Lakohlapljive polarne sastavnice maslinovog ulja kao biomarker kvalitete maslinovog ulja -primjena HSS-GC-FID tehnike

Bošnjak, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:355958

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Ines Bošnjak

Lakohlapljive polarne sastavnice maslinovog ulja kao biomarker kvalitete maslinovog ulja – primjena HSS-GC-FID tehnike

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar Turk.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk, na posvećenom vremenu, znanju kao i stručnim savjetima kojima mi je pomogla u uspješnoj izradi ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem zakladi Adris koja je financirala projekt „Razvoj novih analitičkih metoda kao preduvjet proizvodenje visokokvalitetno i ekološki dobivenog maslinovog ulja“(voditeljica: Ana Mornar) te Agrolaguni d.d (Poreč, RH) jer je donirala uzorak maslinovog ulja.

Veliko hvala svim prijateljima koji su uljepšali studentske dane i uvijek bili oslonac.

Najviše hvala mojoj obitelji i dečku koji su mi bili bezuvjetna podrška kako tijekom studiranja, tako i uvijek u životu.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. MASLINOVO ULJE 1
1.1.1. Kemijski sastav maslinovog ulja 1
1.1.2. Razgradnja maslinovog ulja 3
1.1.3. Kvalitativni parametri ulja 4
1.1.4. Kategorizacija maslinovih ulja 4
1.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA 6
1.2.1. Uzorkovanje para iznad tekućina ili krutina 8
1.2.2. Prednosti i ograničenja plinske kromatografije 10
2. OBRAZLOŽENJE TEME 11
3. MATERIJALI I METODE 12
3.1. MATERIJALI 12
3.1.1. Kemikalije 12
3.1.2. Pribor 12
3.1.3. Radni instrumenti 12
3.1.4. Programski paketi 13
3.2. METODE 14
3.2.1. Priprema standardnih otopina 14
3.2.2. Priprema uzorka maslinovog ulja 14
3.2.3. HSS-GC-FID analiza 14
4. REZULTATI I RASPRAVA 15
5. ZAKLJUČAK 24
6. LITERATURA 25
7. SAŽETAK 28
8. SUMMARY 29

1. UVOD

1.1. 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 terapeutskoj vrijednosti sredinom dvadesetih godina doživljava ekspanziju te se širi van granica Mediterana (Šindrak i sur., 2007). Maslinovo ulje dobiva se iz ploda nekoliko sorti stabla *Olea europea L*. Svaku sortu karakteriziraju specifična fizička i biokemijska obilježja zahvaljujući kojima daje ulja različitog sastava i svojstava. Osim o sorti sastav maslinova ulja ovisi i o klimi, podneblju, razdoblju ubiranja te načinu prerade plodova. Ekstra djevičansko maslinovo ulje je bogato prirodnim antioksidansima kao što su tokoferoli, karotenoidi, steroli i fenoli. Studije su pokazale da te tvari, pogotovo polifenoli, imaju važnu ulogu zaštite organizma od štetnog djelovanja slobodnih radikala zbog čega smanjuju rizik kardiovaskularnih oboljena, raka i cerebralnog starenja (Minioti i Georgiou, 2010.).

1.1.1. Kemijski sastav maslinovog ulja

Maslinovo ulje sadrži dvije osnovne frakcije: osapunjivu (98,5-99,5%) i neosapunjivu (0,5-1,5%). Tri glavna sastojka osapunjive frakcije su trigliceridi, slobodne masne kiseline i fosfolipidi. Trigliceridi koji se nalaze u osapunjivom dijelu u svom sastavu sadrže određene masne kiseline. Sadržaj masnih kiselina varira ovisno o sorti masline, stupnju zrelosti ploda, nadmorskoj visini, klimi i mnogim drugim čimbenicima. Međunarodni savjet za maslinovo ulje odredio je sljedeće granične vrijednosti za sastav masnih kiselina u maslinovom ulju:

Oleinska kiselina	55,0 - 83,0 %
Palmitinska kiselina	7,5 -20,0 %
Linolna kiselina	3,5 – 21,0 %
Stearinska kiselina	0,5 – 5,0 %
Linolenska kiselina	$\leq$ 0,9 %

Iz gore navedenog moguće je zaključiti da u sastavu masnih kiselina maslinovog ulja prevladava jednostruko nezasićena oleinska kiselina. Mali udjel imaju zasićene masne kiseline, palmitinska i stearinska te višestruko nezasićene masne kiseline linolna i α-linolenska, koje su esencijalne masne kiseline te su neophodne za normalno odvijanje značajnih bioloških procesa u organizmu. Dakle maslinovo ulje visoke kakvoće ima umjerenu količinu zasićenih masnih kiselina (oko 16%) te izrazito visok udjel oleinske kiseline (70-

80%) i optimalnu količinu višestruko nezasićenih esencijalnih masnih kiselina (8-10%). Takav sastav masnih kiselina čini maslinovo ulje vrednijim od drugih jestivih masti i ulja.

U pratnji osapunjivih sastojaka uvijek dolazi manja količina lipida iz drugih skupina koji se nazivaju neosapunjivom frakcijom te za razliku od osapunjive frakcije pokazuju značajnija odstupanja u količini i kvaliteti. Neosapunjivu frakciju čine: vitamini (tokoferoli), steroli, ugljikovodici, fenolne tvari, triterpeni, alifatski alkoholi i druge sastavnice. Neke od njih odgovorne su za terapeutski učinak dok su druge važne za senzorska svojstva ulja, a velika skupina spojeva su djelotvorni prirodni antioksidansi koji povećavaju otpornost ulja na kvarenje.

Najzastupljenija skupina spojeva su ugljikovodici koji sačinjavaju 60% neosapunjive frakcije. 60-70% ugljikovodika odnosi se na skvalen, preteču spojeva koji djeluju na organoleptičke karakteristike ulja, a ostatak su zasićeni alifatski ugljikovodici i dienski ugljikovodici koji su bitni za dokazivanje autentičnosti i kvalitete.

Tokoferoli su prirodni antioksidansi koji sprječavaju kvarenje maslinovog ulja. Maslinovo ulje sadrži α, β, γ i δ oblike od kojih α-tokoferol (vitamin E) ima najznačajniju biološku aktivnost. Kako bi α- tokoferol imao zaštitnu ulogu kvantitativni odnos između vitamina E (izražen u mg) i linolenske kiseline (izražen u g) ne bi trebao biti manji od 0,79 mg/g. Taj odnos u maslinovu ulju je oko 3 mg/g.

Kao tokoferoli, prirodno antioksidativno djelovanje imaju i steroli od kojih je najvažniji β-sitosterol zbog svoje biološke važnosti u smanjenju crijevne apsorpcije viška kolesterola. Polifenoli također imaju značajnu antioksidativnu aktivnost te je utvrđeno sinergističko djelovanje s α- tokoferolom na stabilnost djevičanskog maslinova ulja. Glavni polifenolni spoj u maslinovu ulju je oleuropein koji mu daje karakterističnu gorčinu.

Maslinovo ulje sadrži i klorofil, zeleni pigment koji mu daje karakterističnu boju. Preradom zelenijih plodova dobiva se ulje s većom količinom klorofila. Potrebno je istaknuti kako on u tami djeluje kao antioksidans dok u prisustvu svjetla pospješuje oksidaciju ulja.

U maslinovu ulju su prisutni alifatski i triterpenski alkoholi koji imaju ulogu intermedijara u transformacijama koje se odnose na skvalen i prethode nastajanju sterola (Žanetić i Gugić, 2006).

1.1.2. Razgradnja maslinovog ulja

Unutar maslinovog ulja tijekom skladištenja mogu se dogoditi različite promjene koje uzrokuju njegovo kvarenje. Vrsta promjena ovisi o uvjetima skladištenja ulja. Najčešće promjene su hidroliza (lipoliza) i oksidacija. Hidroliza se počinje događati još u plodu masline, a proces oksidacije nastupa nakon prerade i za vrijeme čuvanja ulja. Pojavnost tih procesa predstavlja stalan i nepovratan utjecaj na konačnu kvalitetu ulja.

Hidroliza

Hidrolizom triglicerida iz maslinovog ulja nastaju slobodne masne kiseline i alkohol glicerol. Posljedično dolazi do povećanja ukupnih masnih kiselina te promjene okusa uzrokovane određenim masnim kiselinama. Glavni utjecaj na hidrolizu imaju vlaga, prisutnost enzima, mikroorganizama i temperatura. Hidrolizu u maslinovom ulju možemo podijeliti na enzimsku i mikrobnu lipolizu.

Mikrobna lipoliza nastaje zbog mikroorganizama koji unutar masline oslobađaju enzim lipazu, a nastaju zbog neprikladnog skladištenja plodova između berbe i prerade. Enzimska lipoliza posljedica je prisustva endogenih enzima u plodu masline koji svoju aktivnost iskazuju tek kad je plod obojen tamno ljubičasto. Oštećeni plodovi pokazuju veću lipolitičku aktivnost od zdravih, čvrstih plodova.

Oksidacija

Maslinovo ulje oksidira u prisustvu kisika kojeg je moguće naći iznad ulja u spremniku u kojem se čuva ili može biti otopljen u ulju. Količina kisika otopljenog u ulju ovisi o metodi prerade kao i uvjetima njegova skladištenja i pakiranja. Osim kisika na oksidaciju utječu povišena temperatura, svjetlost, ionizacijsko zračenje te prisustvo metala poput bakara i željeza. Obzirom da produkti oksidacije imaju neugodan okus i miris, nepovoljno utječu na organoleptička svojstva ulja te umanjuju njegovu prehrambenu vrijednost. Maslinovo ulje bogato je antioksidansima koji usporavaju ili onemogućuju oksidaciju, a to su fenolni spojevi (npr. Oleuropein), tokoferoli i steroli. Upravo zahvaljujući prirodnim antioksidansima i niskom sadržaju višestruko nezasićenih masnih kiselina (linolne i linolenske kiseline) maslinovo ulje je otporno na autooksidaciju. S druge strane izrazito je osjetljivo na fotooksidaciju. Pod utjecajem svjetlosti dolazi i do raspadanja pigmenta klorofila koji u tami djeluju kao antioksidansi te su odgovorni za karakterističnu zelenu boju maslinova ulja (Žanetić i Gugić, 2005).

1.1.3.Kvalitativni parametri ulja

Obzirom na navedene procese kvarenja prema Pravilniku o uljima ploda i komine maslina (NN br.7/2009) definirani su osnovni parametri kakvoće maslinova ulja: udio ukupnih slobodnih kiselina, peroksidni broj, koeficijenti ekstincije K232 i K270 i organoleptička svojsva.

Udio slobodnih masnih kiselina izražava se kao masa u gramima slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja. Određivanjem ukupne vrijednosti slobodnih masnih kiselina prate se hidrolitičke promjene koje se zbivaju u ulju.

Peroksidni broj predstavlja količinu onih tvari u uzorku, izraženu u milimolima aktivnog kisika po kilogramu, koje oksidiraju kalij jodid u zadanim uvjetima. Može se izraziti i u milievivalentima aktivnog kisika po kilogramu. Peroksidni broj pokazatelj je primarne oksidacije unutar ulja.

Spektrofotometrijsko određivanje u ultraljubičastom području može pružiti informacije o kvaliteti masti, njezinom stanju očuvanosti i promjenama uzrokovanim tehnološkim procesima. Zbog prisustva konjugiranih dienskih i trienskih sustava dolazi do apsorbancije na određenim valnim duljinama. Spomenute apsorbancije izražene su kao specifične ekstinkcije E1% 1 cm (ekstinkcija 1%-tne otopine masti u zadanom otapalu, s duljinom puta od 1 cm) i dogovorno se označavaju s K (također i kao »koeficijent ekstinkcije«).

Provjeru organoleptičkih svojstava ulja provodi tijelo nadležno za provođenje službene kontrole, posredstvom grupa odabranih i osposobljenih ocjenjivača senzorskih svojstava djevičanskih maslinovih ulja ovlaštenih od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.

1.1.4. Kategorizacija maslinovih ulja

U Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN br.7/2009) maslinova ulja se razvrstavaju u šest kategorija pod sljedećim nazivima: djevičanska maslinova ulja, rafinirano maslinovo ulje, maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja, sirovo ulje komine maslina, rafinirano ulje komine maslina i ulje komine maslina.

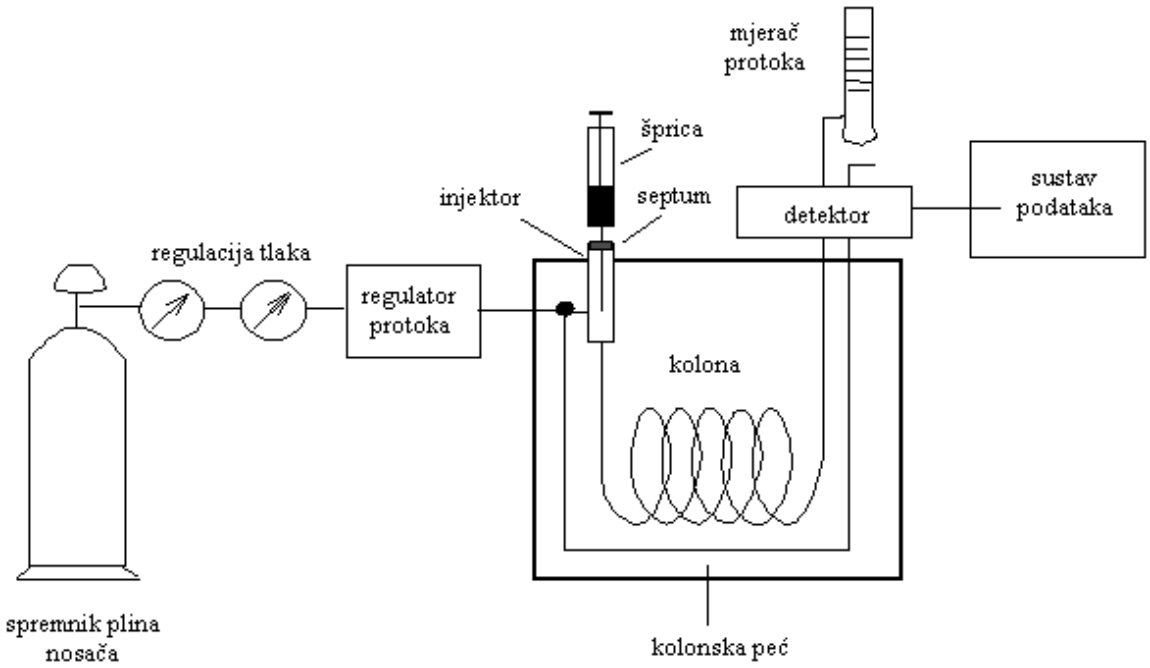
Djevičansko maslinovo ulje je prirodno ulje ploda masline (*Olea Europea* L.), proizvedeno isključivo mehaničkim postupcima, bez kemijskog tretmana tijekom ili nakon procesa proizvodnje i u njemu bi trebali biti sačuvane sve izvorno prisutne sastavnice zaslužne za njegova specifična kemijska, senzorska i prehrambena svojstva (De Santis i Frangipane, 2015**).** Djevičanska maslinova ulja se dijele na djevičansko maslinovo ulje, ekstra djevičansko

maslinovo ulje i maslinovo ulje lampate. Jedina razlika između ekstra djevičanskog i djevičanskog maslinova ulja je u sadržaju masnih kiselina. Ekstra djevičansko maslinovo ulje sadrži najviše 0,8 grama dok djevičansko maslinovo ulje sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja. Maslinovo ulje lampate je djevičansko maslinovo ulje neprihvatljivih senzorskih svojstava koje sadrži više od 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.

1.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography,* GC) je separacijska metoda u kojoj plinovita pokretna faza eluira sastavnice uzorka prolazeći kolonom s nepokretnom fazom, a odjeljivanje smjese je u skladu s vremenom provedenim u nepokretnoj fazi (Nigović i sur., 2014). Obzirom na nepokretnu fazu koja može biti u čvrstom ili tekućem stanju ovu kromatografsku tehniku moguće je podijeliti na plinsko-čvrstu kromatografiju koja se temelji na adsorpcijsko-desorpcijskom procesu između plinovite i čvrste faze te na plinsko-tekućinsku kromatografiju čiji je temelj funkcioniranja razdioba tvari između pokretne plinovite i nepokretne tekuće faze (Luterotti, 2002).

Instrument na kojem se provodi navedena kromatografska tehnika naziva se plinski kromatograf. Sastoji se od sustava za dovod plina nositelja, sustava za regulaciju tlaka i protoka plina nositelja, injektora, kromatografskih kolona, pećnice i detektora (Nigović, 2014). Na **Slici 1** shematski je prikazan plinski kromatograf.



Slika 1. Shematski prikaz plinskog kromatografa (Luterotti, 2012).

Sustav za dovod plina nositelja

Plin nositelj predstavlja pokretnu fazu te je nužno da je kemijski intertan. Kao plinovi nositelji upotrebljavaju se helij, dušik i vodik.

Sustav za uštrcavanje uzorka (Injektor)

Uzorak se uštrcava kroz gumeni septum, a prilikom uštrcavanja uzorka bitno je da se ne unese prevelika količina uzorka jer u suprotnom dolazi do širenja zona. Sustav za uštrcavanje je zagrijan na temperaturu 150-250 ºC ovisno o hlapljivosti uzorka. Tijekom unošenja uzorka dolazi do trenutnog isparavanja uzorka (Watson, 2012).

Kod kapilarnih kolona koristi se vrsta injektora *split*/*splitless* kod kojeg je uzorak moguće unositi na dva načina. Tako da se cijeli uzorak unese na kolonu (*splitless*) ili da se podijeli na dva nejednaka dijela pri čemu se manji dio nanosi na kolonu, a veći odventilira (*split*) (Nigović, 2014). Omjer većeg i manjeg dijela uzorka iznosi od 10:1 do 100:1 (Watson, 2012). Na taj način se sprječava širenje i asimetrija pikova zbog ekspanzije otapala u kojem je uzorak otopljen (Nigović, 2014).

Kromatografske kolone

Kromatografske kolone mogu biti punjene ili kapilarne. Punjene kolone mogu biti staklene, metalne ili teflonske cijevi unutarnjeg promjera 2-5 mm. Punjene su čvrstim nosačem velike specifične površine (kalcijev silikat) koji je impregniran tankim slojem tekuće neokretne faze različite polarnosti (makrogol, polietilenglikol, polisiloksani). Kako bi se smanjila polarnost nepokretne faze slobodne silanolne skupine na nosaču se silaniziraju. Punjene kolone su manjeg razlučivanja od kapilarnih te podnose temperature do 280 ºC jer pri višim temperaturama isparava tekuća nepokretna faza (Nigović, 2014).

Kapilarne kolone građene su od izvučena kvarca te su izvana prevučene poliamidom koji pridonosi fleksibilnosti kolone. Unutrašnji promjer je između 0,15 i 0,5 mm. Unutrašnja stijenka kolone prevučena je tankim slojem nepokretne faze (0,1-5 μm) koji se kemijski veže na silanolne grupe stijenke kolone. Kao nepokretna faza najčešće se koriste različito supstituirani siloksani. Veće su djelotvornosti od punjenih kolona te su izdržljivije na većim temperaturama.

Pećnica

Pećnica plinskog kromatografa osigurava odgovarajuću temperaturu unutar kolone te sadrži ventilator koji omogućava ravnomjernu raspodijelu topline. Pećnica može biti programirana da termostatira kolonu izotermalno (konstantna temperatura) ili da programirano povisuje temperaturu (postepeno ili skokovito). Programirano povišenje temperature omogućuje da se odijele uzorci šireg raspona vrelišta (Watson, 2012).

Detektori

U literaturi je opisano više vrsta detektora koji se koriste u plinskoj kromatografiji ovisno o svojstvima analita. Najučestalije korišteni su:

Plameno ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionisation Detector*, FID)

Dolazi do sagorijevanja organskih sastavnica u plamenu pri čemu nastaju ionski međuprodukti i elektroni koje elektroda u detektoru bilježi kao pojačanje struje (Nigović, 2014). Ovaj tip detektora detektira sastavnice koje sadrže ugljik i vodik. Nije osjetljiv na ugljikove atome vezane na kisik, dušik ili klor. Iznimno je osjetljiv te u kombinaciji s kapilarnom plinskom kromatografijom može detektirati količinu od 100 pg-10 ng tvari.

Detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD*)*

Plin nositelj se ionizira pod utjecajem radioaktivnog izvora. Kada se u struji plina nositelja nađu organske molekule dolazi do smanjenja struje što detektor bilježi. Najčešće se koristi kod analize halogena, organometalnih i nitro spojeva.

Detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD)

Dolazi do promjene toplinske vodljivosti struje plina nositelja zbog prisutnosti analita. U odnosu na FID detektor relativno je neosjetljiv na organske komponente, ali nije destruktivan pa analiti nakon analize ostaju nepromijenjeni (Watson, 2012).

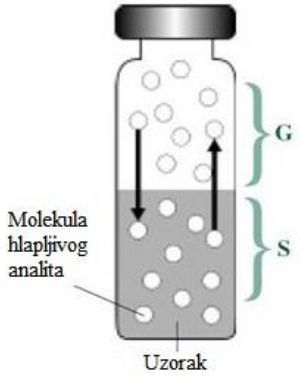
Maseni detektor (engl. *Mass Spectrometer*, MS)

Masenu spektrometriju je moguće kombinirati s kromatografskim metodama. Omogućuje određivanje molekulske mase ionizirane molekule ili bilo kojeg fragmenta molekule nastalog njezinim cijepanjem. Molekule se ioniziraju u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska uzorka u visoki vakuum, a zatim se primjenom električnog ili magnetskog polja razdvajaju prema njihovoj masi (Nigović, 2014).

1.2.1. Uzorkovanje para iznad tekućina ili krutina

Uzorkovanje para iznad tekućih ili krutih uzoraka (engl. *Head Space Sampling*, HSS) je sofisticirana metoda pripreme uzoraka za određivanje ostatnih otapala i hlapljivih onečišćenja u krutim ili tekućim uzorcima. Postoje dvije varijante tehnike: statična ili dinamična. Kod statične headspace analize uzorak je otopina ili se otapa u prikladnom slabo hlapljivom otapalu s niskom koncantracijom mogućih interferencije. Prilikom pripreme uzorka treba paziti da ne dođe do gubitka hlapljivih analita. Pravilno pripremljeni uzorak se prenosi u staklenu bocu zatvorenu metalnim čepom s gumenom septom. Uzorak se drži dovoljno dugo na određenoj temperaturi dok se ne uspostavi ravnoteža između plinovite i krute odnosno tekuće faze. Uzorak ne smije sadržavati onečišćenja koja bi pri povišenoj temperaturi mogla

reagirati s ostalim sastavnicama uzorka. Određeni volumen para iznad otopine/krutine zatim se povlači iz staklene posude i prenosi u plinski kromatograf. Kako bi se olakšalo unošenje uzorka kod kapilarnih kolona primjenjuje se *split* injektiranje. Primjerice, omjer odventiliranog i nanesenog dijela 10:1 osigurava da se uzorak volumena 0,25 ml injicira unutar 1,5 sekundi pri brzini protoka od 1 ml/min (Watson, 2012). Na **Slici 2** shematski je prikazano headspace injektiranje.



Slika 2. Shematski prikaz headspace injektiranja (www. pharmainfo. net).

Dinamična headspace analiza još se naziva *purge trap* analiza. Plin nositelj prikuplja uzorak odnosno analite te pri tome nosi hlapljive supstance do polimernog adsorbensa na koji se adsorbiraju. Ukoncentrirani hlapljivi analiti na adsorbensu se desorbiraju povišenjem temperature te se prenose na plinski kromatograf nošeni strujom inertnog plina nositelja. Obzirom da se analiti ukoncentiravaju na adsorbensu ovo je metoda izbora za analizu tvari prisutnih u iznimno niskim koncentracijama u uzorku (Nigović, 2014, Mornar, 2013).

1.2.2.Prednosti i ograničenja plinske kromatografije

Prednosti plinske kromatografije su točnost i preciznost u odjeljivanju, posebno kada se koristi unutrašnji strandard. Kada se koriste kapilarne kolone ima veću moć odjeljivanja nego tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC). Uz to metoda je automatizirana te koristi autosampler pri injektiranju. Budući da je prikladna za povezivanje s različitim vrstama detektora, moguće ju je koristiti za određivanje spojeva koji nemaju kromofore. Pokretna faza su inertni plinovi i ne postoje posebni zahtjevi za odlaganjem, a čak i kad se kao plin nositelj koristi helij, pokretna faza je jeftinija u usporedbi s organskim otapalima kod HPLC.

Nedostaci metode su mogućnost analize samo termostabilnih i hlapljivih analita. Nadalje, neki analiti zahtijevaju derivatizaciju kako bi postali hlapljivi, a to unosi dodatni korak u analizi i povećava opasnost od mogućih interferencija te smanjuje osjetljivost metode. Uz to se moraju injektirati vrlo mali volumeni uzorka što otežava kvantitativnu analizu, premda omogućava analizu teško dostupnih uzorka. Na kraju tehnika je neprimjeniva za analizu vodenih otopina i soli (Nigović, 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Republika Hrvatska ima dugogodišnju tradiciju uzgoja masline i proizvodnje maslinovog ulja. Ipak, posljednjih godina intenzivno se razvija svijest među proizvođačima o važnosti osiguranja kvalitete maslinovog ulja. Na kvalitetu ulja utječu brojni čimbenici: sorta masline, klimatske prilike, sustav uzgoja i primjena agrotehničkih mjera, stupanj dozrelosti plodova, vrijeme između berbe i prerade, metoda proizvodnje te skladištenje konačnog proizvoda.

Maslinarstvo se u Republici Hrvatskoj uglavnom zasniva na proizvođačima koji posjeduju maslinike male ili srednje veličine na kojima nisu u mogućnosti kontrolirati sve stadije proizvodnje. Ovakvi uvjeti uzgoja i proizvodnje otežavaju im stvaranje kvalitetnog proizvoda, posebice u slabim godinama. Nadalje, potrebno je istaknuti kako mali proizvođači maslinovog ulja ne raspolažu i vlastitom uljarom što produljuje vrijeme od berbe maslina do proizvodnje - ulja čime se značajno gubi na kvaliteti ulja.

Imperativ u proizvodnji kvalitetnog proizvoda je redovita kontrola koja se temelji na brzim, pouzdanim i naprednim analitičkim tehnikama.

Donedavno udio polarnih lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja, poput etanola i metanola nije bio istražen. Istraživanje Gomez-Coca i sur. provedeno u Španjolskoj tijekom 2015. godine pokazalo je kako ispitana maslinova ulja sadrže etanol i metanol. S toksikološkog stajališta udio ovih sastavnica je neznatan, no njihova koncentracija mogla bi biti pokazatelj kvalitete maslinovog ulja budući da se smatra da ovi alkoholi nastaju tijekom propadanja ploda kao i tijekom skladištenja gotovog proizvoda.

S analitičkog stajališta određivanje polarnih lakohlapljivih spojeva prisutnih u niskim koncentracijama u maslinovom ulju predstavlja izazov. Zbog brojnih prednosti plinska kromatografija je tehnika izbora za analizu lakohlapljivih spojeva. No ove sastavnice je potrebno prije analize plinskom kromatografijom ekstrahirati iz uzorka. HSS tehnika omogućava ekstrakciju lakohlapljivih analita iz složenih uzoraka bez prethodne obrade uzoraka.

Stoga je cilj ovog rada razviti pouzdanu HSS-GC-FID metodu za određivanje lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja proizvedenog u RH.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

2-propanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Aceton (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Etanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Etil-acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.1.2. Pribor

Automatske pipete, (0,5 μL – 10 mL) (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

Bočice za uzorkovanje headspace tehnikom s aluminijskim čepom, 20 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Kolona za plinsku kromatografiju, DB-624, dimenzija 30 m x 0,53 mm, debljina filma 3 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Otvarač bočiva s aluminijskim čepom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Zatvarač bočica s aluminijskim čepom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

3.1.3. Radni instrumenti

Analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

Generator dušika, model NG250A (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Generator vodika, model CFH200 (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Kompresor zraka, model ZAO35A (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Plinski kromatograf, model 6850 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Sustav za pročišćavanje vode WaterPro (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

Uređaj za headspace uzorkovanje, model G1888 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

3.1.4. Programski paketi

GC ChemStation, Rev. A. 10 02 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Standardna otopina dobivena je razrjeđivanjem acetona, etanola, etil-acetata, 2-propanola te metanola s ultračistom, deioniziranom vodom do koncentracije 20% (v/v).

Kao unutarnji standard korišten je acetonitril, također koncentracije 20% (v/v).

3.2.2. Priprema uzorka maslinovog ulja

Ispitivani uzorak se analizira bez prethodne obrade. Neposredno prije analize u četiri bočice za uzorkovanje headspace tehnikom, volumena 20 mL, izvaže se po 3,00 g uzorka primjenom analitičke vage. U svaki od uzoraka doda se po 1 μL stanardne otopine unutarnjeg standarda acetonitrila te se u posljednja tri uzorka doda zadani volumen (0,5 μL, 1 μL i 2 μL) radne otopine standarda. Bočice se potom zatvore aluminijskim čepom pomoću zatvarača bočica.

3.2.3. HSS-GC-FID analiza

Nakon što se uzorci pripreme prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. prenesu se u instrument za HSS analizu. Uzorak se zagrijava bez trešnje 15 minuta pri 90˚C. Potom se unosi u plinski kromatograf tijekom 1 minute pri temperaturi od 115˚C. Plinska kromatografija je provedena na instrumentu Agilent 6850 te je za razdvajanje analita primjenjena kolona DB-624, dimenzija 30 m x 0,53 mm, debljina filma 3 μm. Kao plin nosač koristi se dušik za kromatografiju brzine protoka 5,0 mL/min. Temperatura injektora iznosi 230 ˚C, a za detekciju analita se koristi plameno-ionizacijski detektor s temperaturom detektora od 300 ˚C. Razdvajanje analita provodi se primjenom temperaturnog programa kako bi se postiglo optimalno razlučivanje analita. Korišten je gradijentni temperaturni program uz početnu temperaturu kolone 40 ˚C tijekom dvije minute. Nakon toga se temperatura povećava za 15 ˚C svake minute sve do konačne temperature od 190 ˚C. Dobiveni kromatogrami obrađivani su računalnim programom ChemStation te su dobiveni rezultati potom obrađeni primjenom računalnog programa Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Plinska kromatografija je tehnika izbora za analizu lakohlapljivih analita poput niskolančanih alkohola i njihovih estera te je pretraživanjem literature utvrđeno kako je navedena tehnika primijenjena za analizu upravo ovih sastavnica u različitim uzorcima poput hrane, pića, dodaka prehrani te bioloških uzoraka (Gunduz i sur., 2013; Mornar i sur., 2016; Beltrán i sur., 2015, Bursová i sur., 2015; Amidžić Klarić i sur., 2015; Mornar i sur., 2011; Mornar i sur., 2013).

Međutim, kao jedan od najvećih nedostataka navedene tehnike ističe se neprikladnost za analizu uzoraka koji su kompleksne smjese lakohlapljivih i teškohlapljivih tvari. Mnoge od njih, ako bi se našle na koloni plinskog kromatografa, kontaminirale bi instrument ili kromatografsku kolonu. Neki od analita bi čak reagirali s nepokretnom fazom kolone. Stoga se kao ključan korak u razvoju analitičkih metoda primjenom plinske kromatografije često ističe priprema složenih uzoraka ili predanalitički postupci. U tu svrhu se primjenjuje čitav niz tehnika poput mikroekstrakcije čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME), ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid Liquid Extraction*, LLE) kao i uzorkovanje para iznad otopine (HSS) (de Koning i sur., 2009)

Pretraživanjem literature uočeno je kako je plinska kromatografija često korištena za analizu različitih sastavnica maslinovog ulja različitog porijeka (Jabeur i sur., 2017; Bajoub i sur., 2016; Purcaro i sur., 2014). Ove analitičke metode najčešće su uključivale opsežnu pripravu uzorka. Priprava uzorka obično obuhvaća nekoliko koraka kao što su ekstrakcija, pročišćavanje dobivenih ekstrakta i ukoncentriranje analita. Pojedine metode uključivale su još i derivatizaciju analita.

Gomez-Coca i sur. (2015) su predložili HSS-GC-FID metodu za određivanje etanola i metanola u 16 uzoraka maslinovog ulja dobivenog iz Španjolske. Iz njihovog istraživanja moguće je utvrditi kako je u svim ispitanim uzorcima nađeno manje od 10 mg/kg metanola i etanola.

Stoga je cilj ovog rada bio razviti analitičku metodu za određivanje ne samo niskolančanih alkohola metanola i etanola, već i njihovih estera u uzorcima maslinovog ulja dobivenih u Republici Hrvatskoj.

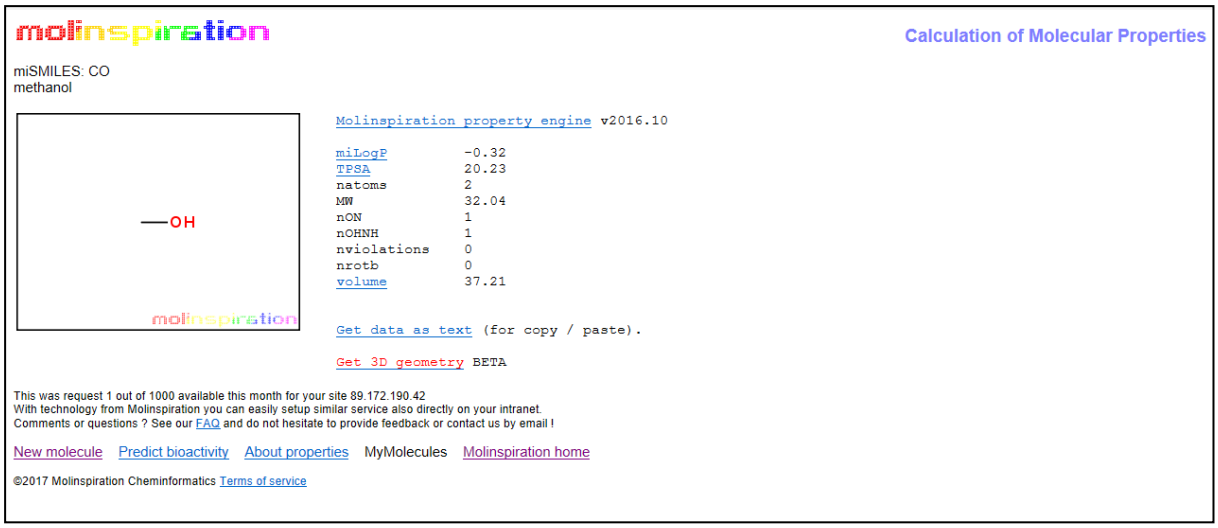
Dakle, pregledom literature kao i dosadašnim istraživanjima na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova bilo je moguće pretpostaviti da bi plinska kromatografija s plameno-ionizirajućim

detektorom te pripremom uzoraka s HSS tehnikom mogla biti tehnika izbora za analizu polarnih lakohlapljivih sastavnica maslinvog ulja.

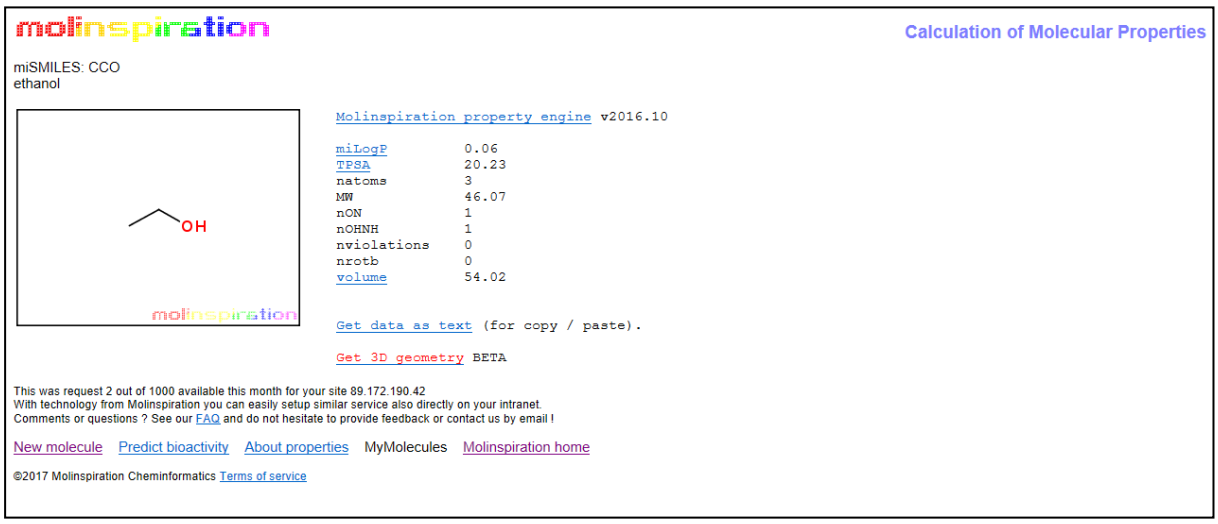
Tijekom razvoja analitičke metode pokušalo se zadovoljiti sljedeće zahtjeve:

- razviti brzu, jednostavnu i pouzdanu metodu kako bi analize mogao obavljati što veći broj osoba u laboratoriju, odnosno kako bi se lakše transferirala u druge laboratorije,
- razviti ekonomičku analitičku metodu primjenom što manje kemikalija i instrumenata,
- osigurati visok stupanj automatizacije analitičkog postupka s ciljem smanjivanja pogrešaka te izloženosti analitičara kemikalijama i
- osigurati ekološku prihvatljivost primjenom malih količina otapala i reagensa.

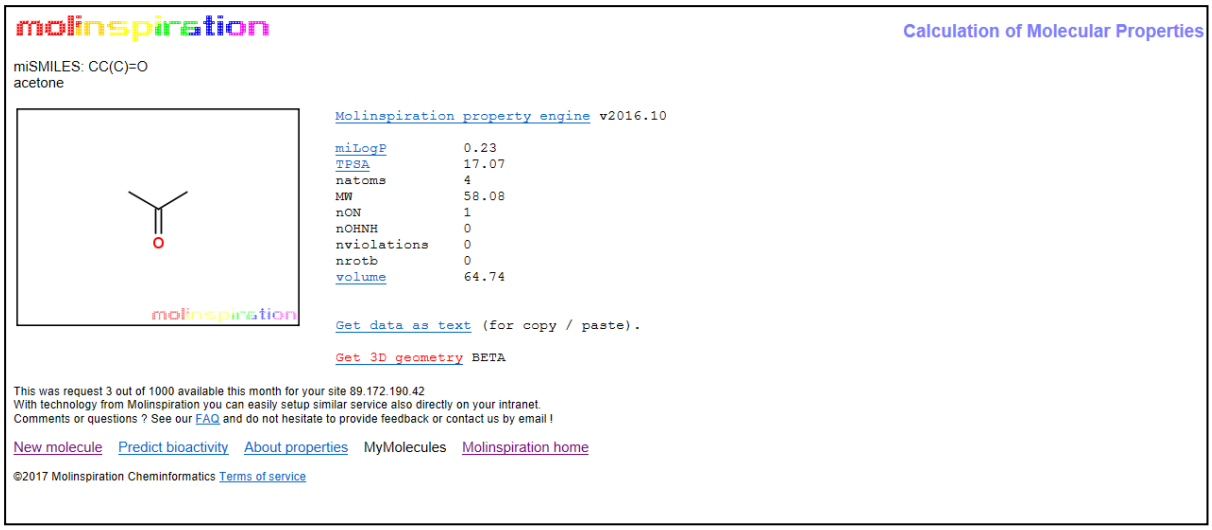
HSS tehnika omogućila je visoki stupanj automatizacije postupka pripreme uzoraka. Naime, uzorci su analizirani gotovo bez ikakve predobrade. Redukcijom broja koraka u analitičkom postupku pokušalo se smanjiti varijabilnost analitičkih rezultata, odnosno mjerna nesigurnost koja ovisi o svakom koraku analitičkog postupka. Optimizacijom HSS postupka postignuta je najveća ekstrakcijska učinkovitost za sve analite. Zagrijavanjem uzoraka tijekom 15 min postignuto je ravnotežno stanje za sve analite što je omogućilo i visoku ponovljivost ekstrakcijskog postupka (Petkova, 2015).
Budući da je maslinovo ulje iznimno složen uzorak te da se očekivala velika razlika u sastavu i organoleptičkim svojstvima (boja, konzistencija, prisutnost sedimenta ...) među pojedinim uzorcima, određivanje odabranih lakohlapljivih sastavnica predstavljalo je analitički izazov. Ispitani analiti su prema fizikalno-kemijskim svojstvima polarni spojevi te je ta njihovo razdvajanje odabrana kolona DB-624. Za uspješno odjeljivanje pikova bilo je potrebno optimirati temperaturni program plinskokromatografske kolone. Tijekom razvoja metode posebna pažnja se posvetila optimizaciji temperature i zadržavanju na pojedinim temperaturama plinskokromatografske kolone budući da ispitani analiti i unutarnji standard imaju slična fizikalno-kemijska svojstava. Na **Slikama 3. – 8.** prikazane su vrijednosti izračunate programom molinspiration kojima se opisuje lipofilnost spoja (miLogP) i polarnost spoja (TPSA - ukupna polarna površina (www.molinspiration.com). Izračunate log *P* vrijednosti bile su u rasponu od -0,32 (metanol) do 0,76 (etil-acetat) te je moguće utvrditi kako su ispitani analiti hidrofilni do blago lipofilni.



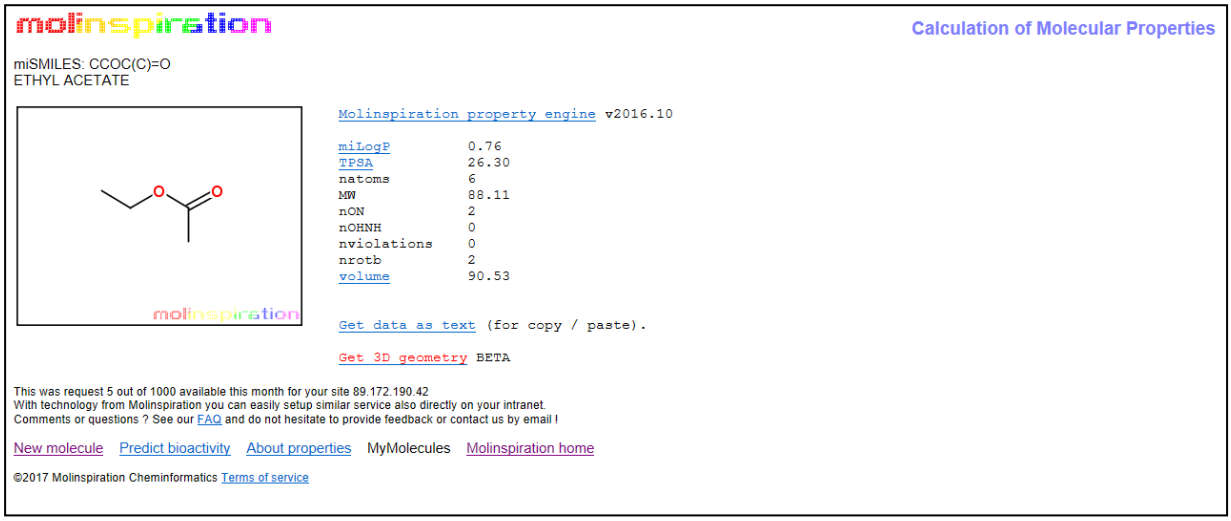
Slika 3. Fizikalno-kemijski parametri metanola izračunati molinspiration programom.



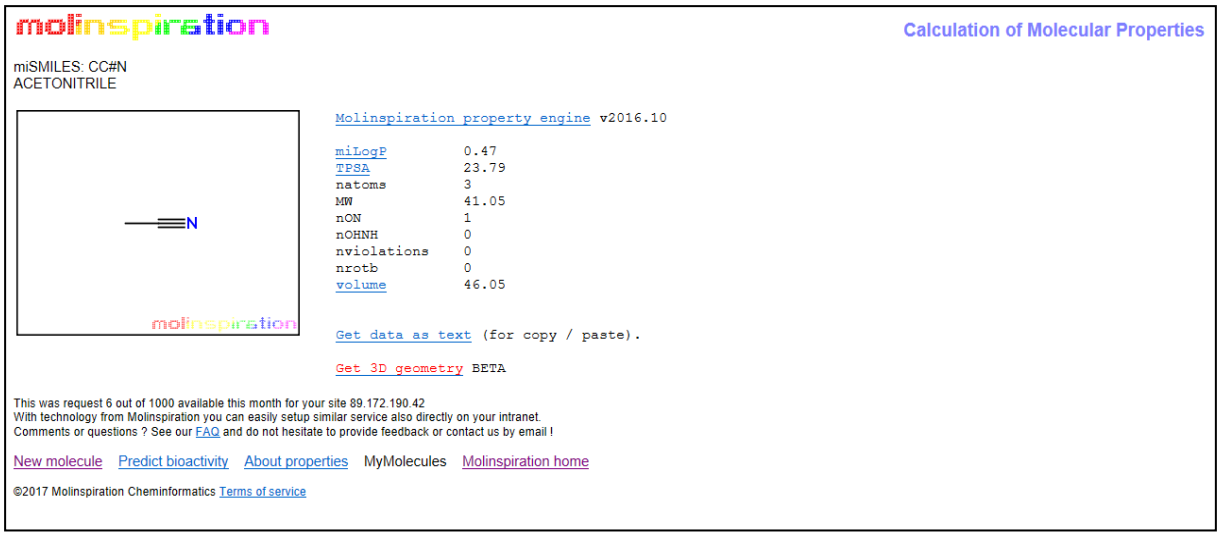
Slika 4. Fizikalno-kemijski parametri etanola izračunati molinspiration programom.



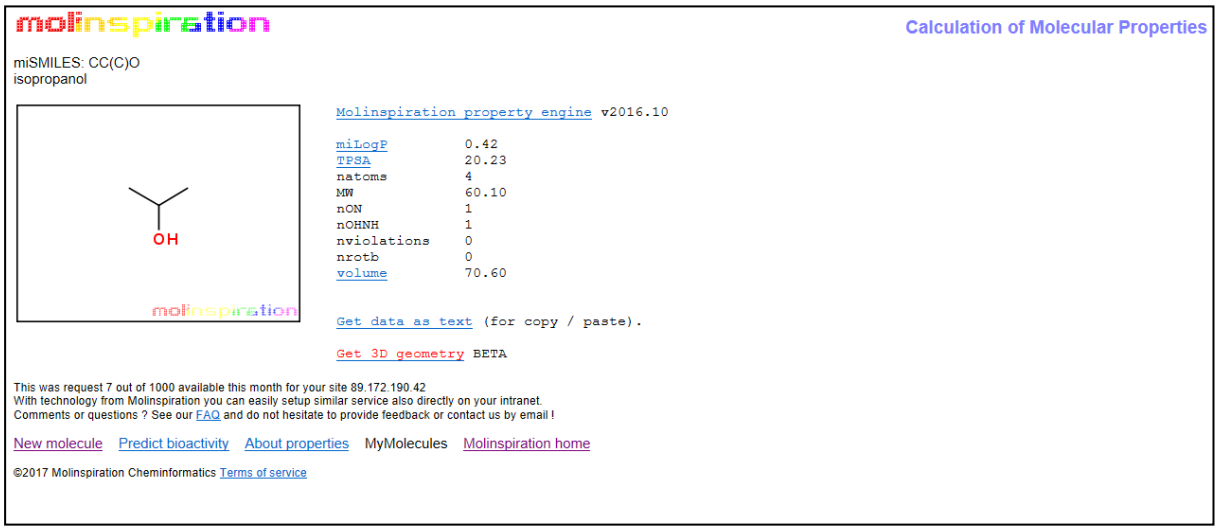
Slika 5. Fizikalno-kemijski parametri acetona izračunati molinspiration programom.



Slika 6. Fizikalno-kemijski parametri etil-acetata izračunati molinspiration programom.



Slika 7. Fizikalno-kemijski parametri acetonitrila izračunati molinspiration programom.



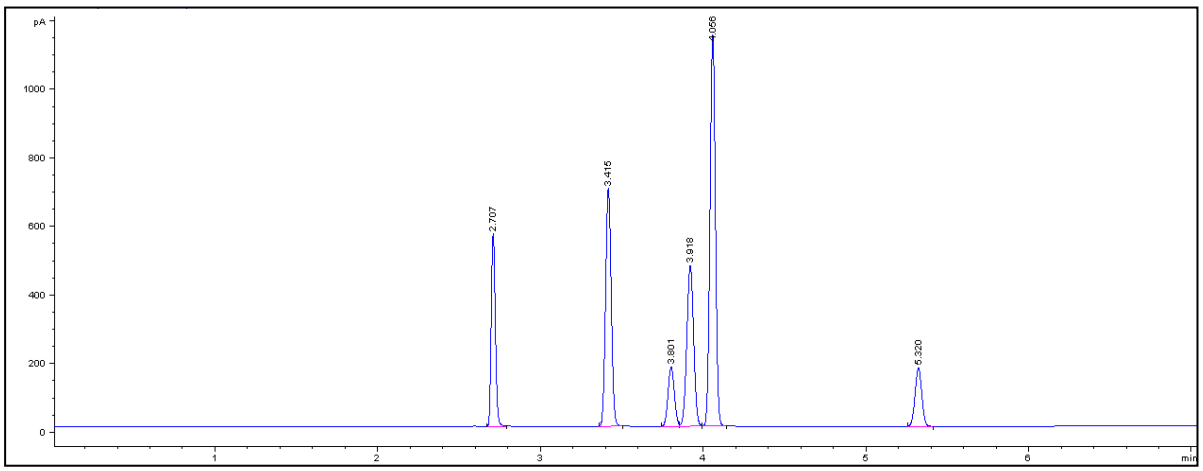
Slika 8. Fizikalno-kemijski parametri 2-propanola izračunati molinspiration programom.

Nadalje, u **Tablici 1**. prikazane su temperature vrelišta i pK_a vrijednosti ispitanih analita i unutarnjeg standarda (www.wikipedia.org). Temperature vrelišta ispitanih analita i unutarnjeg standarda su u rasponu od 56,1 (aceton) do 82,6 ℃ (2-propanol), dok su pKa vrijednosti od 15,5 (metanol) do 25,0 (etil-acetat i acetonitril).

Tablica 1. Temperature vrelišta i pKa vrijednosti.

SPOJ	Temperatura vrelišta (℃)	pK_a
Metanol	64,7	15,5
Etanol	78,2	15,9
Aceton	56,1	19,2
etil-acetat	77,1	25,0
Acetonitril	81,3	25,0
2-propanol	82,6	16,5

Na kromatogramu prikazanom na **Slici 9.** moguće je utvrditi kako je potpuno razdvajanje pikova postignuto unutar svega 6 min (20%-tna standardna otopina).



Slika 9. Kromatogram smjese standarda.

S plinskokromatografske kolone prvi se eluira metanol s vremenom zadržavanja od 2,7 min, potom etanol (3,4 min), aceton (3,8 min) i 2-propanol (3,9 min). Nakon njih slijedi unutarnji standard acetonitril s vremenom zadržavanja od 4,1 min, dok se posljednji eluira etilacetat čije je vrijeme zadržavanja iznosilo 5,3 min. Relativna standardna devijacija za sve analite bila je manja od 2%.

Cilj metode bio je postići dobro razlučivanje uz što kraće vrijeme analize. Razlučivanje se izračunava prema navedenom izrazu:

$$Rs = 1{,}18\ (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{1/2\ (1)} + w_{1/2(2)})$$

Gdje je

t_R – vrijeme zadržavanja analita i

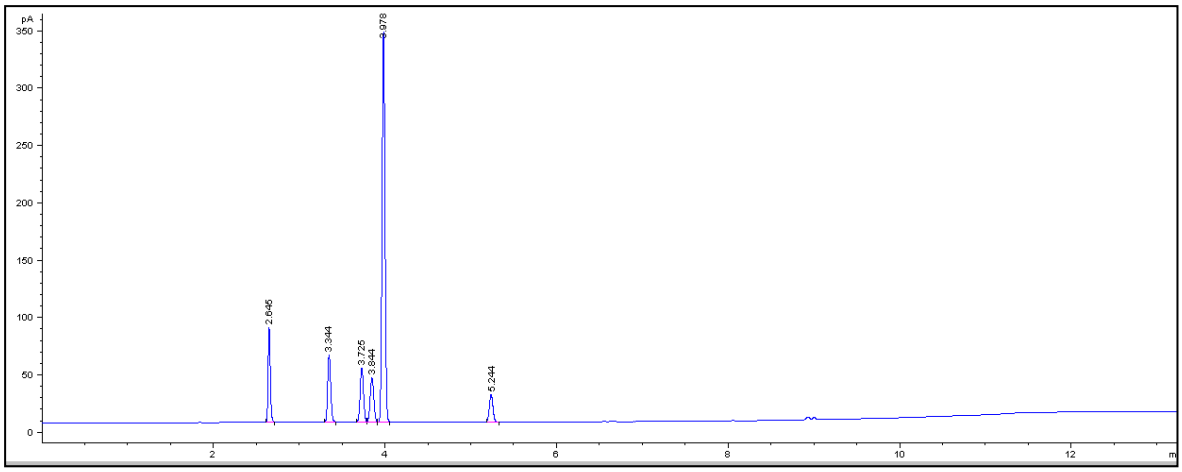
$w_{1/2}$ – širina pika na polovici visine.

Ukoliko razlučivanje između susjednih pikova zadovoljava kriterij $R \geq 1{,}5$ metoda se smatra selektivnom. Budući da je ovaj kriterij zadovoljen za sve analite moguće je utvrditi kako je metoda selektivna (**Tablica 2**).

Tablica 2. Širina između kromatografskih pikova.

SPOJ	**Razlučivanje**
Metanol	-
Etanol	12,8
Aceton	5,6
2-propanol	1,6
Acetonitril	1,9
etil-acetat	17,9

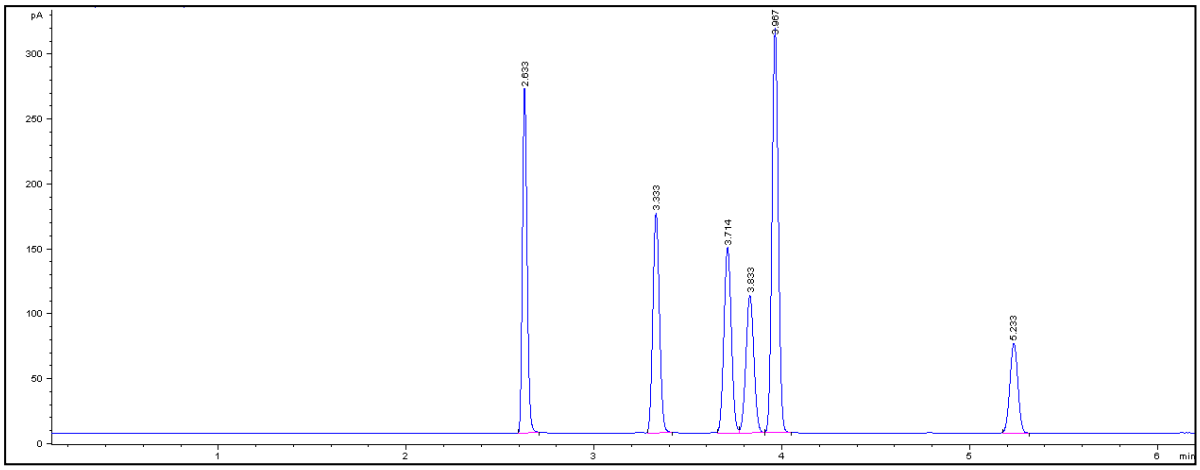
Za potvrdu identiteta analiziranih spojeva korišteno je podudaranje vremena zadržavanja lakohlapljivih sastavnica zabilježenih u kromatogramu uzorka ekstradjevičanskog maslinovog ulja proizvođača OL ISTRIA (Agrolaguna, Poreč, Hrvatska) (**Slika 10**) s njihovim vremenima zadržavanja u kromatogramu standardne otopine smjese analita u ultračistoj vodi. Iz kromatograma moguće je utvrditi kako je postignuta ekstrakcija lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja.



Slika 10. Kromatogram uzorka maslinovog ulja s dodanim unutarnjim standardom acetonitrilom.

Nadalje, potrebno je istaknuti da su preliminarna istraživanja kao i istraživanje provedeno na maslinovim uljima iz Španjolske pokazala kako su analiti prisutni u iznimno malim koncentracijama. Dakle, cilj rada bio je razviti analitičku metodu kojom bi se analiti pouzdano identificirali, ali prvenstveno razviti pouzdani kalibracijski postupak kojim bi se identificirani analiti i odredili. Kako bi se uklonile ili minimalizirale pogreške mjernog sustava provedena je kalibracija razvijene metode primjenom metode standardnog dodatka te unutarnjeg standarda. Dakle, metoda standardnog dodatka se upotrebljava kada je utjecaj matrice na analitički postupak značajan, odnosno kada je koncentracija analita vrlo blizu granice određivanja (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ). Primjenom ovog kalibracijskog postupka kalibracija i mjerenje se provodi unutra iste matrice. Na ovaj način se smanjuje utjecaj interferencija na pouzdanost mjerenja. Metoda unutarnjeg standarda također se primjenjuje kada je znatan utjecaj matrice na signal analita te kada je pouzdanost instrumentalne metode promjenjiva. Ovim kalibacijskim postupkom signal analita se mjeri zajedno sa signalom unutarnjeg standarda te je koncentracija unutarnjeg standarda u svim uzorcima ista i poznata.

Kalibracijske krivulje dobivene su iz četiri točake pri čemu je prva točka odgovarala analizi uzorka maslinovog ulja bez dodatka standardne otopine smjese analita, dok su ostale tri točke dobivene analizom uzoraka maslinovog ulja u koje su dodane standardne otopine smjese analita (**Slika 11**).



Slika 11. Kromatogram uzorka maslinovog ulja s dodanim unutarnjim standardom acetonitrilom i standardnom otopinom analita.

Potom se izračuna ovisnost površine pikova o koncentraciji dodanog standarda u uzorku. Odsječak na osi x na grafičkom prikazu predstavlja koncentraciju spoja u uzorku. Za ispitani uzorak maslinovog ulja u **Tablici 3**. prikazane su kalibracijske krivulje kao i dobivene koncentracije lakohlapljivih tvari. Iz dobivenih rezultata moguće je utvrditi kako su dobivene iznimno niske koncentracije svih analita. Ukoliko se dobivene vrijednosti usporede s vrijednostima dobivenim za maslinova ulja iz Španjolske moguće je utvrditi kako su ispitane polarne lakohlapljive sastavnice u hrvatskom maslinovim uljima prisutne u značajno manjim koncentracijama.

Tablica 3. Kalibracijske krivulje i koncentracija lakohlapljivih sastavnica u ispitanom maslinovom ulju.

SPOJ	**Kalibracijska krivulja**	**Koeficijent korelacije (R_2)**	**Koncentracija (ng/g)**
Metanol	y = 4,554 x + 0,057	0,998	4,2
Etanol	y = 1,732 x + 0,027	0,993	5,1
Aceton	y = 1,282 x + 0,014	0,997	3,6
2-propanol	y = 1,357 x + 0,021	0,989	5,1
etil-acetat	y = 0,758 x + 0,011	0,993	4,7

5. ZAKLJUČAK

- Provedno istraživanje pokazalo je kako je plinska kromatografija u kombinaciji s HSS tehnikom uzorkovanja vrlo učinkovita i pouzdana metoda za analizu lakohapljivih sastavnica maslinovog ulja.
- Prisutnost polarnih lakohlapljivih sastavnica u maslinovom ulju dokazana je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na koloni u uzorku i u standardnim otopinama.
- Kalibracijski postupci: metoda standardnog dodatka i metoda uutarnjeg standarda postignu korišteni su kako bi se dobili pouzdani rezultati mjerenja.
- U ispitanom maslinovom ulju identificirane su sljedeće polarne lakohlapljive sastavnice: metanol, etanol, aceton, 2-propanol i etil-acetat.
- Polarne lakohlapljive tvari u ispitanom uzorku su bile manje od 5,1 ng/g uzorka.
- Rezultati istraživanja upućuju na mogućnost praćenja polarnih lakohlapljivih tvari kao biomarkera kvalitete maslinovog ulja.

6. LITERATURA

1. Amidžić Klarić D, Klarić I, Mornar A, Nigović B. Evaluation of volatile compound and food additive contents in blackberry wine. *Food Control*, 2015, 50, 714-721.

2. Bajoub A, Pacchiarotta T, Hurtado-Fernández E, Olmo-García L, García-Villalba R, Fernández-Gutiérrez A, Mayboroda OA, Carrasco-Pancorbo A. Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: A botanical classification perspective. *J Chromatogr A*, 2016, 1428, 267-79.

3. Beltrán G, Bejaoui MA, Jimenez A, Sanchez-Ortiz A. Ethanol in Olive Fruit. Changes during Ripening. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(22), 5309-5312.

4. Bursová M, Hložek T, Čabala R. Simultaneous Determination of Methanol, Ethanol and Formic Acid in Serum and Urine by Headspace GC-FID. *J Anal Toxicol*, 2015, 39(9), 741-745.

5. Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score, http://www.molinspiration.com, pristupljeno 1.8.2017.

6. De Koning S, Janssen HG, Brinkman UAT. Modern methods od Sample Preparation for GC Analysis, *Chromatography*, 2009, 69(Suppl 1): 33.

7. De Santis D, Frangipane MT. Sensory Perceptions of Virgin Olive Oil: New Panel Evaluation Method and the Chemical Compounds Responsible. *Natural Science*, 2015, 3, 132-142.

8. Gomez-Coca RB, Cruz-Hidalgo R, Fernandes GD, Perez-Camino MC, Moreda W. Analysis of methanol and ethanol in virgin olive oil. *MethodsX*, 2014, 1, 207–211.

9. Gunduz S, Yilmaz H, Goren AC, Halal Food and Metrology: Ethyl Alcohol Contents of Beverages. *J Chem Metro, 2013*, 1, 7-9.

10. Jabeur H, Drira M, Rebai A, Bouaziz M. Putative Markers of Adulteration of Higher-Grade Olive Oil with Less Expensive Pomace Olive Oil Identified by Gas Chromatography Combined with Chemometrics. *J Agric Food Che,* 2017, 65(26), 5375-5383.

11. Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2002

12. Minioti KS, Georgiou CA. Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas Aceites,* 2010, 61, 45-51.

13. Mornar A, Amidžić Klarić D, Nigović B. Kontrola kvalitete kupinovih vina primjenom hss-gc-fid tehnik. *Farm. Glas*, 2011, 67, 741–746.

14. Mornar A, Sertić M, Amidžić Klarić D, Klarić I, Stipanović K, Nigović B. Evaluation of alcohol content and metal impurities in liquid dietary supplements by sHSS-GC-FID and GFAAS techniques. *Food Chem.* 2016, 211, 285-93.

15. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda – praktikum, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2013, ISBN: 978-953-6256-71-76.

16. Mornar A, Sertić M, Nigović B, Lepan B, Zovko Končić M. Razvoj i validacija HSS-GC-FID metode za određivanje sadržaja lakohlapljivih sastavnica sirupa za iskašljavanje za djecu. *Farm. Glas*, 2013, 69, 155–166.

17. Nigović B, Jurišić Grubišić R, Vuković J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - praktikum. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2014.

18. Nigović B. Analitika lijekova, Predavanja iz analitike lijekova. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014.

19. Petkova M. Determination of volatile constituents in olive oil using headspece sampling and gas chromatography, diplomski rad, lipanj 2015.

20. Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, 2009, Zagreb, Narodne novine, broj 7 (NN/7/09).

21. Purcaro G, Cordero C, Liberto E, Bicchi C, Conte LS. Toward a definition of blueprint of virgin olive oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr,* 2014, 1334,101-111.

22. Separation of Highly dense volatiles by using Gas chromatography with Head space sampler, 2012., http://www.pharmainfo.net, pristupljeno 21.7. 2017.

23. Šindrak Z, Benčić Đ, Voća S, Barberić A. Ukupne fenolne tvari u sortnim istarskim maslinovim uljima. Pomologia Croatica, 2007, 13, 17-30.

24. Žanetić M, Gugić M. Čuvanje djevičanskog maslinovog ulja. Pomologia Croatica, 2005, 11, 31–41.

25. Žanetić M, Gugić M. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. Pomologia Croatica, 2006, 12, 159–173.

26. Watson DG. Pharmaceutical Analysis. Edingburgh, Elesevier Limited, 2012, str. 208-235.

7. SAŽETAK

Uzgoj masline i proizvodnja maslinovog ulja je od davnina dio tradicije mediteranskog stanovništva pa tako i Republike Hrvatske. Maslinovo ulje se zahvaljujući prehrambenoj, terapeutskoj i preventivnoj ulozi sredinom dvadesetog stoljeća širi van granica Mediterana.

Važnu ulogu u proizvodnji maslinovog ulja ima redovita kontrola kvalitete. Kvaliteta maslinovog ulja usko je povezana s prisutnošću lakohlapljivih polarnih sastvanica poput metanola i etanola budući da se smatra da ovi alkoholi nastaju tijekom propadanja ploda kao i tijekom skladištenja gotovog proizvoda.

U ovom radu za analizu je korištena prethodno razvijena HSS-GC-FID metoda za određivanje prisutnosti i sadržaja lakohlapljivih polarnih sastavnica u maslinovu ulju. Prisutnost polarnih lakohlapljivih sastavnica u maslinovom ulju dokazana je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na koloni u uzorku i u standardnim otopinama. Podaci o sadržaju etanola, metanola, 2-propanola, acetona i etil-acetata dobiveni su računski uz pomoć jednadžbi kalibracijskih krivulja te su bili manji od 5,1 ng/g uzorka. Da bi se dobili pouzdani rezultati mjerenja korišteni su kalibracijski postupci poput metode standardnog dodatka i metode unutarnjeg standarda.

Rezultati istraživanja upućuju na mogućnost praćenja polarnih lakohlapljivih tvari kao biomarkera kvalitete maslinovog ulja, a korištena metoda HSS-GC-FID se pokazala kao vrlo učinkovita i pouzdana metoda za analizu lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja.

8. SUMMARY

Olive tree cultivation and olive oil production has long been a part of the tradition of the Mediterranean population, including the Republic of Croatia. Olive oil, due to its nutritional, therapeutic and preventive role, expands in the mid-twentieth century outside the borders of the Mediterranean.

Regular quality control is important in olive oil production. The quality of olive oil is closely related to the presence of light volatile polar solvents such as methanol and ethanol as these alcohols are considered to occur during decaying of fruit as well as during storage of the finished product.

In this research, a previously developed HSS-GC-FID method was used to determine the presence and content of volatile polar compounds in olive oil. The presence of polar volatile compounds in olive oil was demonstrated by comparing their retention times on columns in the oil sample and in the standard solutions. The contents of ethanol, methanol, 2-propanol, acetone and ethyl acetate were obtained by using the calibration equations and the results were less than 5.1 ng/g. In order to obtain reliable measurement results, calibration procedures such as the standard addition method and the internal standard method were used.

The results of the research indicate the possibility of monitoring volatile polar compounds as a quality biomarkers of olive oil. Furthermore, the used method HSS-GC-FID has proven to be a highly efficient and reliable method for the analysis of volatile components of olive oil.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

LAKOHLAPLJIVE POLARNE SASTANICE MASLINOVOG ULJA KAO BIOMARKER KVALITETE MASLINOVOG ULJA – PRIMJENA HSS-GC-FID TEHNIKE

Ines Bošnjak

SAŽETAK

Uzgoj masline i proizvodnja maslinovog ulja je od davnina dio tradicije mediteranskog stanovništva pa tako i Republike Hrvatske. Maslinovo ulje se zahvaljujući prehrambenoj, terapeutskoj i preventivnoj ulozi sredinom dvadesetog stoljeća širi van granica Mediterana.
Važnu ulogu u proizvodnji maslinovog ulja ima redovita kontrola kvalitete. Kvaliteta maslinovog ulja usko je povezana s prisutnošću lakohlapljivih polarnih sastvanica poput metanola i etanola budući da se smatra da ovi alkoholi nastaju tijekom propadanja ploda kao i tijekom skladištenja gotovog proizvoda.
U ovom radu za analizu je korištena prethodno razvijena HSS-GC-FID metoda za određivanje prisutnosti i sadržaja lakohlapljivih polarnih sastavnica u maslinovu ulju. Prisutnost polarnih lakohlapljivih sastavnica u maslinovom ulju dokazana je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na koloni u uzorku i u standardnim otopinama. Podaci o sadržaju etanola, metanola, 2-propanola, acetona i etil-acetata dobiveni su računski uz pomoć jednadžbi kalibracijskih krivulja te su bili manji od 5,1 ng/g uzorka. Da bi se dobili pouzdani rezultati mjerenja korišteni su kalibracijski postupci poput metode standardnog dodatka i metode unutarnjeg standarda.
Rezultati istraživanja upućuju na mogućnost praćenja polarnih lakohlapljivih tvari kao biomarkera kvalitete maslinovog ulja, a korištena metoda HSS-GC-FID se pokazala kao vrlo učinkovita i pouzdana metoda za analizu lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 29 stranica, 11 grafičkih prikaza, 3 tablice i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: maslinovo ulje, HSS-GC-FID, polarne lakohlapljive sastavnice, biomarkeri kvalitete

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Željan Maleš, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: kolovoz 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

POLAR VOLATILE COMPOUNDS AS OLIVE OIL QUALITY BIOMARKERS – APPLICATION OF HSS-GC-FID TECHNIQUE

Ines Bošnjak

SUMMARY

Olive tree cultivation and olive oil production has long been a part of the tradition of the Mediterranean population, including the Republic of Croatia. Olive oil, due to its nutritional, therapeutic and preventive role, expands a mid-twentieth century outside the borders of the Mediterranean.
Regular quality control is important in olive oil production. The quality of olive oil is closely related to the presence of light volatile polar solvents such as methanol and ethanol as these alcohols are considered to occur during decaying of fruit as well as during storage of the finished product.
In this research, a previously developed HSS-GC-FID method was used to determine the presence and content of volatile polar compounds in olive oil. The presence of polar volatile compounds in olive oil was demonstrated by comparing their retention times on columns in the oil sample and in the standard solutions. The contents of ethanol, methanol, 2-propanol, acetone and ethyl acetate were obtained by using the calibration equations and the results were less than 5.1 ng/g. In order to obtain reliable measurement results, calibration procedures such as the standard addition method and the internal standard method were used.
The results of the research indicate the possibility of monitoring volatile polar compounds as a quality biomarkers of olive oil. Furthermore, the used method HSS-GC-FID has proven to be a highly efficient and reliable method for the analysis of volatile components of olive oil.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 29 pages, 11 figures, 3 tables and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive oil, HSS-GC-FID, polar volatile compounds, quality biomarkers

Mentor: **Ana Mornar Turk**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Olga Gornik**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željan Maleš, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2017.