# Određivanje željeza u hrvatskim maslinovim uljima primjenom GF-AAS tehnike

**Talanga, Margareta**

**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:163:911274

*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

Margareta Talanga

# Određivanje željeza u hrvatskim maslinovim uljima primjenom GF-AAS tehnike

DIPLOMSKI RAD

predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski 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 vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar Turk i suvoditeljstvom dr. sc. Daniele Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk i komentorici dr. sc. Danieli Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije na trudu, uloženom vremenu i pomoći prilikom pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem se i dr. sc. Iliji Klarić na pomoći u provedbi eksperimentalnog dijela rada. Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Biljani Nigović što je omogućila provođenje istraživanja obuhvaćenih ovim diplomskim radom na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova.

Posebni zahvalu upućujem Zakladi Adris koja je svojom donacijom omogućila provođenje ovog istraživanja.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri, mojoj ostaloj obitelji i prijateljima na potpori, ljubavi i strpljenju tijekom studiranja.

# SADRŽAJ

**1 UVOD ..... 1**

1.1 MASLINOVO ULJE ..... 2
*1.1.1 Kakvoća maslinovog ulja ..... 2*
*1.1.2 Koeficijent ekstinkcije, K ..... 3*
*1.1.3 Kategorizacija maslinovog ulja ..... 4*
*1.1.4 Metali u maslinovom ulju ..... 5*
1.2 ATOMSKA APSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA ..... 6
*1.2.1 Atom i atomska spektroskopija ..... 6*
*1.2.2 Kvantitativna atomska apsorpcijska spektroskopija ..... 6*
*1.2.3 Vrste atomske apsorpcijske spektroskopije za određivanje metala ..... 6*
*1.2.4 Matriks modifikacija ..... 8*

**2 OBRAZLOŽENJE TEME ..... 10**

**3 MATERIJALI I METODE ..... 12**

3.1 MATERIJALI ..... 13
*3.1.1 Uzorci maslinovog ulja ..... 13*
*3.1.2 Radni instrumenti ..... 13*
*3.1.3 Standardne supstancije ..... 13*
*3.1.4 Kemikalije ..... 13*
*3.1.5 Pribor i posuđe ..... 13*
*3.1.6 Programski paketi ..... 14*
3.2 METODE ..... 14
*3.2.1 Spaljivanje uzorka mikrovalnom digestijom ..... 14*
*3.2.2 Određivanje koncentracije željeza u maslinovom ulju grafitnom tehnikom ..... 14*
*3.2.3 Priprema standardnih otopina ..... 15*
*3.2.4 Određivanje koeficijenta ekstinkcije primjenom UV-VIS spektrofotometrije ..... 16*

**4 REZULTATI I RASPRAVA ..... 18**

**5 ZAKLJUČAK ..... 23**

**6 LITERATURA ..... 25**

**7 SAŽETAK/SUMMARY ..... 29**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD ..... 32**

# 1 UVOD

## 1.1 Maslinovo ulje

Maslinovo ulje je jestivo ulje koje se dobiva iz ploda masline *Olea europea* var. *sativa* (*Oleaceae*). Najveći proizvođači maslinovog ulja u Europi su Španjolska, Italija i Grčka (Gould, 1992). Ova bitna sastavnica mediteranske prehrane bogata je vitaminom E, polifenolima te zasićenim i nezasićenim masnim kiselinama, među kojima treba istaknuti oleinsku kiselinu. Blagodati maslinovog ulja poznate su nekoliko stoljeća, a danas je ono predmet brojnih znanstvenih istraživanja vezanih uz razna oboljenja. Danas je poznato kako je konzumacija maslinovog ulja usko povezana sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, kao i smanjenom učestalošću obolijevanja od određenih vrsta zloćudnih bolesti kao što su karcinom dojke i kolona. Nedavna istraživanja su pokazala da polifenoli, prisutni u maslinovom ulju, inhibiraju oksidaciju LDL-a i sprječavaju nastajanje aterosklerotskih plakova. Dijetoterapijski učinak maslinovog ulja je u ovisnosti s njegovom kvalitetom te je iznimno važno utvrditi kvalitetu pojedinog uzorka (Zeiner i sur, 2005). Kvalitetu maslinovog ulja moguće je definirati s komercijalnog, nutritivnog i senzoričkog stajališta (Duran, 1990).

### 1.1.1 Kakvoća maslinovog ulja

Prema *Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina* (NN 7/09; 112/09), koji je izrađen prema međunarodnim smjernicama, definirani su osnovni pokazatelji kvalitete maslinovog ulja:

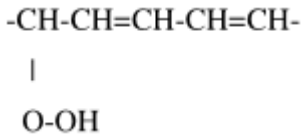
- udio ukupnih slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina,
- peroksidni broj,
- koeficijent ekstincije K232 i K270 i
- organoleptička svojstva (miris, okus, boja).

Količina slobodnih masnih kiselina, izražena na oleinsku kiselinu je bitan čimbenik klasifikacije maslinovog ulja te je manja od 0,8% kod ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Nadalje, relevantan pokazatelj kvalitete maslinovog ulja je i peroksidni broj (Boskou, 1996; Rossel, 1986; Salvador i sur., 2001, 2003).

Konačno, na kvalitetu maslinovog ulja utječe način njegova skladištenja te mu se smanjuje i ukoliko se miješa s drugim uljima.

### 1.1.2 Koeficijent ekstinkcije, *K*

Tehnika UV/VIS spektrometrije daje podatke o kvaliteti maslinovog ulja, o stupnju oksidacije odnosno očuvanosti te promjenama uzrokovanim tehnološkim postupkom.
Tijekom stajanja u ulju dolazi do vezanja kisika na mjestu dvostruke veze kod linolne i linoleinske kiseline uz nastajanje hiperoksida. Dakle, dolazi do pucanja dvostruke veze i stvaranja dien konjugata, koji pokazuje apsorbanciju na 232 nm, te trien konjugata koji apsorbira na 268 nm i 232 nm (**Slika 1**).




**Slika 1.** Strukturni prikaz dien konjugata.

Vrijednosti dobivenih apsorbancija izražavaju se kao specijalne ekstincije, *K*. Valne duljine prema službenoj metodi Europske unije za vrednovanje maslinovog su na 232 nm (*K*232) i na 270 nm (*K*270) (**Tablica 1**).

**Tablica 1.** K232 i K270 vrijednosti maslinovih ulja različite kvalitete.

| **Vrsta maslinovog ulja** | ***K*232** | ***K*270** |
|---|---|---|
| Ekstra djevičansko maslinovo ulje | 3,0 | 0,18 / 0,20 |
| Djevičansko maslinovo ulje | 3,0 | 0,18 / 0,25 |
| Rafinirano maslinovo ulje | 3,0 / 3,5 | 1,0 /1,1 |

### 1.1.3 Kategorizacija maslinovog ulja

Ulja se razvrstavaju u kategorije pod sljedećim nazivima:

1) *Djevičanska maslinova ulja*
   a) *Ekstra djevičansko maslinovo* ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, sadrži najviše 0,8 g slobodne oleinske kiseline na 100 g
   b) *Djevičansko maslinovo ulje* dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, sadrži najviše 2 g slobodne oleinske kiseline na 100 g
   c) *Maslinovo ulje lampante* je djevičansko maslinovo ulje neprihvatljivih senzorskih svojstava, sadrži 2 g slobodne oleinske kiseline na 100 g ulja
2) *Rafinirano maslinovo ulje* dobiveno rafinacijom djevičanskog maslinovog ulja, koje ne sadrži više od 0,3 g slobodne oleinske kiseline na 100 g

3) *Maslinovo ulje* sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih ulja, koje ne sadrže više od 1 g slobodne oleinske kiseline na 100 g

4) *Sirovo ulje komine maslina* je dobiveno preradom komine maslina mehaničkim postupcima i/ili ekstrakcijom komine maslina organskim otapalima, bez rafinacije i reesterifikacije s uljima druge vrste

5) *Rafinirano ulje komine* je ulje dobiveno rafinacijom sirovog ulja komina masline, koje ne sadrže više od 0,3 g slobodne oleinske kiseline

6) *Ulje komine maslina* je ulje dobiveno miješanjem rafiniranog ulja komina maslina i djevičanskih maslinovih ulja, koja ne sadrže više od 1 g slobode oleinske kiseline na 100 g

Podjela maslinovih ulja iznesena je na temelju podataka dobivenih iz Pravilnika o uljima od ploda i komine maslina (NN br. 7/09, članak 2).

### 1.1.4 Metali u maslinovom ulju

Analiza teških metala i nekih drugih metala u tragovima je bitna za ispitivanje kvalitete maslinovih ulja. Naime, brojni metali iznimno su važni zbog svoje metaboličke uloge u ljudskom organizmu. Nadalje, vrsta i količina metala u tragovima, koju je moguće naći u maslinovom ulju, može poslužiti i za geografsko određivanje njihova podrijetla.

Poznata je nutritivna vrijednost nekih metala (Zn, Fe i Cu), dok s druge strane treba brinuti da se određeni metali (Ni, Pb, Cd, As i Hg) ne nalaze u toksičnim dozama (Mendil i sur., 2008). Moguća je kontaminacija metalima poput bakra i željeza tijekom postupaka proizvodnje ulja. Metali se u ulju također mogu naći tako što se iz tla ugrađuju u plod masline kao posljedica zagađenog okoliša i blizine prometnica (Zeiner i sur., 2005, Cindrić i sur., 2006).

Na kraju potrebno je istaknuti kako neki metali kao što su Cu, Fe i Mn mogu umanjiti kvalitetu maslinovog ulja budući da ubrzavaju oksidacijske procese u ulju, dok su metali kao što su Cd, Cr, Hg, Ag i Pb štetni po zdravlje čovjeka. Stoga je Međunarodno vijeće za maslinovo ulje (eng. *Internacional Olive Oil Councill*, IOOC) definiralo najviše dozvoljene koncentracije (NDK) za As (0,1 mg/kg), Pb (0,1 mg/kg), Cu (0,1 mg/kg) i Fe (3 mg/kg) u maslinovom ulju (**Tablica 2**).

**Tablica 2.** Dozvoljene koncentracije za bakar i željezo (prilagođeno i preuzeto IOC, 2015).

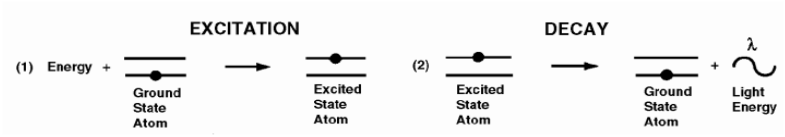
| Metali u tragovima | Ekstra djevičansko maslinovo ulje | Djevičansko maslinovo ulje | Obično djevičansko maslinovo ulje | Maslinovo ulje lampante | Rafinirano djevičansko maslinovo ulje | Maslinovo ulje | Sirovo ulje komine maslina | Rafinirano ulje komine maslina | Ulje komine maslina |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | mg/kg | mg/kg | mg/kg | mg/kg | mg/kg | mg/kg | mg/kg | mg/kg | mg/kg |
| Željezo (Fe) | ≤ 3,0 | ≤ 3,0 | ≤ 3,0 | ≤ 3,0 | ≤ 3,0 | ≤ 3,0 | ≤ 3,0 | ≤ 3,0 | ≤ 3,0 |
| Bakar (Cu) | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 | ≤ 0,1 |

Budući da su dozvoljene količine navedenih metala u maslinovom ulju iznimno niske za određivanje njihove koncentracije potrebno je koristiti vrlo osjetljive analitičke tehnike kao što je najčešće korištena AAS grafitna tehnika. Dodatni analitički izazov predstavlja i priprema uzoraka ulja za analizu. Od predanalitičkih tehnika moguće je korištenje tehnika poput suhog spaljivanja, digestije pod visokim tlakom, zagrijavanja u mikrovalnoj ili spaljivanja uz pomoć plazma-kisika (De Leonardis i sur., 2000).

## 1.2 Atomska apsorpcijska spektrometrija

### 1.2.1 Atom i atomska spektroskopija

Atom se sastoji od jezgre, koja je okružena elektorima. Atom svakog elementa ima jedinstvenu orbitalnu strukturu s točno određenim brojem elektrona. Takva konfiguracija koja ima najnižu energiju zove se "osnovno stanje". Dovođenjem energije točno određene valne duljine, dolazi do apsorpcije i elektron prelazi u manje stabilno stanje tzv. "pobuđeno stanje". S obzirom da je ovo stanje nestabilno, elektron se spontano vraća u konformaciju osnovnog stanja emitiranjem energije koja je ekvivalenta jednakoj količini apsorbirane energije. Gore opisani proces prikazan je na **Slici 2**. (Beaty i Kerber, 1993).




**Slika 2.** Proces ekscitacije i povratak u početno stanje (preuzeto od Beaty i Kerber, 1993).

### 1.2.2 Kvantitativna atomska apsorpcijska spektroskopija

Kod atomske apsorpcijske spektroskopije se mjeri i analizira valna duljina kod ekscitacije, koja je karakteristična za svaki element. Količina intenziteta apsorbiranog zračenja proporcionalna je koncentraciji.

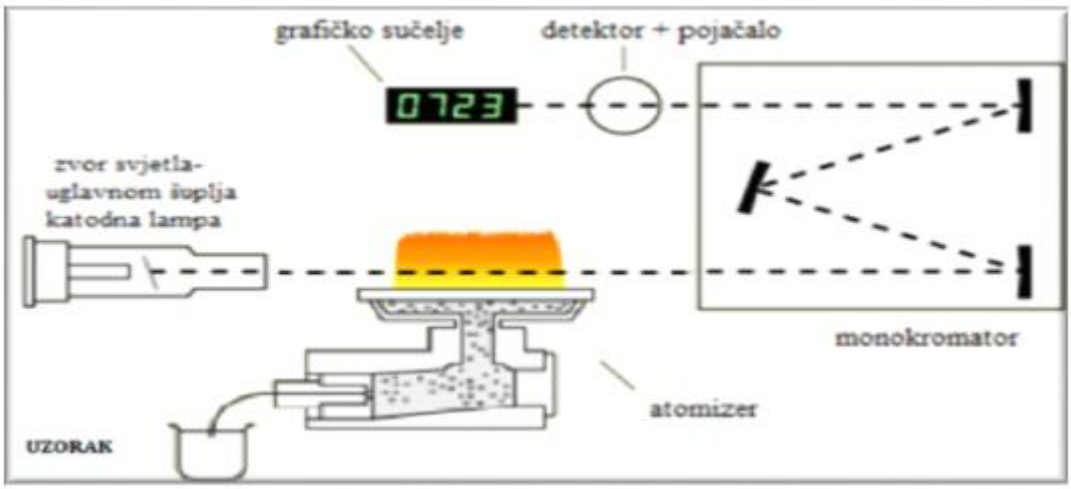
### 1.2.3 Vrste atomske apsorpcijske spektroskopije za određivanje metala

Na temelju načina atomizacije razlikujemo nekoliko tehnika za određivanje metala:

i) plamena (eng.*Flame Atomic Spectroscopy*, FAAS),
ii) grafitna (eng.*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*, GF AAS),
iii) hidridna (eng. *Hydride Generation Atomic Absorbiton Spectroscopy*, HG AAS),
iv) induktivno spregnuta plazma-atomska emisijska spektrometrija (eng. *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectometry*, ICP-MS) i
*v)* induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija (eng. *Inductively Couples Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS).

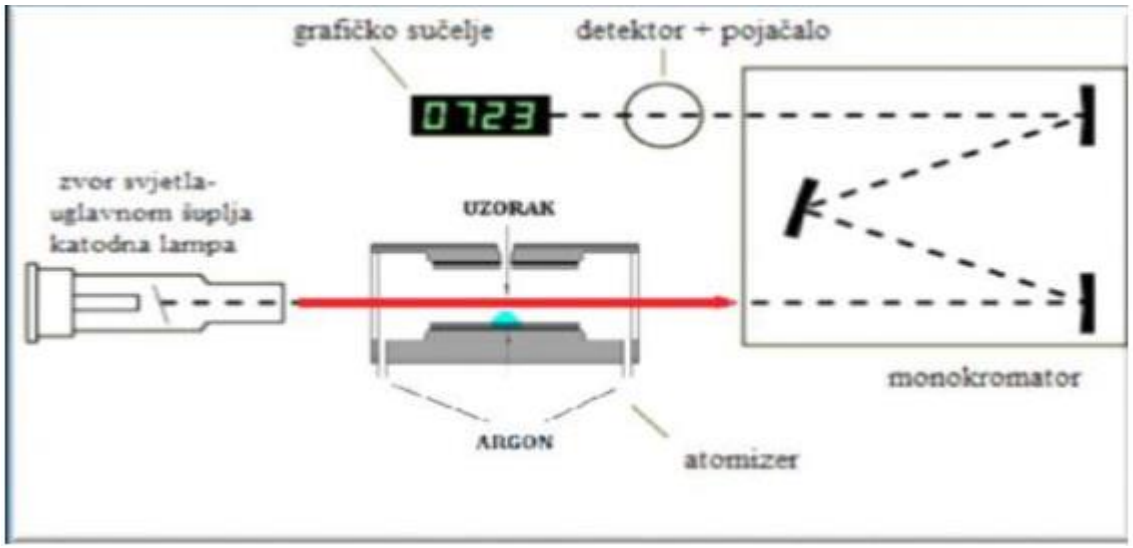
Plamena tehnika je kao tehnika analize metala jednostavna, jeftina, brza (za analizu potrebno je svega nekoliko sekundi). Granica dokazivanja ovom tehnikom je ppb-mg/L razini.

Kao nedostatak tehnike ističe se mogućnost određivanja jednog po jednog metala. Uzorak iz posude unosi se u instrument primjenom podtlaka te se potom uzorak, koji je tekućem stanju, prenosi na plamen gdje se atomizira. Tako nastali atomi apsorbiraju svjetlost iz izvora (**Slika 3**) (Welz i Sperlin, 1997).




**Slika 3**. Shematski prikaz FAAS tehnike (izvor: Amidžić Klarić, 2016)

Grafitna tehnika je skuplja i sporija tehnika od plamene (za analizu je potrebno nekoliko minuta). I kod ove tehnike određuje se element po element, no granice dokazivanja su nešto niže nego u plamenoj tehnici. Stoga se tehnika prvenstveno primjenjuje u analizi elemenata u tragovima. Glavni dio instrumenta je grafitna peć koja se sastoji od 3 osnovna dijela amortizera, sustava za napajanje i programa (**Slika 4**). Za provedbe analize grafitnom tehnikom dovoljne su male količine uzorka (μL). Svakako je potrebno istaknuti kako je za ovu tehniku potrebno veće iskustvo analitičara (Welz i Sperlin, 1997).




**Slika 4**. Shematski prikaz GF AAS tehnike (izvor: Amidžić Klarić, 2016)

Velika prednost same tehnike što se mogu analizirati uzorci različitog sastava matrice, kao što su biološki i geološki uzorci. Ipak, uzorke koji sadrže velike količine organskog materijala potrebno je prikladno pripremiti prije analize. Iako je problem nastajanje oksida u grafitnoj tehnici smanjen, jer se atomizacija događa u inertnoj atmosferi, moguće su kemijske interakcije. Prilikom analize grafitnom tehnikom preporučljivo je korištenje matriks modifikatora, a odabir modifikator ovisi o analizi, uvjetima i instrumentu. Grafitna kiveta omogućuje potpunu atomizaciju cijelog uzorka i dulje zadržavanje atoma u optičkom putu nego što je slučaj kod plamene atomizacije.

Visoka temperatura potrebna za atomizaciju postiže se dovođenjem električne energije na krajeve grafitne cijevi, pri čemu se grafitna kiveta užari do temperature od 3000 °C (Perkin Elmer, 2000).

### 1.2.4 Matriks modifikacija

Primjena tehnike matriks modifikacije iznimno je važna u smanjivanju interferencija kod određivanja metala u tragovima. Primjenom ove tehnike, kemijski oblik, a time i fizička svojstva elementa se mijenjaju dodavanjem odgovarajućeg reagensa u uzorak ili standard. Prednosti matriks modifikacije su te što smanjuje hlapljivost analiziranog elementa i sprječava njegov gubitak tijekom toplinskog predtretmana, dok s druge strane povećava isparivosti sastavnica matriksa i pomaže kod njihovog uklanjanja prije same atomizacije.

Većina proizvođača proizvodi autosamplere grafitne pećnice koji imaju mogućnost primjene jednog ili više matriks modifikatora sekvencionalno ili istovremeno (Perkin Elmer,

2000). U **Tablici 3** dane su detaljne informacije o tome kako primijeniti i pripremiti najčešće korištene otopine matriks modifikatora kod rutinskih provjera.

**Tablica 3**. Matriks modifikatori za rutinske analize kod GFAAS tehnike.

| **Modifikator** | **Glavna primjena** | **Potrebna apsolutna masa** | **Potrebna količina reagensa** | **Radna otopina (dodataka 5 µL modifikatora)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **Priprema** | **Koncentracija** |
| **Pd+$Mg(NO_3)_2$** | Ag, As, Au, Bi, Cd, Cu, Ga, Ge, Hg, In, Mn, Sb, Se, Sn,Te, Tl | 5 µg Pd + 3 µg $Mg(NO_3)_2$ | 1% (10 g/L) Pd + 1% (10 g/L) Mg | Razrijediti 1 mL standardne otopine Pd i 0,1 mL standardne otopine Mg u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuniti deioniziranom vodom (18 mΩ) do oznake. | 0,1% (1 g/L) Pd + 0,06% (0,6 g/L) $Mg(NO_3)_2$ |
| **Pd+$Mg(NO_3)_2$** | P | 20 µg Pd + 5 µg $Mg(NO_3)_2$ | 1% (10 g/L) Pd + 1% (10 g/L) Mg | Razrijediti 4 mL standardne otopine Pd i 0,17 mL standardne otopine Mg u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuniti deioniziranom vodom (18 mΩ) do oznake. | 0,4% (4 g/L) Pd + 0,1% (1 g/L) $Mg(NO_3)_2$ |
| **$Mg(NO_3)_2$** | Al, Be, Co, Cr, Fe, Si | 15 µg $Mg(NO_3)_2$ | 1% (10 g/L) Mg | Razrijediti 0,5 mL standardne otopine Mg u odmjernu tikvicu od 10 ml i nadopuniti deioniziranom vodom (18 mΩ) do oznake. | 0,3% (3 g/L) $Mg(NO_3)_2$ |
| **$Mg(NO_3)_2$** | Zn | 5 µg $Mg(NO_3)_2$ | 1% (10 g/L) Mg | Razrijediti 0,17 mL standardne otopine Mg u odmjernu tikvicu od 10 ml i nadopuniti deioniziranom vodom (18 mΩ) do oznake. | 0,1% (1 g/L) $Mg(NO_3)_2$ |

# 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Teški metali i metali u tragovima imaju negativan učinak na samu kvalitetu maslinovog ulja. Željezo potiče oksidaciju masnih kiselina, među kojima treba istaknuti oleinsku kiselinu.

Sastav metala u maslinovom ulju ovisi o različitim čimbenicima: sorti masline, vrsti tla, blizine prometnica te o samoj tehnologiji dobivanja ulja i njegova skladištenja.

U analitičkom pogledu, određivanje metala u maslinovom ulju predstavlja izazov zbog složenog organskog matriksa s jedne strane te male količine prisutnih analita s druge strane.

Iz gore navedenih razloga, cilj ovog diplomskog rada bio je:

- ✓ odrediti koncentraciju željeza u 35 uzoraka maslinovih ulja pribavljenih s različitih područja Republike Hrvatske
- ✓ usporediti dobivene koncentracije željeza s najvećom dozvoljenom koncentracijom željeza u maslinovom ulju (3,0 mg/kg), koje su propisane pravilnicima Međunarodnog vijeća za maslinovo ulje (eng. *International Olive Oil Council*, IOOC) te
- ✓ kategorizirati analizirana maslinova ulja na temelju ekstinkcijskog koeficijenta određenog prema službenoj metodi komisije za vrednovanje maslinovih ulja.

# 3 MATERIJALI I METODE

## 3.1 Materijali

### 3.1.1 Uzorci maslinovog ulja

- 35 uzoraka maslinovog ulja sakupljenih iz različitih dijelova Republike Hrvatske

### 3.1.2 Radni instrumenti

- Atomski apsorpcijski spektrometar AAnalyst 800 THGA (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Pećnica za mikrovalno spaljivanje uzoraka ETHOS UP (Milestone, Sorisole, Italija)
- UV-VIS spektrofotometar Lambda 25 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)

### 3.1.3 Standardne supstancije

- GF-AAS smjesa standarda: Al, As, Pb, Sb, Se, Tl (100 mg/L); Ba, Co, Cu, Ni (50 mg/L); Cr, Fe, Mn (20 mg/L); Ag (10 mg/L); Be, Cd (5 mg/L) (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)

### 3.1.4 Kemikalije

- Izooktan (2,2,4-trimetilpentan) HPLC čistoće, min. 99,5% (LGC Standards GmbH, Njemačka)
- Modifikator matriksa: $Mg(NO_3)_2$ (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Nitratna kiselina TraceSELECT® Ultra, za analizu elemenata u tragovima, 65-71%, (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska)
- Vodikov peroksid TraceSELECT® Ultra, za analizu elemenata u tragovima, ≥30%, (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska)
- Voda: za pripremu svih otopina korištena je ultračista voda otpornosti 18.2 MΩ cm (25 ºC) dobivena korištenjem Milipore sustava za pročišćavanje (Bedford, MA, SAD)

### 3.1.5 Pribor i posuđe

- Grafitne kivete - THGA (End Cap) (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Lampa sa šupljom katodom HCL (engl. *Hollow Cathode Lamp*) – pojedinačna lampa za željezo (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- PTFE posude za mikrovalno spaljivanje (Milestone, Sorisole, Italija)
- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Plastične odmjerene tikvice (Vitlab, Großostheim, Njemačka)
- Plastična posuda za grafitnu tehniku
- Kapaljke (ISOLAB, Wertheim, Njemačka)

### 3.1.6 Programski paketi

- AA WinLab Version 32 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- EasyControl software (Milestone, Sorisole, Italija)
- UV WinLab 6.0.2.0723 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- Statistica ver. 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD)

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Spaljivanje uzorka mikrovalnom digestijom

Maslinovo ulje sadrži visoki udio lipidnih sastavnica te predstavljaju složen organski sustav za određivanje metala. U cilju dobivanja homogene otopine prikladne za određivanje metala grafitnom tehnikom svi analizirani uzorci prethodno su spaljeni mikrovalnom digestijom.

Ukratko, 0,2 – 0,3 g uzorka odvagano je u PTFE posudu za mikrovalno spaljivanje te dodano 9 mL nitratne kiseline (65-71%) TraceSELECT® Ultra i 1 mL vodikov peroksid (≥30%) TraceSELECT® Ultra za analizu elemenata u tragovima. Zatim su PTFE posude zatvorene te proveden program mikrovalne digestije (**Tablica 4**). Nakon spaljivanja i hlađenja, uzorak je kvantitativno prenesen u plastičnu odmjernu tikvicu, nakon čega je slijedio postupak određivanja metala grafitnom tehnikom.

**Tablica 4**. Program mikrovalne digestije

| Korak | Vrijeme | Temperatura (°C) | Snaga (W) |
|---|---|---|---|
| **1** | 00:20:00 | 200 | 1800 |
| **2** | 00:10:00 | 200 | 1800 |

### 3.2.2 Određivanje koncentracije željeza u maslinovom ulju grafitnom tehnikom

Koncentracija željeza u maslinovom ulju određena je metodom grafitne tehnike, GF-AAS. Kao inertni plin nositelj u analizi grafitne tehnike korišten je argon, dok je pojedinačna lampa za željezo bila izvor zračenja. Za potrebe provedbe analize korišteno je PVC laboratorijsko posuđe. Prikladni laboratorijski pribor i posuđe držani su 24 sata prije upotrebe u 5% $HNO_3$, zatim isprani ultračistom vodom te korišteni u provedbi analize.

### 3.2.3 Priprema standardnih otopina

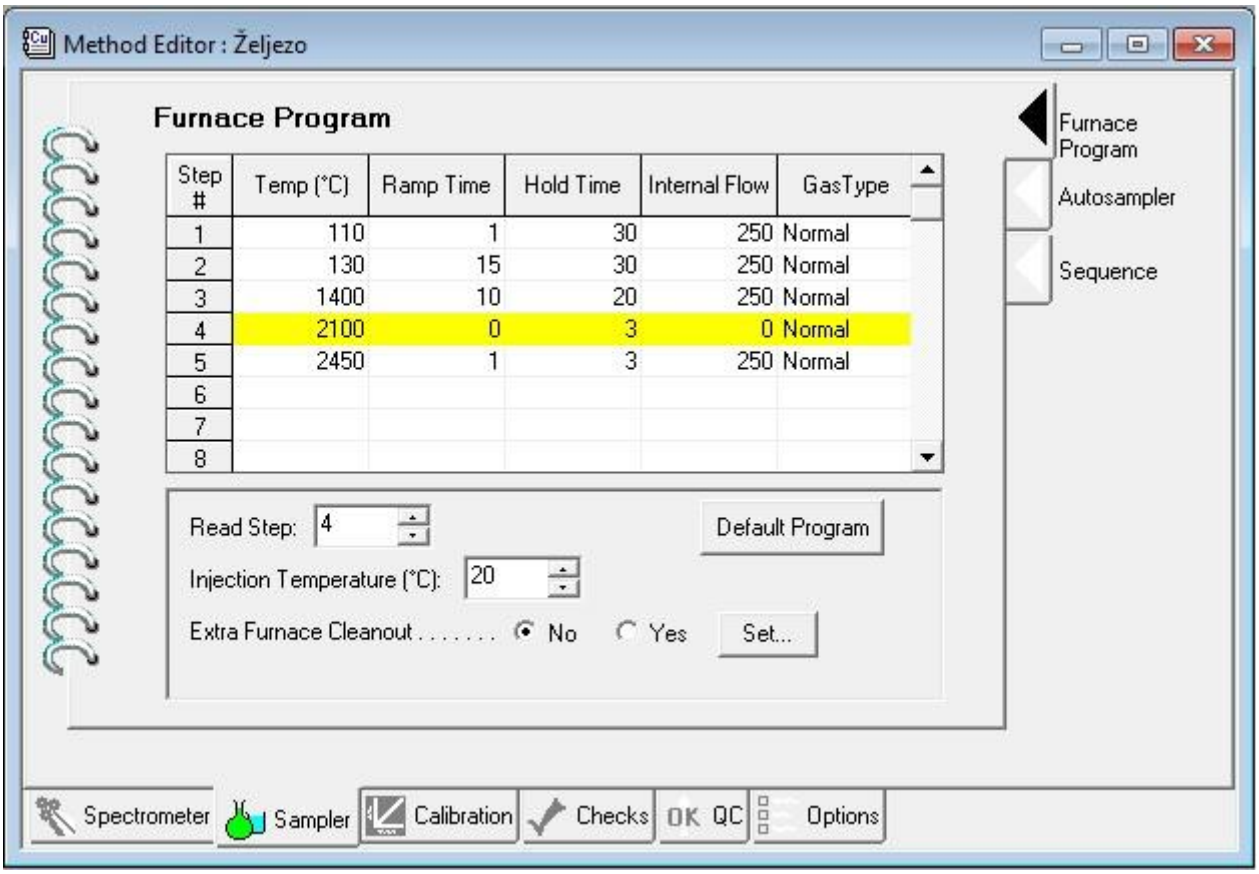
Radna otopina analiziranog metala za izradu baždarnog pravca pripremljena je razrjeđivanjem standardne otopine željeza ultračistom vodom u prikladnom omjeru, a koncentracija korištenih radnih otopina metala prikazana je u **Tablici 5**.

Nadalje, radna otopina modifikatora matriksa korištena u analizi metala grafitnom tehnikom pripremljena je razrjeđivanjem s ultračistom vodom u odgovarajućem omjeru. Analitički parametri za određivanje željeza u maslinovom ulju GF-AAS tehnikom prikazan je u **Tablici 5**.

**Tablica 5**. Analitički parametri za određivanje željeza u maslinovom ulju GF-AAS tehnikom

| **Element** | **Fe** |
|---|---|
| Valna duljina (nm) | 248,3 |
| Otvor pukotine monokromatora (nm) | 0.2 |
| Lampa | HCL |
| Struja lampe (mA) | 30 |
| Tip signala | AA-BG |
| Način mjerenja | površina pika |
| Vrijeme mjerenja (s) | 3 s |
| Standard (μg/L) | 5, 10, 15, 20 |
| Injektirani volumen uzorka (μL) | 20 |
| Modifikator matriksa | 0.015 mg $Mg(NO_3)_2$ |
| Volumen modifikatora matriksa (μL) | 5 |

Legenda: AA - atomska apsorpcija; BG - pozadinska korekcija




**Slika 5.** Temperaturni program rada grafitne pećnice za određivanje željeza GF-AAS tehnikom (1. isparavanje otapala; 2. sušenje uzorka; 3. piroliza uzorka, "burn off"; 4. atomizacija; 5. čišćenje kivete)

### 3.2.4 Određivanje koeficijenta ekstinkcije primjenom UV-VIS spektrofotometrije

Kvaliteta maslinovog ulja određuje se mjerenjem karakteristika spektara pri valnim duljinama od 200 do 300 nm. Navedeni spektri povezani su s konjugiranim dienskim i trienskim sustavima. Niska apsorbancija u ovom području mjerenja ukazuje na visokokvalitetno ekstra djevičansko maslinovo ulje, dok rafinirana/krivotvorena ulja pokazuju veću razinu apsorbancije u ovoj području.

K vrijednost određena je prema službenoj metodi europske komisije za vrednovanje maslinovih ulja na dvije valne duljine 232 i 270 nm, korištenjem UV-VIS spektrofotometra Lambda 25 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD).

Uzorci maslinovog ulja razrijeđeni su izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentanu). Nakon pripreme uzorci su izmjereni u odgovarajućim kvarcnim kivetama (optička duljina puta: 10 mm), dok je slijepa proba bio izo-oktan.

Nakon toga, proveden je postupak mjerenja apsorbancije otopine pri valnim duljinama od 232, 266, 270 i 274 nm. K vrijednosti izračunate su prema navedenoj jednadžbi

$$\Delta K = K_{270} - \frac{K_{266} + K_{274}}{2}$$

Čistoću maslinovog ulja moguće je odrediti na temelju tri parametra:

- K232 apsorbancija mjerena pri valnoj duljini od 232 nm
- K270 apsorbancija mjerena pri valnoj duljini od 270 nm
- Δ K

**Tablica 6.** Maksimalno dopuštene vrijednosti prema Uredbi Komisije (EEZ) br. 2568/91 (EEC Commission number 2568/91)

| **Vrsta maslinovog ulja** | **K232** | **K270** | **ΔK** |
|---|---|---|---|
| Ekstra djevičansko maslinovo ulje | ≤ 2,4 | ≤ 0,20 | ≤ 0,01 |
| Djevičansko maslinovo ulje | ≤ 2,5 | ≤ 0,25 | ≤ 0,01 |
| Maslinovo ulje | ≤3.3 | ≤ 1,0 | ≤ 0,13 |

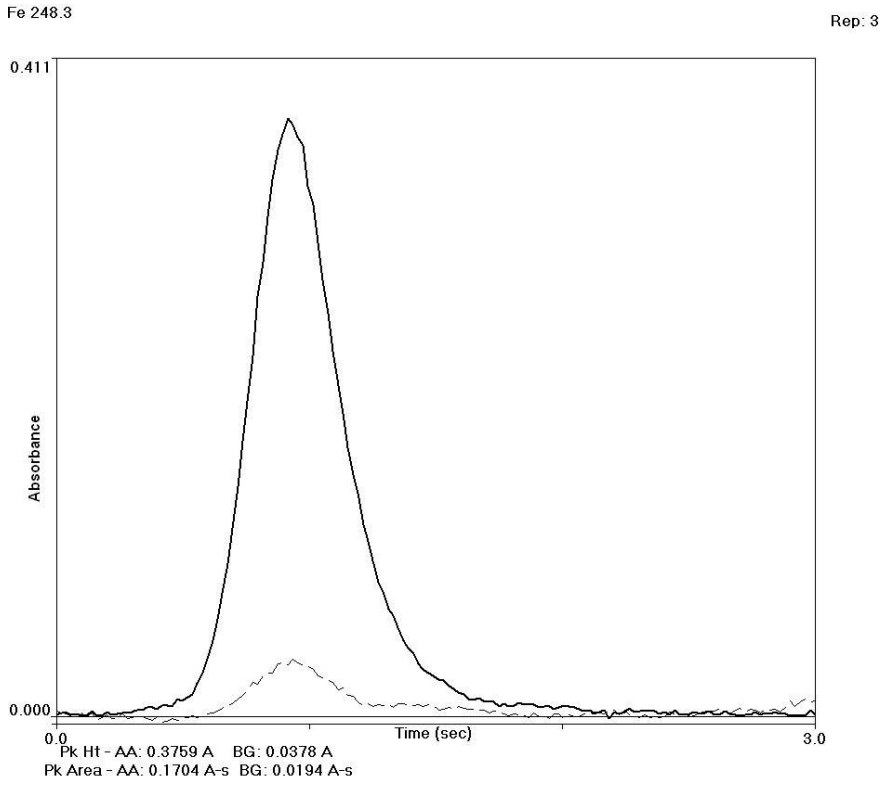
# 4 REZULTATI I RASPRAVA

Određivanje koncentracije željeza u 35 uzoraka maslinovog ulja porijeklom iz Republike Hrvatske provedena je metodom atomske apsorpcijske spektrometrije grafitnom tehnikom na instrumentu AAnalyst 800 THGA (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD).

Provedena je verifikacija već postojeće metode (Perkin Elmer, 2000; Welz i Sperling 1997), te su ispitane validacijske značajke: radno područje, linearnost, granica detekcije, granica dokazivanja i ponovljivost mjerenja uzorka (**Tablica 7.).**

Pri tome je granica dokazivanja (LOD) i određivanja (LOQ) za ovaj element određena uzastopnim mjerenjem (n=10) slijepe probe te izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija mjerenja. Trostruka vrijednost standardne devijacije uzeta je kao LOD, a deseterostruka vrijednost standardne devijacije kao LOQ.

Nakon toga provedena je analiza uzoraka. U uzorcima je prije provedbe analize provedena mineralizacija procedurom mikrovalne digestije (poglavlje 3.2.1). Koncentracija metala prisutna u uzorku maslinovog ulja određena je iz kalibracijske krivulje, ovisnosti površine pika o koncentraciji metala. Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 7** te **Slikama 6 i 7**.




**Slika 6.** Prikaz pika dobivenog tijekom mjerenja koncentracije željeza navedenom metodom.

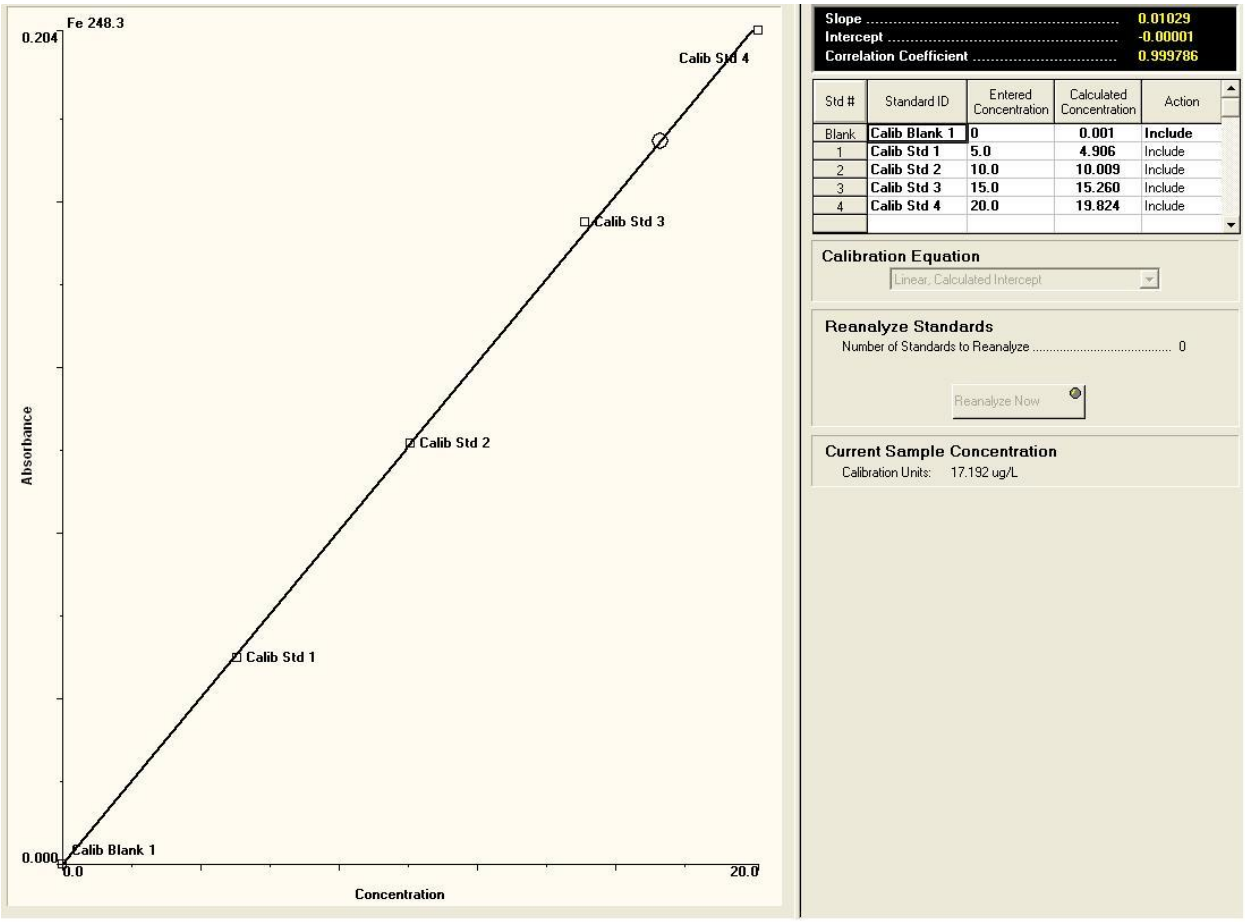
(a)

Calibration data for Fe 248.3 Equation: Linear, Calculated Intercept

| ID | Mean Signal (Abs) | Entered Conc. ug/L | Calculated Conc. ug/L | Standard Deviation | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|
| Calib Blank 1 | 0.0000 | 0 | 0.001 | 0.01 | 44.7 |
| Calib Std 1 | 0.0505 | 5.0 | 4.906 | 0.00 | 3.2 |
| Calib Std 2 | 0.1030 | 10.0 | 10.009 | 0.00 | 1.6 |
| Calib Std 3 | 0.1570 | 15.0 | 15.260 | 0.00 | 1.6 |
| Calib Std 4 | 0.2039 | 20.0 | 19.824 | 0.00 | 0.2 |

Correlation Coef.: 0.999786 Slope: 0.01029 Intercept: -0.00001

(b)




**Slika 7.** Kalibracijska krivulja, ovisnosti površine pika o koncentraciji metala željeza u radnoj otopini (□ vrijednost dobivena mjerenjem otopine standarda, ○ vrijednost dobivena mjerenjem otopine uzorak).

**Tablica 7.** Značajke validacije za određivanje željeza u maslinovom ulju GF-AAS tehnikom.

| **Element** | **Fe** |
|---|---|
| Radno područje (µL/L) | 5 - 20 |
| Kalibracijska krivulja (n=4) | y = 0.01029x - 0.00001 |
| Koeficijent korelacije | 0.99979 |
| LOD (µg/kg)[a] | 15,0 |
| LOQ (µg/kg)[a] | 50,0 |
| LOD (µg/L)[b] | 0,15 |
| LOQ (µg/L)[b] | 0,5 |
| Ponovljivost mjerenja uzorka (%) | 2,48 |

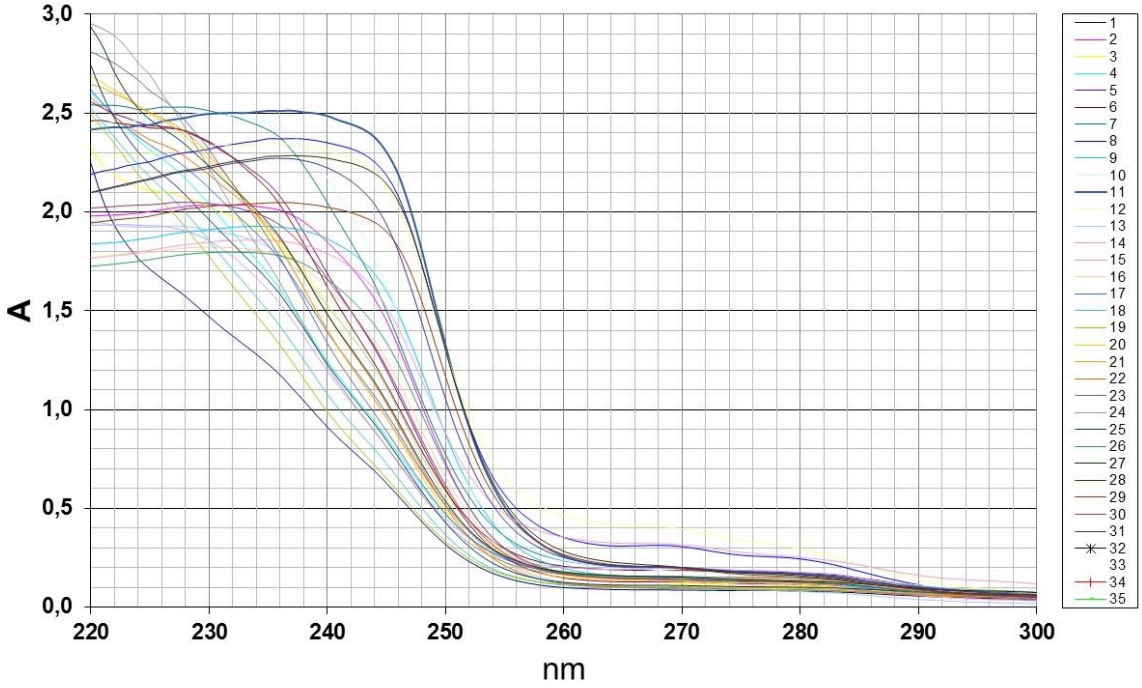
[a] na temelju odvage 0,250 g uzorka
[b] na temelju odgovarajuće slijepe probe

U literaturi su dostupni brojni podaci o negativnim učincima elemenata u tragovima (npr. željezo, bakar) na oksidativnu stabilnost maslinovog ulja i ljudsko zdravlje zato je koncentracija navedene skupine metala u maslinovom ulju jedan je od parametara kvalitete ovog tradicionalnog ulja. Oksidacija koja vodi do razvoja nepovoljnih mirisa i okusa jedan je od glavnih razloga smanjene kvalitete maslinovih ulja. Čimbenici koji najviše utječu na brzinu oksidacije su: stupanj nezasićenosti, količina kisika, temperatura, svjetlost i prisutnost metala (uglavnom prijelaznih metala kao što su Fe i Cu). Navedeni metali povećavaju brzinu oksidacije jestivih ulja povećavanim stvaranja slobodnih radikala iz masnih kiselina ili hidroperoksida kao primarnih proizvoda autooksidacije (Meira i sur., 2011; Benedet i Shibamoto, 2007; Sikwese i Duodu, 2007).

Sadržaj **željeza** u maslinovom ulju rezultat je prirodnog porijekla ovog elementa u tragovima iz ploda masline i antropogenih izvora. Koncentracija željeza u analiziranim maslinovim uljima kretala se u rasponu od 0,120 do 3,461 mg/kg, uz SV od 0,677 mg/kg (RSD: 0,28 - 4,46%). Budući da je najviša dozvoljena koncentracija željeza u maslinovom ulju 3 mg/kg, koncentracija željeza u ispitivanim uzorcima bila je ispod dozvoljenih vrijednosti, osim u jednom uzorku maslinovog ulja (3,461 mg/kg). Osim toga, primijećeno je kako se dobiveni raspon za koncentracije željeza u maslinovim uljima u potpunosti slaže sa drugim maslinovim uljima (Ieggli i sur., 2011) i to španjolskim (do 120 ng/g) i turskim (SV: 139,0 µg/g) maslinovim uljima (Llorent-Martinez i sur., 2011; Llorent-Martinez i sur., 2010; Mendil i sur, 2008).

Konjugirani dieni i triena nastaju oksidacijom ulja te apsorbiraju u ultraljubičastom dijelu spektra (**Slika 8**). Vrijednosti navedenih apsorbancija izražene su kao koeficijent ekstincije, K (**Tablica 8**).

Kod pet prikupljenih uzoraka vrijednosti K232, K270 odnosno ΔK su bile veće od 2,50, 0,22 odnosno 0,01 stoga prema Uredbi Komisije (EEZ) br. 2568/91 i Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina kojeg je donijelo Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja tih pet uzoraka nije klasificirano kao ekstra djevičansko maslinovo ulje već kao djevičansko maslinovo ulje.




**Slika 8.** Spektri snimljenih uzoraka (n=35) pri valnim duljinama od 220 do 300 nm.

**Tablica 8.** K vrijednosti u analiziranim maslinovim uljima

| Vrijednost | SV | Medijan | Raspon kvantificiranih vrijednosti | Interkvartil |
|---|---|---|---|---|
| **K232** | 2,0604 | 2,0356 | 1,3719 - 2,5490 | 1,8912 - 2,2272 |
| **K270** | 0,1722 | 0,1474 | 0,0867 - 0,5611 | 0,1318 - 0,1936 |
| **K266** | 0,1695 | 0,1509 | 0,0876 - 0,4082 | 0,1305 - 0,1947 |
| **K274** | 0,1538 | 0,1393 | 0,0847 - 0,3497 | 0,1228 - 0,1762 |
| **Δ K** | 0,0106 | 0,0030 | 0,0001 - 0,1822 | 0,0019 - 0,0063 |

Legenda:
SV – srednja vrijednost triplikata

# 5 ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave moguće je zaključiti sljedeće:

1. Provedenim istraživanjem uočene su prednosti određivanja koncentracije željeza grafitnom tehnikom nakon uklanjanja složenog matriksa spaljivanjem uzoraka mikrovalnom digestijom.
2. Niske RSD vrijednosti upućuju na iznimnu/zadovoljavajuću ponovljivost i postupka mikrovalne digestije i određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom.
3. Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te definirane NDK proveden metoda grafitne tehnike može se smatrati prikladnim za određivanje koncentracije željeza u maslinovim uljima.
4. Koncentracije željeza u istraživanim maslinovim uljima bile su ispod najviše dozvoljene koncentracije definirane važećim pravilnikom, osim u jednom uzorku te upućuje na dodatno praćenje ovog elementa u hrvatskim maslinovim uljima.
5. Istraživana maslinova ulja kategorizirana su kao ekstra djevičansko maslinovo ulje, dok je pet uzoraka klasificirano u skupinu djevičansko maslinovo ulje.
6. Koncentracija željeza i koeficijent ekstinkcije u maslinovim uljima porijeklom iz Republike Hrvatske ne razlikuju se u odnosu na maslinova ulja porijeklom iz drugih zemalja.

Potrebna su daljnja istraživanja u okviru zastupljenosti drugih metala u maslinovom ulju.

# 6 LITERATURA

Amidžić Klarić D, Primjena atomske spektrometrije u kontroli kvalitete lijekova i dodataka prehrani, predavanje, *Hrvatsko farmaceutsko društvo*, 2016.

Beaty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, The Perkin - Elmer Corporation, 1993, str.1-1 – 1-6; 2-1 – 2-9; 3-1 – 3-2; 4-1 – 4-5.

Benedet JA, Shibamoto T. Role of Transition Metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in Lipid Peroxidation. *Food Chem*, 2007, 107, 165-168.

Boskou D. Olive Oil Quality in Boskou D. (Ed.) Olive Oil: Chemistry and Technology 101-120. AOCS Press, Champaign, IL, USA. 1996.

Cindrić IJ, Zeiner M, Steffan I. Trace Elemental Characterization of Edible Oils by ICP-AES and GFAAS. *Microchem J*, 2006, 85, 136-139.

Codex standard for olive oils and olive pomace oils, 1981., http:/www.fao.org, pristupljeno 14.07.2017.

De Leonardis A, Macciola V, De Felice M. Copper and iron determination in edible vegetable oils by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction with diluted nitric acid. *Int J Food Sci Technol*, 2000, 35, 371-375

Duran RM. Relationship between the composition and ripening of the olive and the quality of the oil. *Acta Hortic.*, 1990, 286, 441–451.

Gould WA. Total quality management for the food industries. Baltimore, USA: CTI Publications Inc., 1992.

Ieggli CVS, Bohrer D, Do Nascimento PC, De Carvalho LM. Flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry for trace element determination in vegetable oils, margarine and butter after sample emulsification. *Food Addit Contam Part A*, 2011, 28, 640–648.

Llorent-Martinez EJ, Ortega-Barrales P, Fernandez-de Cordóva ML, Dominguz-Vidal A, Ruiz-Medina A. Analysis of the Legistated Metals in Different Categories of Olive and Olive-pomace Oils. *Food Control*, 22, 2010, 221-225.

Llorent-Martinez EJ, Ortega-Barrales P, Fernandez-de Cordóva ML, Dominguz-Vidal A, Ruiz-Medina A. Investigation by ICP-MS of Trace Element Levels in Vegetable Edible Oils Produced in Spain. *Food Chem*, 2011, 127, 1257-1262.

Meira M, Quintella CM, dos Santos Tanajura A, da Silva HGR, Fernando JDS, da Costa Neto PR, Pepe JM, Santos MA, Nascimento LL. Determination of the Oxidation Stability of Biodiesel and Oils by Spectrofluorimetry and Multivariate Calibration. *Talanta*, 2011, 85, 430-434.

Mendil D, Uluözlü ÖD, Tüzen M, Soylak M. Investigation of the Levels of Some Element in Edible Oil Samples Produced in Turkey by Atomic Absorption Spectrometry. *J Hazard Mater*, 2008, 165, 724-728.

Perkin–Elmer. Analytical methods for atomic absorption spectrometry. Norwalk, 2000.

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

Rossell JB. Classical analysis of oils and fats. (Eds), In Hamilton RJ and Rossell JB, Elsevier Applied Science Publishers, Ltd, England, 1986.

Salvador MD, Aranda F, Gómez-Alonso S, Fregapane G. Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chem*, 2001, 74, 267-274.

Salvador MD, Aranda F, Gomez-Alonso S, Fregapane, G. Influence of Extraction System, Production Year and Area on Cornicabra Virgin Olive Oil: A Study of Five Crop Seasons. *Food Chem*, 2003, 80, 359-366.

Sikwese FE, Duodu KG. Antioxidant Effect of A Crude Phenolic Extract from Sorghum Bran in Sunflower Oil in the Presence of Ferric Ions. *Food Chem*, 2007, 104, 324-331.

Welz B, Sperling M. Atomabsorptions-spektrometrie. 4. Neubearbeitete Auflage, Weinheim, Wiley-VCH, 1997, str.4.

Zeiner M, Steffan I, Juranovic Cindric I. Determination of trace elements in olive oil by ICP - AES and ETA – AES. *Microchem J,* 2005, 81, 171-176.

# 7 SAŽETAK/SUMMARY

Budući da elementi u tragovima imaju negativne učinke na oksidativnu stabilnost maslinovog ulja i ljudsko zdravlje, cilj ovog rada bio je odrediti koncentraciju željeza, elementa važnog u procjeni kvalitete maslinovih ulja.

Analiza ovog elementa u tragovima u 35 uzoraka maslinovog ulja porijeklom iz Republike Hrvatske provedena je metodom atomske apsorpcijske spektrometrije grafitnom tehnikom. Uzorci maslinovog ulja sadrže visoki udio lipidnih sastavnica te predstavljaju složen organski sustav za određivanje metala. U cilju dobivanja homogene otopine prikladne za određivanje metala grafitnom tehnikom svi analizirani uzorci prethodno su spaljeni mikrovalnom digestijom.

Provedenim istraživanjem uočene su prednosti određivanja koncentracije željeza grafitnom tehnikom nakon uklanjanja složenog matriksa spaljivanjem uzoraka mikrovalnom digestijom. Niske RSD vrijednosti upućuju na zadovoljavajuću ponovljivost i postupka mikrovalne digestije i određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom. Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te definirane NDK, provedene metode grafitne tehnike mogu se smatrati prikladnim za određivanje analiziranog metala u maslinovim uljima.

Koncentracije željeza u istraživanim maslinovim uljima bile su ispod najviše dozvoljene koncentracije definirane važećim pravilnikom osim u jednom uzorku te upućuju na dodatno praćenje zastupljenosti ovog metala u hrvatskih maslinovih ulja. Potrebna su daljnja istraživanja u okviru zastupljenosti drugih metala u maslinovom ulju.

Istraživana maslinova ulja kategorizirana su kao ekstra djevičansko maslinovo ulje, dok je manji broj uzoraka klasificirano u skupinu djevičansko maslinovo ulje.

Since heavy metals and trace elements have negative effects on the oxidative stability of olive oil and human health, the aim of this study was to determine the concentrations of iron, the element important for the assessment of olive oil quality.

The analysis of this trace element, in 35 samples of olive oil, originating from the Republic of Croatia, were performed by atomic absorption spectrometry using graphite technique. The samples of olive oil contain a high proportion of lipid components, and thus represent a complex organic system for the determination of metal. In order to obtain a homogeneous solution suitable for the determination of metal by graphite technique, all analyzed samples were previously prepared using a microwave digestion system.

The obtained results have shown the advantages of iron concentration determination by graphite technique after removal of complex matrix by burning samples by microwave-assisted digestion. Low RSD values point out the exceptional/satisfactory repeatability of microwave digestion procedures and the metal concentration determination by graphite technique. Based on the obtained LOD and LOQ values as well as the defined NDK, conducted graphite technique methods can be considered as suitable to determine the analyzed metal in olive oils.

The concentrations of iron in the investigated olive oils were below their maximum permissible concentrations as defined by the valid rulebook, except in one sample. The presented data point to the exceptional quality of Croatian olive oils. Further research should be conducted to evaluate the presence of other metals in the investigated olive oil samples.

The investigated olive oils are categorized as extra virgin olive oil, while a small number of samples are classified into the group of virgin olive oil.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

## 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

# Određivanje željeza u hrvatskim maslinovim uljima primjenom GF-AAS tehnike

**Margareta Talanga**

## SAŽETAK

Budući da elementi u tragovima imaju negativne učinke na oksidativnu stabilnost maslinovog ulja i ljudsko zdravlje, cilj ovog rada bio je odrediti koncentraciju željeza, elementa važnog u procjeni kvalitete maslinovih ulja.
Analiza ovog elementa u tragovima u 35 uzoraka maslinovog ulja porijeklom iz Republike Hrvatske provedena je metodom atomske apsorpcijske spektrometrije grafitnom tehnikom. Uzorci maslinovog ulja sadrže visoki udio lipidnih sastavnica te predstavljaju složen organski sustav za određivanje metala. U cilju dobivanja homogene otopine prikladne za određivanje metala grafitnom tehnikom svi analizirani uzorci prethodno su spaljeni mikrovalnom digestijom.
Provedenim istraživanjem uočene su prednosti određivanja koncentracije željeza grafitnom tehnikom nakon uklanjanja složenog matriksa spaljivanjem uzoraka mikrovalnom digestijom. Niske RSD vrijednosti upućuju na zadovoljavajuću ponovljivost i postupka mikrovalne digestije i određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom. Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te definirane NDK, provedene metode grafitne tehnike mogu se smatrati prikladnim za određivanje analiziranog metala u maslinovim uljima.
Koncentracije željeza u istraživanim maslinovim uljima bile su ispod najviše dozvoljene koncentracije definirane važećim pravilnikom osim u jednom uzorku te upućuju na dodatno praćenje zastupljenosti ovog metala u hrvatskih maslinovih ulja. Potrebna su daljnja istraživanja u okviru zastupljenosti drugih metala u maslinovom ulju.
Istraživana maslinova ulja kategorizirana su kao ekstra djevičansko maslinovo ulje, dok je manji broj uzoraka klasificirano u skupinu djevičansko maslinovo ulje.

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

Rad sadrži: 34 stranica, 8 grafičkih prikaza, 8 tablica i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: željezo, maslinovo ulje, onečišćenja, grafitna AAS, mikrovalna digestija

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

Komentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *znanstvena suradnica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
**Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić,** *znanstvena suradnica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
**Dr. sc. Željan Maleš**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: rujan 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

# Determination of iron in Croatian olive oils using GF-AAS technique

**Margareta Talanga**

## SUMMARY

Since heavy metals and trace elements have negative effects on the oxidative stability of olive oil and human health, the aim of this study was to determine the concentrations of iron, the element important for the assessment of olive oil quality.

The analysis of this trace element, in 35 samples of olive oil, originating from the Republic of Croatia, were performed by atomic absorption spectrometry using graphite technique. The samples of olive oil contain a high proportion of lipid components, and thus represent a complex organic system for the determination of metal. In order to obtain a homogeneous solution suitable for the determination of metal by graphite technique, all analyzed samples were previously prepared using a microwave digestion system.

The obtained results have shown the advantages of iron concentration determination by graphite technique after removal of complex matrix by burning samples by microwave-assisted digestion. Low RSD values point out the exceptional/satisfactory repeatability of microwave digestion procedures and the metal concentration determination by graphite technique. Based on the obtained LOD and LOQ values as well as the defined NDK, conducted graphite technique methods can be considered as suitable to determine the analyzed metal in olive oils.

The concentrations of iron in the investigated olive oils were below their maximum permissible concentrations as defined by the valid rulebook, except in one sample. The presented data point to the exceptional quality of Croatian olive oils. Further research should be conducted to evaluate the presence of other metals in the investigated olive oil samples.

The investigated olive oils are categorized as extra virgin olive oil, while a small number of samples are classified into the group of virgin olive oil.

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

Thesis includes: 34 pages, 8 figures, 8 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: iron, olive oil, impurities, graphite furnace AAS, microvawe digestion

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

Co-Mentor: **Daniela Amidžić Klarić**, **Ph.D.** *Research Associate,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
**Daniela Amidžić Klarić, Ph.D**. *Research Associate,* 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: September 2017.