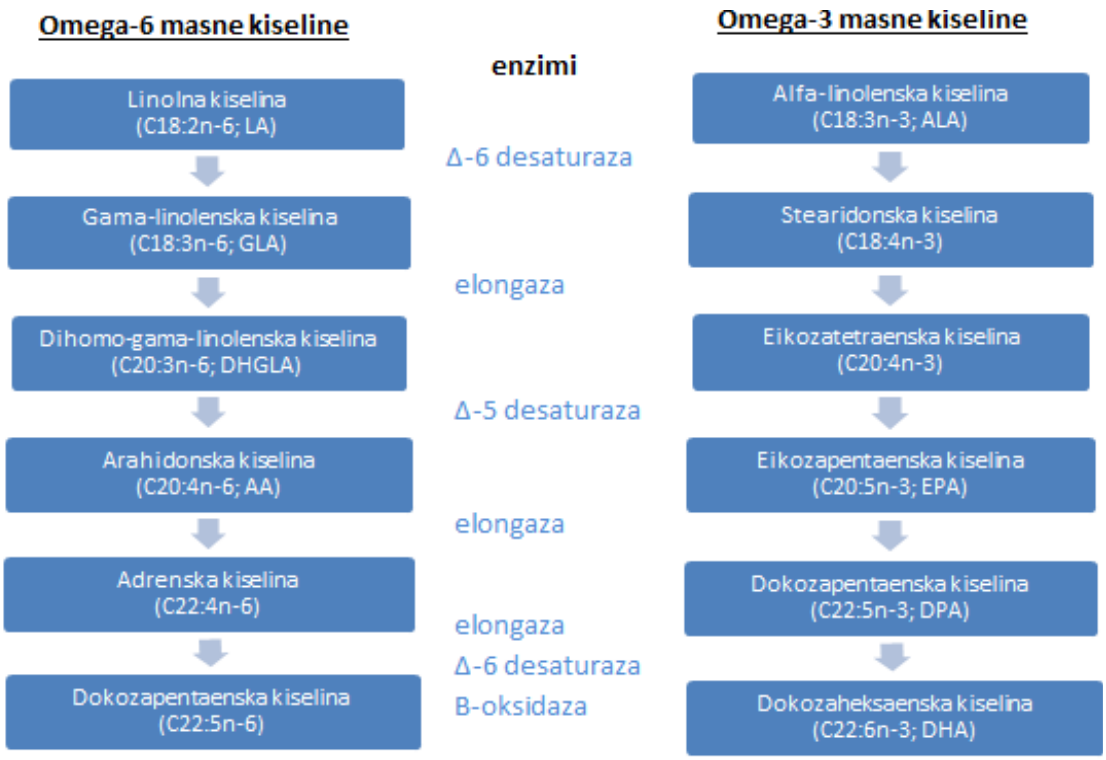
Polinezasićene masne kiseline sadrže dvije ili više dvostrukih (C=C) veza u ugljikovodičnom lancu. Klasificirane su na osnovi duljine ugljikovodičnog lanca, broja dvostrukih veza i položaja prve dvostruke veze. Ako se prva dvostruka veza nalazi između trećeg i četvrtog ugljikovog atoma brojano od metilnog kraja nazivaju se omega – 3 masne kiseline, a ukoliko je prva dvostruka veza između šestog i sedmog ugljikovog atoma, tada se nazivaju omega – 6 masne kiseline. Također, postoje i omega – 7 i omega – 9 masne kiseline čija su nazivi određeni po istom pravilu (Slika 1.) [2].



Slika 1. Strukturne formule masnih kiselina [4].

Nezasićene masne kiseline su nestabilnije i reaktivnije zbog mogućnosti pucanja dvostruke veze, što je više dvostrukih veza to su podložnije kemijskim reakcijama. Omega – 3 i omega – 6 masne kiseline poznate su kao esencijalne masne kiseline (EFA) jer se ne mogu sintetizirati u organizmu, već se moraju unositi hranom. Glavni predstavnik omega – 6 masnih kiselina je linolna kiselina (LA, C18:2, n-6) , a omega – 3 masnih kiselina α-linolenska kiselina (ALA, C18:3, n-3). LA je zastupljena u prirodi i nalazi se u sjemenu većine biljaka, osim kokosa, kakaa i palme, a ALA se nalazi u kloroplastima zelenog lisnatog povrća [6].

Polinezasićene masne kiseline dodatno se metaboliziraju u organizmu dodavanjem dva atoma ugljika pomoću elongacijskih enzima i uvođenjem nove dvostruke veze djelovanjem desaturacijskih enzima. U organizmu, djelovanjem elongacijskih i desaturacijskih enzima, iz linolne masne kiselina nastaju ostale omega – 6 polinezasićene masne kiseline, a iz α – linolenske nastaju ostale omega – 3 polinezasićene masne kiseline, kao što su eikozapentaenska (EPA), dokozapentaenska (DPA) i dokozaheksaenska (DHA) kiselina (Slika 2.) [2].



Slika 2. Metabolizam omega – 3 i omega – 6 polinezasićenih masnih kiselina [7].

3. NAMIRNICE BOGATE POLINEZASIĆENIM MASNIM KISELINAMA

Esencijalna omega – 6 masna kiselina, linolna kiselina, vrlo je zastupljena u prirodi. Glavni izvori linolne kiseline su kukuruz, soja, suncokret te njihova ulja. (Tablica 1.) [6].

α-linolenska kiselina esencijalna omega - 3 masna kiselina, također se nalazi u sjemenkama nekih biljaka, a najzastupljenija je u lanenim sjemenkama i lanenom ulju, ulju kanole, soji, orasima i bademima (Tablica 1.). Metaboliti α-linolenske kiseline, eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina mogu se unositi u organizam konzumiranjem ribe i morskih plodova. Najbolji izvor je masna riba koja sadrži približno 2 g EPA i DHA po obroku ribe. U masne ribe ubrajaju se srdele, skuše, pastrve, losos i svježa tuna [8].

Tablica 1. Prosječan postotak MFA, SFA, LA i ALA u namirnicama bogatim masnim kiselinama (izraženo u %) [8].

	SFA	MFA	Linolna kiselina	α – linolenska kiselina
Kukuruz	13.0	28.0	58.0	1.0
Sojino ulje	15.0	22.5	50.0	7.0
Suncokret	12.0	19.0	68.0	1.0
Laneno ulje	9.0	21.0	16.0	53.0
Ulje kanole	6.0	62.0	18.6	9.0
Orasi	9.0	22.2	52.0	10.0
Masline	13.0	71.0	10.0	1.0

4. OMJER OMEGA – 6 I OMEGA – 3 MASNIH KISELINA U PREHRANI

Pretpostavlja se da su ljudska bića evoluirala na prehrani s omjerom omega – 6 i omega – 3 esencijalnih masnih kiselina približno 1, dok je danas kod zapadne prehrane taj omjer oko 16:1. Zapadnoj kuhinji nedostaju omega - 3 masne kiseline, a prisutan je prekomjeran unos omega-6 masnih kiselina u usporedbi s prehranom na kojoj su ljudska bića evoluirala i na kojoj su genetički uzorci uspostavljeni [9].

Prekomjerno unošenje omega - 6 polinezasićenih masnih kiselina u organizam i vrlo visok omega - 6 : omega - 3 omjer, kakav se može naći u današnjoj zapadnoj prehrani, potiče razvoj mnogih bolesti, uključujući karcinom, kardiovaskularne bolesti, upalne i autoimune bolesti, dok povećana razina omega - 3 masnih kiselina ima odlične učinke na ljudsko zdravlje [9].

5. UTJECAJ OMEGA – 3 MASNIH KISELINA NA LJUDSKO ZDRAVLJE

Omega – 3 masne kiseline su gradivne komponente svih tkiva i neophodne su za sintezu staničnih membrana. Mozak i živčana tkiva su posebno bogati dugolančanim nezasićenim masnim kiselinama EPA i DHA [5].

Znanstvenim istraživanjima dokazano je da esencijalne omega – 3 masne kiseline imaju pozitivan učinak na ljudski organizam i smanjuju rizik od raznih bolesti. 70-ih godina prošlog stoljeća znanstvenici Bang, Dyerber i Nielsen otkrili su da Eskimi s Grenladna imaju izuzetno nisku učestalost kardiovaskularnih bolesti unatoč tome što konzumiraju velike količine zasićenih masnih kiselina. Zaključeno je da je to zbog velikog unosa omega – 3 masnih kiselina iz ribe i morskih plodova. Navedeno istraživanje pokrenulo je brojna druga znanstvena istraživanja o potencijalnom blagotvornom učinku omega – 3 masnih kiselina i do danas je otkriveno jako puno pozitivnih djelovanja ovih bogatih nutrijenata, a glavna uloga im je zaštita kardiovaskularnog sustava. Prema istraživanjima objavljenim do 2006. godine, unos omega – 3 masnih kiselina smanjuje rizik od smrti uslijed koronarne bolesti srca. Također otkriveno je da omega – 3 masne kiseline sprječavaju, pa i liječe depresiju, dijabetes tipa 2 i neke oblike karcinoma [5].

Rezultati nekih studija pokazuju da omega – 3 masne kiseline imaju značajno antidepresivno djelovanje. Ispitanici koji su patili od depresije ili bipolarnog poremećaja svakodnevno su unosili veće koncentracije omega – 3 masnih kiselina te su one značajno popravile simptome bolesnika [5].

Esencijalne masne kiseline, a posebno dugolančane omega – 3 masne kiseline, važne su za razvoj mozga dijeteta tijekom trudnoće. U prvim mjesecima trudnoće približno 50 – 60 mg DHA na dan se prenosi iz majčinih zaliha do fetusa. DHA je visoko koncentrirana u mozgu i retini te se stoga smatra da ima važnu ulogu u razvoju vida i kognitivnih funkcija [5].

6. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINA KEMIJSKIM METODAMA

Postoje različite kemijske metode kojima se mogu odrediti omega – 3 masne kiseline iz raznih namirnica. Najčešće korištene metode su kromatografske metode u kombinaciji s ekstrakcijom. Najzastupljenije su plinska kromatografija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Osim njih mogu se koristiti i ostale analitičke metode koje nisu toliko zastupljene kao što su spektroskopija i volumetrijske metode analize, primjerice alkalimetrija [10].

7. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je jedna od najprimjenjenijih metoda pročišćavanja i izolacije tvari iz smjesa, a može se koristiti kao zasebna metoda ili u kombinaciji s drugim metodama analize. Ekstrakcija je postupak razdvajanja tvari u smjesi pomoću dva otapala koja se ne miješaju. U ovoj metodi postoje dvije veličine koje se koriste za opisivanje raspodjele otopljene tvari u otapalima, a to su: koeficijent raspodjele i omjer raspodjele. Koeficijent raspodjele je konstanta ravnoteže koja govori kako se raspoređuju otopljene tvari između dva otapala koja se međusobno ne miješaju, a omjer raspodjele je omjer analitičkih koncentracija analita u dva otapala koja se međusobno ne miješaju [11].

Metode ekstrakcije mogu se podijeliti na tradicionalne i suvremene. Tradicionalne metode ekstrakcije su: Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija refluksiranjem, maceracija i destilacija. Suvremene metode ekstrakcije su: ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, visokotlačna ekstrakcija, ekstrakcija pomoću enzima, ekstrakcija pomoću električnog polja i ekstrakcija superkritičnim fluidima. Omega – 3 masne kiseline mogu biti određene pomoću nekih od navedenih metoda ekstrakcije [12].

Ekstrakcijom se najčešće izoliraju vrijedni proizvodi iz biljaka (biljna ulja) i životinja. Primjerice riblje ulje se ekstrahira iz ribe i zatim se ostalim metodama analize, koje su opisane u narednom tekstu, analiziraju vrijedni sastojci kao što su masne kiseline [4].

7.1. ZELENA EKSTRAKCIJA RIBLJEG ULJA IZ RIBE

Metode ekstrakcije se vrlo često primjenjuju u analizi masnih kiselina, a kako bi bile i ekološki prihvatljive, za njihovu izvedbu sve češće se koriste zelena otapala. Ekstrakcija pomoću zelenih otapala, naziva se zelena ekstrakcija. Zelena otapala, za razliku od organskih otapala, sigurnija su za čovjeka i okoliš, niske su hlapljivosti, laka za uporabu i jednostavna za recikliranje [4].

Tradicionalne metode ekstrakcije ribljeg ulja iz ribe su: hidrauličko prešanje, ekstrakcija refluksiranjem i ekstrakcija otapalom. Ove metode ekološki su nepovoljne zato što su za njihovu izvedbi potrebna toksična otapala i visoke temeperature koje mogu utjecati na kvalitetu proizvoda [4].

Neke od suvremenih tehnika ekstrakcije kojima se mogu ekstrahirati riblja ulja iz ribe su: ekstrakcija superkritičnim CO_2, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija enzimskom hidrolizom. U zadnjih 20 godina zelene metode ekstrakcije su prepoznate kao obećavajuća alternativa organskim otapalima. Najčešće je korištena ekstrakcija superkritičnim CO_2, ali i druge zelene metode su pogodne za dobar prinos ekstrakcije, kvalitetu proizvoda i sadržaj omega-3 masnih kiselina EPA i DHA [4].

Ekstrakcija superkritičnim CO_2 koristi se za izolaciju vrijednih proizvoda iz biljaka i životinjskog tkiva, npr. riba. Superkritični fluidi su izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva, imaju veći stupanj selektivnosti od klasičnih otapala. Ova metoda ima nekoliko prednosti: ne koristi toksična otapala, ekstrakcija i razdvajanja su brža, a toplinski proces pri nižim temperaturama je sigurniji. Kada je CO_2 u superkritičnom stanju, tj. kada je na temperaturi većoj od 31,3°C i tlaku iznad 72 bara sposobnost otapanja CO_2 varira u širokim granicama s promjenom tlaka i temperature. Na taj način se može, pogodnim izborom tlaka i temperature, ostvariti selektivna ekstrakcija prirodnih tvari. Ugljikov dioksid je pogodno otapalo jer je neotrovan, nezapaljiv, bez okusa i mirisa i lako je dostupan po niskoj cijeni. Činjenica da je CO_2 na sobnoj temperaturi plin osigurava da se otapalo lako odvoji od komore za ekstrakciju. Osim CO_2 također se istražuju i drugi spojevi za ovu metodu, kao što su fluorirani ugljikovodici, sumpor, dušikovi oksidi, heksafluoridi, butan, pentan i heksan. Superkritični CO_2 koristi se u ekstrakciji ribljeg ulja u industrijskoj proizvodnji već 20 godina. Prinosi ekstrakcije su slični ili čak veći od onih dobivenih tradicionalnim metodama ekstrakcije, a prinos ekstrakcije ovisi o vrstama riba i dijelu koji se koristi za ekstrakciju. Optimalni parametri ekstrakcije su: tlak 25-40 MPa, T = 40-80 °C, > 2 mL CO_2 / min, vrijeme upijanja 45 min - 6 h. Voda u uzorku djeluje kao prepreka za difuziju CO_2 u uzorku i oslobađanje lipida iz stanica. Stoga, prije ekstrakcije, potrebno je sušiti uzorak. Rezultati provedenih istraživanja kažu da oslić (*Merluccius merluccius*) može dati oko 10 g ulja na 100 g suhih sirovina, ali vrste masnih riba, npr. losos (*Salmo salar*) i atlantski zrcalar (*Hoplostethus atlanticus offcut*) pružaju veće količine, od 40 g i 50 g ulja na 100 g sirovine, afrički som (*Clarias gariepinus*) 67 g ulja na 100 g suhe sirovine, dugorepa tuna (*Thunnus tonggol*) 36,2 g ulja na 100 g suhe sirovine, indijska skuša *(Scomber scombrus)* 52,3 g ulja na 100 g suhe sirovine [4].

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) koristi mikrovalove za zagrijavanje otapala u kontaktu sa čvrstom matricom za ekstrakciju sadržaja iz otopine uzorka. Ovaj postupak ekstrakcije još je u razvoju i trebao bi biti ispitan i poboljšan na većem spektru uzoraka.

Mikrovalna ekstrakcija se smatra boljom od tradicionalnih metoda ekstrakcije otapalom jer ima nekoliko prednosti: veće stope ekstrakcije, niže temperature i automatizaciju. Međutim, mikrovalna ekstrakcija ima dva glavna nedostatka: toplinu što može dovesti do oksidacije nezasićenih masnih kiselina i nisku učinkovitosti kod upotrebe hlapljivih otapala. Mnogi čimbenici utječu na učinkovitost ekstrakcije: veličina čestica uzorka, korišteno otapalo, vrijeme, kapacitet i učestalost mikrovalova. Ova metoda nije široko korištena. Također, nema velik broj publikacija o ovoj metodi ekstrakcije ribljeg ulja [4].

Novije studije su pokazale da ultrazvučna ekstrakcija pomoću akustične kavitacije i mehaničkog utjecaja može poboljšati učinkovitost ekstrakcije. Akustična kavitacija je postupak kontroliranog nastajanja sitnih mjehurića plina koji titraju određenom frekvencijom i na taj način vrše koristan rad. Akustična kavitacija može poremetiti staničnu stjenku što olakšava prodiranje otapala u biljni materijal kako bi se lakše došlo do traženih tvari. Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) zahtijeva manje vremena i smanjene potrošnje otapala te se može izvoditi pri niskim temperaturama, što može smanjiti štetu uzrokovanu temperaturom i smanjiti gubitak bioaktivnih tvari. Ultrazvuk je u frekvencijama iznad ljudske razine sluha od 20 kHz do 10 MHz. Ultrazvuk je razvrstan po nekoliko kriterija: količini generirane energije koju karakterizira zvuk snage (W), intenzitetu zvuka (W / m^2) ili gustoći zvučne snage (W / m^3). Korišteni ultrazvuk može biti visokog ili niskog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta ima visoku frekvenciju (100 kHz do 1 MHz) i nisku snagu (<1 W / cm^2), koristi se u nerazornim analizama i kao analitička metoda za procjenu kvalitete daje informacije o fizičkim i kemijskim svojstvima prehrambenih proizvoda kao što su čvrstoća, spremnost, sadržaj šećera, kiselost. Ultrazvuk visokog intenziteta ima niske frekvencije (100 kHz -16 kHz) i veliku snagu (10-1000 W / cm^2) [32]. Koristi se za ubrzavanje i poboljšanje učinkovitosti pripreme uzoraka, jer može promijeniti fizikalna ili kemijska svojstva hrane. Ultrazvučna ekstrakcija općenito se prepoznaje kao učinkovita metoda ekstrakcije. Iako su MAE i UAE široko korištene u ekstrakciji bioaktivnog materijala, gotovo se ne koriste u ekstrakciji ribljeg ulja te je vrlo malo znanstvenih članaka o ovoj temi [4].

Još jedna metoda zelene ekstrakcije je enzimska hidroliza. U usporedbi s prethodne dvije metode, ova metoda je puno više proučavana. Enzimska hidroliza je termin koji se koristi ako su enzimi izolirani iz drugih izvora, odnosno drugih prirodnih materijala. Enzimska hidroliza je idealan način za izolaciju ulja i proteina iz ribe i ribljih prerađevina. Enzimi koji se koriste u procesu ne smiju biti patogeni. U većini slučajeva, za hidrolizu se koriste alkalne ili neutralne proteaze jer proizvode bolje rezultate od kiselih proteaza. Prije ekstrakcije potrebno

je deaktivirati egzogene enzime zagrijavanjem na temperaturi od oko 80-90 °C i podešavanjem pH. U usporedbi s tradicionalnom termičkom ekstrakcijom, enzimska hidroliza je bolja u izolaciji ulja te su rezultati ekstrakcije usporedivi s rezultatima dobivenim ekstrakcijom otapalom [4].

Laboratorijska istraživanja pokazuju da metode zelene ekstrakcije pružaju izvrsnu alternativu tradicionalnim metodama. Količina i kakvoća proizvedenog ribljeg ulja je slična ili još bolja. Međutim, ove metode zahtijevaju dodatno istraživanje, potrebno je unaprijediti tehnologiju i proces same ekstrakcije. Provedenim istraživanjima, zaključeno je da je najpouzdanija metoda zelene ekstrakcije ekstrakcija ulja superkritičnim CO_2, a ostale opisane metode još uvijek su u razvoju [4].

7.2. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINIH U SLATKOVODNIM RIBAMA EKSTRAKCIJOM I TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Kod određivanje omega – 3 masnih kiselina ekstrakcija se izvodi u kombinaciji s ostalim metodama analize koje su opisane u idućem poglavlju. Točnije, ekstrakcijom se izolira ulje iz biljaka ili životinja koje se zatim analizira drugim kemijskim metodama [11].

U istraživanju provedenom na slatkovodnim ribama koristila se kombinacija ekstrakcije i kromatografskih metoda. Tri vrste slatkovodnih riba: *Mastacembelus armatus, Mystus singhala* i *Labeo calbasuo*, odvojeno su nasjeckane i njihova ulja su ekstrahirana upotrebom otapala kloroforma i n-heksana u omjeru 50:50. Zatim su ulja analizirana korištenjem uređaja za tekućinsku kromatografiju s detektorom ionizacije plamena (FID) [13].

Rezultati prikazani u tablici 2. pokazuju da su sve odabrane vrste riba dobar izvor polinezasićenih masnih kiselina, ali *Mastacembelus armatus* je najbolji izvor omega - 3 esencijalnih masnih kiselina, DPA i DHA, u odnosu na druge dvije vrste riba. Razlozi varijacija u sastavu masnih kiselina mogu biti različitost vrsta i podrijetla ovih riba. Na temelju rezultata, može se zaključiti da se ispitane vrste riba mogu uspješno koristiti za liječenje i prevenciju od kardiovaskularnih bolesti [13].

Tablica 2. Zastupljenost pojedinih masnih kiselina u slatkovodnoj ribi (izraženo u %) [13].

		VRSTA RIBE	
MASNE KISELINE	Mastacembelus armatus	Mystus singhala	Labeo calbasuo
Miristinska	0.8	9.05	14.79
Palmitinska	22.08	14.71	-
Palmitoleinska	-	19.37	39.08
Stearinska	-	4.91	43.86
Oleinska	-	21.28	-
Vakcenska	28.02	13.47	-
Linolna	10.56	-	-
Eikozenoinska	21.68	-	-
Erukinska	1.18	-	-
Dokosapentaenska	**9.13**	**-**	**-**
Dokosaheksaenska	**1.99**	**-**	**0.89**
Ukupno	95.45	82.79	98.62

8. KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografske metode su, više od pola stoljeća, jedne od najčešće korištenih tehnika analize. Kromatografija je naziv za skupinu tehnika kojima se razdvajaju smjese, a zasniva se na različitoj raspodjeli komponenti uzoraka između dvije faze, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne). Kada se dijelovi smjese razdvoje između dviju faza moguće ih je analizirati i kvantitativno odrediti. Stacionarna faza je sloj na nosaču koji reagira s analitom, najčešće je kruta ili tekuća, a mobilna faza je tvar koja teče preko nosača te može biti plinovita ili tekuća. Kroz stacionarnu fazu protječu analit i mobilna faza, te se pod utjecajem mobilne faze komponente razdvajaju. Uređaj za izvođenje kromatografskih razdvajanja naziva se kromatograf (slika 3.), dok je kromatogram grafički prikaz odgovora detektora [11].

Osnovna podjela kromatogtafskih metoda je na: plošnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu. Kod plošne kromatografije, stacionarna faza nanosi se na ravnu plohu ili u pore papira, a mobilna faza prolazi kroz stacionarnu fazu zbog gravitacije ili kapilarnih sila. Za razliku od plošne kromatografije, kod kromatografije na stupcu stacionarna faza se nalazi u uskoj cijevi (koloni), a mobilna faza prolazi kroz nju pod utjecajem gravitacije ili tlaka [11].

Vrste kromatografija mogu se podijeliti prema više kriterija, primjerice prema agregatnom stanju faza, prema fizikalno – kemijskim svojstvima analita i prema izvedbenim tehnikama. Izvedbene tehnike kojima se mogu odrediti omega – 3 masne kiseline u različitim namirnicama su: kromatografija na papiru (PC), kolonska kromatografija (CC), tankoslojna kromatografija (TLC), plinska kromatografija (GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) [11].

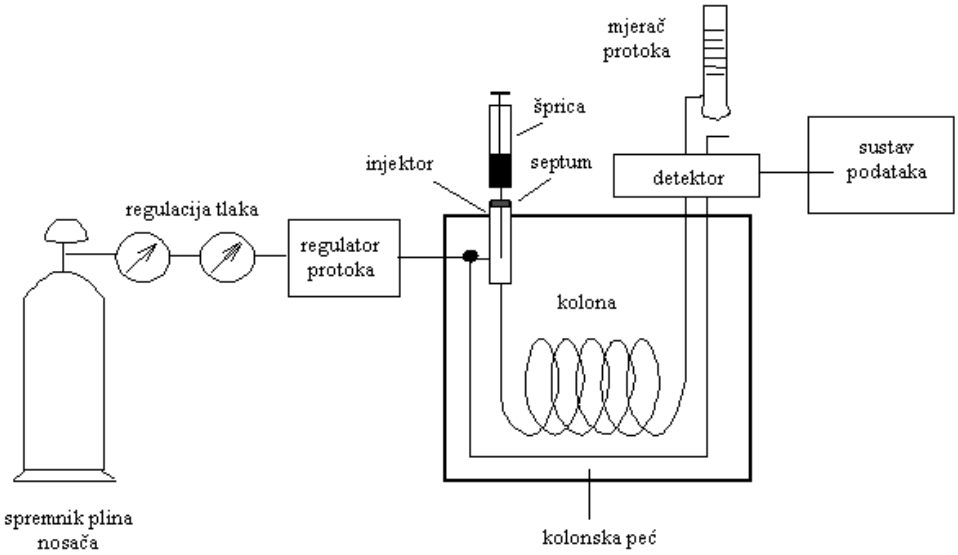
8.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

U plinskoj kromatografiji mobilna faza je inertni plin koji eluira sastojke smjese iz kolone napunjene stacionarnom fazom. Najčešće korišteni plinovi su dušik, kisik, ugljikov dioksid i ugljikovodici zbog njihove male molekularne mase. U plinskoj kromatografiji analit ne reagira s mobilnom fazom te zbog toga kemijska struktura mobilne faze ne utječe na njegovu brzinu kretanja. Stacionarna faza u plinskoj kromatografiji je čvrsta tvar velike površine, na kojoj se adsorbiraju analizirane komponenete [11].

Pod pojmom plinska kromatografija, često se smatra i plinsko – tekućinska kromatografija (GLC) koja se temelji na razdjeljivanju smjese između plinovite mobilne faze i tekuće stacionarne faze. Plinovi koji se upotrebljavju su helij, argon, vodik i dušik, a najčešće se koristi helij [11].

Mogu se koristiti dva tipa kolona, punjene i kapilarne. Punjene kolone mogu biti napravljene od staklenih, metalnih ili teflonskih cijevi. U njih se stavlja zrnasto punilo ili čvrsti nosač koji je premazan tankim slojem stacionarne faze. U kapilarnim kolonama stacionarna faza je sloj tekućine debljine nekoliko desetinki milimetara kojom je prevučena unutrašnja stijenka kolone [11].

Na kraju svih postupaka i razdjeljenja komponenti smjese, spojevi se moraju identificirati, a to se radi pomoću detektora. Detektori za plinsku kromatografiju moraju pokazati brz, linearan i jednolik odziv za mnoge kemijske spojeve. Naravno da niti jedan detektor ne zadovoljava sve zahtjeve, ali postoje detektori koji su zadovoljavajući. Takvi detektori su plamenoionizacijski detektor, detektor apsorpcije elektrona (ECD) i detektor toplinske vodljivosti (TCD). Plinska kromatografija često koristi selektivne metode spektroskopije i elektrokemije. Nakon razdvajanja smjese, eluati sastojaka hvataju se kao zasebne frakcije i ispituju nuklearnom magnetskom rezonancijom, IR ili masenom spektroskopijom. Za pouzdanu identifikaciju odijeljenih spojeva sve češće se koriste elektroanalitički detektori i maseni spektrometri (MSD) [11].



Slika 3. Shema plinskog kromatografa [11].

8.1.1. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM U MORSKIM ORGANIZMIMA

Plinska kromatografija jedna je od najčešće korištenih metoda analize omega – 3 masnih kiselina. S obzirom na široku primjenu, korištena je za određivanje sastava masnih kiselina u morskim organizmima. Znanstvena istraživanja napravljena uz pomoć plinske kromatografije pridonijela su zdravijoj prehrani te duljem i boljem životu ljudi [3].

Plinska kromatografija dovela je do specifične, osjetljive i brze analize masnih kiselina. Polarnost stacionarne faze, duljina stupca i vrsta detektora utječu na učinkovitost plinske kromatografije. Bolje razlučivanje i razdvajanje postižu se kada se koristi kapilarni stupac i kada se poveća polarizacija stacionarne faze i duljina stupca. Masne kiseline iz morskih organizama se određuju pomoću detektora ionizacije plamena. GC – MS je važna metoda koja koristi prednosti GC i MS, razvijena je i postala je popularna tehnologija za određivanje masnih kiselina iz morskih organizama [3].

Poznato je da mnogi morski organizmi predstavljaju izvrsne izvore zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, a osobito visoko nezasićenih masnih kiselina (HUFA) i polinezasićenih masnih kiselina. Na primjer, morski organizmi sadrže omega-3 masne kiseline koje se ne mogu sintetizirani u ljudskom tijelu, ali potrebne su za normalan metabolizam. Uobičajeni izvori omega-3 masnih kiselina uključuju ribu, lignje, školjke i druge morske plodove. Unos PUFA je relativno nizak u ljudskoj prehrani, prvenstveno zbog niske potrošnje morskih

plodova, tako da unos HUFA iz morskih plodova treba povećati. Sastav masnih kiselina iz morskih organizama važan je za zdravu i pravilnu prehranu [3].

Plinska kromatografija se koristi za analizu masnih kiselina u morskim organizmima nakon derivatizacije u metil - estere masnih kiselina. Masne kiseline je teško analizirati u njihovom prirodnom obliku jer su one visoko polarni spojevi imaju tendenciju stvaranja vodikovih veza, što dovodi do apsorpcijskih problema. Smanjenjem njihove polarnosti one postaju pogodnije za analizu. Kako bi se uočile vrlo male razlike između nezasićenih masnih kiselina, polarne karboksilne funkcionalne skupine moraju se najprije neutralizirati. Neutralizacija, stupanj nezasićenosti i položaj dvostruke veze omogućuju odvajanje eluata od stupca [3].

Tijekom prošlih godina, plinskom kromatografijom su dobiveni dobri rezultati tijekom analiza masnih kiselina u morskim organizmima. MS i FID detektori su najpogodniji za određivanje masnih kiselina. Izvrsna rezolucija može se postići pomoću GC-GC ili GC-MS kada se koristi polarni i dugi kapilarni stupac. Razvojem GC tehnologije došlo je do otkrića novih masnih kiselina iz morskih organizama. Opsežna istraživanja pokazuju da su pojedine vrste morskih organizama izvrsni prehrambeni izvori visoko zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina (Tablica 3.). Konzumiranje plodova mora uvelike pridonosi zdravoj prehrani ljudskog organizma [3].

Tablica 3. Zatupljenosti masnih kiselina u nekim morskim organizmima (izraženo u g / 100 g morskog organizma) [3].

Morski organizmi	SFA	MUFA	PUFA
Morski krastavac	14	11	11
Morska riba	7	5	15
Morski sisavci	17	19	9
Morski plodovi	13	14	16
Morski jež	10	8	14
Morske alge	4	5	14
Planktoni	12	9	13

8.1.2. ODREĐIVANJE OMEGA – MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM U ULJU ULJARICA

U ovom istraživanju analizirane su nutritivne vrijednosti različitih uljarica pomoću plinske kromatografije. Sorte uljarica koje su analizirane su: uljna repica - zimska *(Brassica napus)*, obični suncokret *(Helianthus annuus)*, vrtni mak *(Papaver somniferum)*, obični lan *(Linum usitatissimum)* i soja *(Soja hispida)* [14].

Masti i ulja vrlo su važne tvari u ljudskoj i životinjskoj prehrani. Do nedavno su promatrane kao energetske namirnice dok se sada sve više promatraju njihovi učinci na zdravlje. Stoga su u ovom istraživanju analizirani sastavi masnih kiselina u biljnim uljima koja se najčešće koriste u prehrani. Svaka masna kiselina ima svoje osobine i specifično djelovanje, a njihov uzajamni odnos utječe na vrijednost i pozitivne učinke na zdravlje pojedinih ulja [14].
Ova opsežna analiza plinskom kromatografijom donijela je raznolike rezultate. Svaka sorta uljarica je posebno analizirana, identificirane su masne kiseline, te je prikazan raspon i prosjek masnih kiselina u svakom ulju. Usporedba svih rezultata prikazana je u tablici 4 [14].

Tablica 4. Prikaz zastupljenosti pojedinih skupina masnih kiselina u uljima (izraženo u g / 100 g ulja) [14].

	Uljarice						
MASNE KISELINE	Ulje repice	Ulje suncokreta	Lan predivi	Lan uljni	Mak	Maslinovo ulje iz trgovine	Soja
SFA	7.040	9.645	8.781	9.301	10.774	15.279	14.422
UFA	89.368	79.383	81.428	79.416	86.436	88.343	80.216
MUFA	64.851	28.845	16.451	13.670	13.208	82.917	18.593
PUFA	24.517	50.538	64.977	65.746	73.227	5.426	61.623
Ω – 3 FA	6.939	0.078	49.522	21.974	0.932	0.610	8.774
Ω – 6 FA	17.578	50.460	15.455	43.772	72.295	4.816	52.849
Ω – 9 FA	64.851	28.845	16.451	13.670	13.208	82.917	18.593
Ω–3 FA : Ω–6 FA	1 : 2.5	1 : 642.8	1 : 0.3	1 : 21.7	1 : 78.6	1 : 7.9	1 : 6.10
Ω – 3 FA : Ω–9 FA	1 : 9.4	1 : 393.1	1 : 0.3	1 : 5.1	1 : 14.3	1 : 135.9	1 : 2.17

Ω – 6 FA : Ω–9 FA	1 : 3.7	1 : 0.9	1 : 1.1	1 : 0.5	1 : 0.2	1 : 17.2	1 : 0.35
SFA : UFA	1 : 12.7	1 : 8.3	1 : 9.3	1 : 8.6	1 : 8.0	1 : 5.8	1 : 5.6
MUFA : PUFA	1 : 1.04	1 : 2.1	1 : 4.1	1 : 4.9	1 : 5.6	1 : 0.1	1 : 3.3

Zaključak ovog istraživanja je da ispitana ulja sadrže veliku količinu omega – 3 masnih kiselina (lan), omega – 6 masnih kiselina (suncokret, mak, lan i soja) i omega – 9 masnih kiselina (suncokret i repica), ali ipak nedovoljne količine omega – 3 masnih kiselina koje su potrebne za ljudsko zdravlje [14].

8.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Razvitkom tekućinske kromatografije opaženo je da se djelotvornost te metode povećava sa smanjenjem dimenzija zrna punila kojima se puni kolona. Tehnologija proizvodnje i korištenja punila manjih dimenzija razvila se tek u drugoj polovici prošlog stoljeća. Nova punila su bila promjera 10 µm i manje te su za tu tehnologiju bili potrebni visoki tlakovi pa time i složeniji i skuplji uređaji od jednostavnih staklenih kolona koje su se koristile do tad. Tako je ova metoda nazvana tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti kako bi se naglasila razlika između novijih uređaja i postupaka od onih klasičnih metoda kojima se koristila tekućinska kromatografija [11].

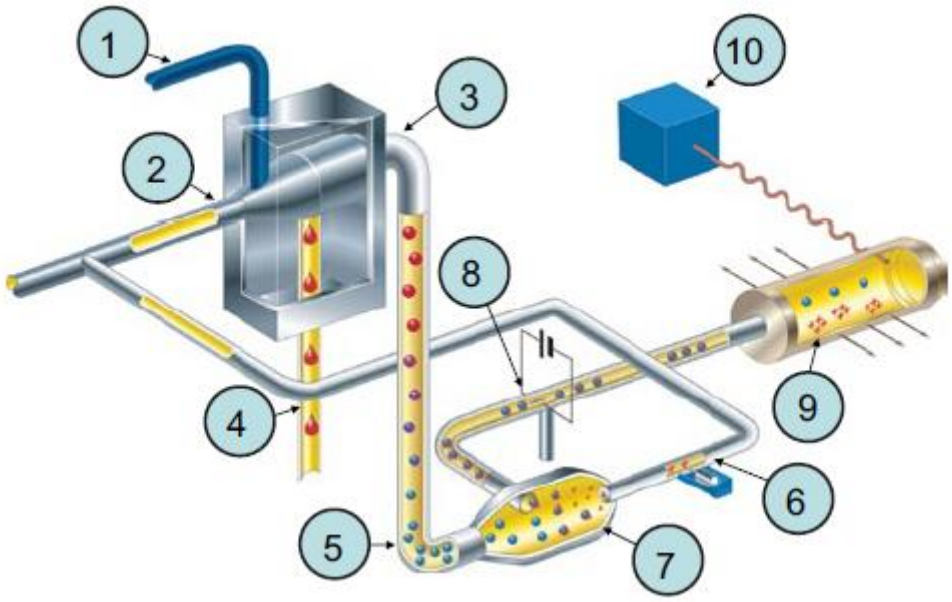
8.2.1. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINA IZ HRANE HPLC – OM I DETEKCIJA POMOĆU PUNJENJA AEROSOLOM

Omega - 3 masne kiseline se, tradicionalno, određuju plinskom kromatografijom. Novijim istraživanjima i testiranjima drugih metoda, znanstvenici su zaključili da plinska kromatografija nije jedini način određivanja masnih kiselina te da je taj pristup dugotrajan i može biti nepouzdan jer visoke temperature mogu utjecati na stabilnost polinezasićenih masnih kiselina. Ovdje je predstavljena jednostavna i izravna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i detekcija pomoću detektora s nabijenim aerosolom (eng. *charged aerosol detector*, CAD) koja se može koristiti za mjerenje omega - 3, - 6 i - 9 masnih kiselina u tradicionalnom i komercijalno proizvedenom mesu, ribi i ulju. Detektor s nabijenim

aerosolom omogućuje univerzalni pristup koji je osjetljiv. Nije potrebna nikakva derivatizacija i za razliku od UV detekcije, analit ne mora sadržavati kromofor [15].

Prikazana je HPLC metoda reverzne faze za određivanje omega masnih kiselina u uzorcima ulja koristeći metodu dvostrukog gradijenta i određivanje pomoću detektora s nabijenim aerosolom (Slika 4.). Ova kombinacija omogućuje određivanje različitih masnih kiselina u jednoj analizi i bez derivatizacije uzorka koja je potrebna za GC analizu [15].

Mobilnu fazu koja se koristila u ovom istraživanju čine voda, mravlja kiselina i mobilna faza B u omjeru 900:3.6:100, a mobilna faza B je smjesa acetona, acetonitrila, tetrahidrofurana i mravlje kiseline u omjeru 675:225:100:4. Korištena kolona u ovom HPLC sustavu je 3µm C30 kolona (250 × 3 mm).



1. Tekući eluens ulazi iz HPLC sustava
2. Javlja se pneumatska nebulizacija
3. Male kapljice ulaze u cijev za sušenje
4. Velike kapi izlaze na odvod
5. Osušene čestice ulaze u komoru za miješanje
6. Struje plina prolaze kroz cijev
7. Nabijeni plin se sudara sa česticama i prenosi se naboj
8. Uklanjaju se čestice visoke mobilnosti
9. Preostale nabijene čestice mjerene su vrlo osjetljivim elektrometrom
10. Signal se prenosi u softver kromatografskih podataka

Slika 4. Shematski prikaz detektora s nabijenim aerosolom [15].

U ovom istraživanju pripremljeno je nekoliko uzoraka čvrstih masnoća koji su ekstrahirani u 1.2 mL otopine metanola i kloroforma (1:1). Ekstrakti su zatim centrifugirani da bi se uklonile krute tvari i 1.0 mL ekstrakta je dodan u 4 mL otopine izopropanola i vode (3:2) i 1 mL 5 M KOH.

Svi uzorci tekućeg ulja (50 µL alikvoti) su otopljeni u 5 mL otopine izopropanola i vode (3:2) i 1 mL 5 M KOH. Svi uzorci su zagrijavani u vodenoj kupelji na 80 °C tijekom 1 h uz povremeno miješanje. Nakon što su uzorci ohlađeni, dodano je 25 µL mravlje kiseline za neutralizaciju uzorka [15].

Analizirano je nekoliko masnih kiselina u različitim uzorcima, uključujući omega - 3 masne kiseline (stearidonska kiselina (SDA), eikosapentanoična kiselina, α - linolenska kiselina, dokozaheksanska kiselina, dokozapentaenska kiselina i eikosatrienska kiselina (ETA)), omega - 6 masne kiseline (γ - linolenska kiselina (GLA), arahidonska kiselina (ARA), linoleinska kiselina (LLA), adrenalna kiselina i eikozadijenska kiselina (EDA)) i omega - 9 masne kiseline (oleinska i erukinska kiselina). Punjenje aerosola osjetljivo je na masu, zato ovaj detektor daje najbolje rezultate u usporedbi s detektorima korištenim kod HPLC tehnika. U tablici 5. prikazan je udio omega masnih kiselina u uzorcima koji su analizirani ovom metodom [15].

Tablica 5. Udio masnih kiselina u hidroliziranim uzorcima određenim HPLC – om (izraženo u %) [15].

Uzorak	Omega – 3	Omega – 6	Omega – 9	Omega – 3 : omega – 6
Riblje ulje	92.0	3.2	4.5	29.0
Riba, lan	81.0	13.0	5.9	6.1
Laneno ulje	59.0	22.0	19.0	2.7
Govedina	23.0	24.0	52.0	0.95
Ulje avokada	15.0	22.0	64.0	0.68
Piletina	25.0	40.0	35.0	0.62
Senfno ulje	14.0	23.0	63.0	0.62
Ulje kanole	13.2	33.2	53.6	0.39
Maslinovo ulje	4.8	13.0	82.0	0.37
Orahovo ulje	12.0	75.0	13.0	0.16

Ricinusovo ulje	4.2	62.0	34.0	0.067
Ulje šafranike	0.71	17.0	82.0	0.041
Sezamovo ulje	1.5	61.0	38.0	0.024
Kukuruzno ulje	1.6	72.0	26.0	0.022

Zaključak ovog istraživanja je da je pomoću ove metode moguće dobiti kvantitativne analize različitih masnih kiselina, uključujući omega - 3, - 6, i - 9 masne kiseline. Uzorci su hidrolizirani do odvojene masne kiseline i analizirani izravno pomoću HPLC - a s detektorom s nabijenim aerosolom. Također se mogu identificirati nepoznate slobodne masne kiseline koje mogu postojati u uzorku jer je mobilna faza kompatibilna s masenom spektrometrijom [15].

9. ALKALIMETRIJA

Iako su kromatografske metode u kombinaciji s ekstrakcijom najčešće metode za određivanje sastava različitih namirnica, mogu se koristiti i druge metode analize. U narednom tekstu opisana je jedna ne tako česta metoda analize sastava namirnica – alkalimetrija [16].

Alkalimetrija spada u volumetrijske metode. Volumetrijskim metodama određuju se količine tvari u otopini uzorka mjerenjem volumena standradne otopine koji je potreban da bi tvar potpuno izreagirala s reagensom. Volumetrijske metode dijele se s obzirom na vrstu kemijske rekacije na: kiselo – bazne reakcije, redoks reakcije, taložne rekacije i kompleksometrijske reakcije. Alkalimetrija je titrimetrijsko određivanje koncentracije kiselina standardnom otopinom lužine, dakle koristi se kiselo - baznim reakcijama [10].

Standardna otopina je reagens poznate koncentracije kojim se titrira otopina uzorka u kojem je analit. Titracija se izvodi pomoću birete ili nekog drugog volumetrijskog pribora i indikatora. Razlika između početnog i konačnog volumena u bireti je volumen potreban za završetak titracije, a indikator pokazuje završnu točku titracije promjenom boje u otopini [10].

9.1. ODREĐIVANJE OMEGA – 3 MASNIH KISELINA ALKALIMETRIJSKOM TITRACIJOM

Sadržaj omega - 3 u kapsuli ribljeg ulja određen je metodom titracije, alkalimetrijom. Ova metoda provedena je na tri načina. Prvo, masne kiseline su oksidirane s $KMnO_4$ pomoću H_2SO_4 kao katalizatora. Drugo, propanoična kiselina kao rezultat oksidacije odvojena je destilacijom. Nadalje, destilirana propanoična kiselina je titrirana. Preciznost, točnost i ponovljivost istraživanja su bili dovoljno dobri za daljnji razvoj ove metode za određivanja omega - 3 masnih kiselina [16].

U ovom eksperimentu, riblje ulje otopljeno je u parafinu, sumpornoj kiselini i kalijevom permanganatu te je refluksirano s polisorbatom kao katalizatorom. Nakon završetka, smjesa je destilirana. Destilat je bio titriran natrijevim hidroksidom standardiziranim oksalatnom kiselinom [16].

Opisana metoda pokazala je dobru točnost i preciznost. Za provjeru točnosti i pouzdanosti ove metode korištena je GC–MS metoda, a rezultati su pokazali da je alkalimetrija točnija i bolja metoda [16].

10. ZAKLJUČAK

Omega – 3 masne kiseline su jako važni spojevi za čovjeka. Od otkrića njihovih vrijednosti i pozitivnih utjecaja na zdravlje, namirnice bogate ovim masnim kiselinama postale su vrlo popularne u različitim kulturama. Najvažnije omega – 3 masne kiseline u prehrani su ALA, EPA I DHA. Glavna omega – 3 masna kiselina, ALA, najviše je prisutna u namirnicama biljnog porijekla kao što su sjemenke, soja, repica, orašasti plodovi i njihova ulja. Iz ALA se u organizmu mogu sintetizirati EPA i DHA koje su jako važne za zdravlje ljudskog organizma, a najzastupljeniji su u ribi i morskim plodovima.
Znanstvenim istraživanjima pokazano je da omega – 3 masne kiseline imaju pozitivan učinak na zdravlje, služe kao prevencija od raznih bolesti, a posebno su važne tijekom trudnoće i kod dojenčadi.

Kromatografske metode i ekstrakcija su najprimjenjenije metode za određivanje omega – 3 masnih kiselina, a tradicionalno se koristi GC – MS metoda. Razvojem GC – MS metode došlo je do otkrića novih masnih kiselina iz morskih organizama.

Novijim istraživanjima i testiranjima drugih metoda, znanstvenici su zaključili da plinska kromatografija nije jedini način određivanja masnih kiselina. Izravna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz CAD detekciju može se koristiti za mjerenje omega - 3, - 6 i - 9 masnih kiselina u proizvedenom mesu, ribu i ulju. Ova metoda se pokazala još uspješnijom od plinske kromatografije.
Postoje i ostale jednostavnije metode kemijske analize kao što je alkalimetrija, točnije alkalimetrijska titracija s kojom su također uspješno određene omega – 3 masne kiseline iz kapsula ribljeg ulja.
Svako novo eksperimentalno istraživanje teži otkriću neke nove i još uspješnije i točnije metode određivanja omega – 3 masnih kiselina.

11. LITERATURA

[1] W. E. Connor, Importance of n − 3 fatty acids in health and disease, *The American Journal of Clinical Nutrition* 71 (2000) 171–175.

[2] A. C. Rustan, C. A. Drevon, Fatty Acids: Structures and Properties, Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons, 2005.

[3] B. Tang, K.H. Row, Development of Gas Chromatography Analysis of Fatty Acids in Marine Organisms, *Journal of Chromatographic Science* 51 (2013) 599–607.

[4] K. Ivanovs, D. Blumberga, Extraction of fish oil using green extraction methods, *Energy Procedia* 128 (2017) 477-483.

[5] D. V. Bender, Omega – 3 masne kiseline – svojstva i djelovanja, *Dijetetika* 92/93 (2011) 234–240.

[6] A. P. Simopoulos, Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, *Am. J. Clin. Nutr.* 54 (1991) 438-463.

[7] P. Polančec, Završni rad, Unos omega-3 polinezasićenih masnih kiselina u trudnoći, Prehrambeno - biotehnološki fakultet, Zagreb, 2015.

[8] E. Tvrzicka, L. S. Kremmyda, B. Stankova, A. Zak, Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 155 (2011) 117–130.

[9] A.P. Simopolus, The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids, *Biomed Pharmacother.* 56 (2002) 365-379.

[10] N. Sakač, R. Matešić-Puač, Praktikum analitičke kemije 2, Odjel za kemiju, Osijek, 2015.

[11] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.

[12] A. Buratović, Završni rad, Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u acetonskim ekstraktima ružmarina, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017.

[13] S. Gulzar, M. Zuber, Determination of Omega-3 Fatty Acid Composition in Fresh Water Fish, *International Journal of Agriculture & Biology* 4 (2000) 342-343.

[14] E. Straková, V. Šerman, P. Suchý, N. Mas, J. Staňa, V. Večerek, Usporedba hranidbene vrijednosti ulja uljarica najčešće korištenih u Europi, *Krmiva* 51 (2009) 243-261.

[15] I. Acworth, M. Plante, B. Bailey, C. Crafts, Quantitation of Underivatized Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Foods by HPLC and Charged Aerosol Detection, *Planta Medica* 77 (2011) 1 - 6.

[16] S. Handayani, C. Budimarwanti, Development of simple analytical method of omega – 3 fatty acid by propanoic acid determination using alkalimetric titration, *Indo. J. Chem.* 6 (2006) 322 – 324.