

# Određivanje profila masnih kiselina u hrani za nesilice

---

**Mikić, Slavica**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:914192>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Odjel za kemiju**  
**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Slavica Mikić**  
**Određivanje profila masnih kiselina u hrani za nesilice**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Slavica Mikić**

**Određivanje profila masnih kiselina u hrani za nesilice**

**Diplomski rad**

**Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Galović**

**Neposredni voditelj: Marija Paurević**

**Osijek, 2021.**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za kemiju  
Diplomski studij kemije  
Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Kemija

## **ODREĐIVANJE PROFILA MASNIH KISELINA U HRANI ZA NESILICE**

**Slavica Mikić**

**Rad je izrađen na** Odjelu za kemiju Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

**Mentor:** doc. dr. sc. Olivera Galović

**Neposredni voditelj:** Marija Paurević, mag. chem.

### **Sažetak**

Triacilgliceroli su esteri alkohola glicerola i masnih kiselina. Masne kiseline skladište i transportiraju energiju, izgrađuju stanične membrane i reguliraju gene. U radu je opisano određivanje profila masnih kiselina u hrani za nesilice. Uspoređena su četiri načina ekstrakcije: Soxhlet ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija, direktna ultrazvučna ekstrakcija i indirektna ultrazvučna ekstrakcija. Ekstrahirani uzorci su prevedeni u metilne estere masnih kiselina uz borov trifluorid u metanolu i analizirani metodom plinske kromatografije. Najuspješnijim metodama su se pokazale direktna i indirektna ultrazvučna ekstrakcija s najviše ukupno određenih masnih kiselina, zatim Soxhlet ekstrakcija nakon koje u uzorcima nije određena niti jedna PUFA (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*) n-3 masna kiselina dok se mikrovalna ekstrakcija pokazala najmanje uspješnom prema broju ukupno određenih masnih kiselina.

**Diplomski rad obuhvaća:** 57 stranica, 43 slike, 18 tablica, 17 literaturnih pregleda, 2 priloga

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** lipidi / masne kiseline / Soxhlet ekstrakcija / ultrazvučna ekstrakcija / mikrovalna ekstrakcija / plinska kromatografija

**Rad prihvaćen:** 4.10.2021.

### **Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, predsjednica
2. doc.dr.sc. Olivera Galović, mentorica i članica
3. doc.dr.sc. Anamarija Stanković, članica
4. doc.dr.sc. Ana Amić, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Department of Chemistry**  
**Graduate Study of Chemistry**  
**Scientific Area: Natural Sciences**  
**Scientific Field: Chemistry**

**DETERMINATION OF FATTY ACID PROFILE IN LAYING HENS FEED****Slavica Mikić**

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Olivera Galović, Ph.D., assistant prof.

**Immediate supervisor:** Marija Paurević, mag. chem.

**Abstract**

Triacylglycerols are esters of alcohol glycerol and fatty acids. Fatty acids store and transport energy, build cell membranes and regulate genes. This paper describes the determination of fatty acid profiles in chicken feed mixtures. Four extraction methods were compared: Soxhlet extraction, microwave extraction, direct ultrasonic extraction, and indirect ultrasonic extraction. The extracted samples were converted to fatty acid methyl esters with boron trifluoride in methanol and analyzed by gas chromatography. The most successful methods were direct and indirect ultrasonic extraction with the highest total number of fatty acids detected, followed by Soxhlet extraction after which PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acids*) n-3 fatty acids were not detected in the samples, while microwave extraction proved the least successful according to the number of fatty acids detected.

**Thesis includes:** 57 pages, 43 figures, 18 tables, 17 references, 2 appendices

**Original in:** Croatian

**Keywords:** lipids / fatty acids / Soxhlet extraction / ultrasonic extraction / microwave extraction / gas chromatography

**Thesis accepted:** 4.10.2021.

**Reviewers:**

1. Martina Šrajter Gajdošik, PhD., assistant prof., chairman
2. Olivera Galović, PhD., assistant prof., mentor and member
3. Anamarija Stanković, PhD., assistant prof., member
4. Ana Amić, PhD., assistant prof., alternate member

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Ovaj rad izrađen je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Rad je dio istraživanja koja provodi Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Znanstvena jedinica za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane.

Dio ovog rada predstavljen je posterskim priopćenjem na 27. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera pod nazivom *Fatty acids determination in hens feed mixture*.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Literaturni pregled.....	2
2.1. Lipidi .....	2
2.1.1. Triacilgliceroli .....	2
2.1.1.1. Masti i ulja.....	2
2.1.1.2. Reakcije triacilglicerola.....	4
2.2. Masne kiseline .....	6
2.2.1. Zasićene masne kiseline .....	7
2.2.2. Nezasićene masne kiseline .....	7
2.2.3. Predstavnici .....	8
2.2.4. Metabolizam masnih kiselina .....	11
2.2.5. Fizikalna svojstva masnih kiselina .....	12
2.2.6. Mehanizmi djelovanja na biološke sustave .....	12
2.2.7. Biološki učinci.....	14
2.2.8. Prehrana .....	15
2.2.9. Upotreba u farmaceutskoj industriji .....	15
2.3. Određivanje masnih kiselina .....	16
2.3.1. Ekstrakcija .....	16
2.3.1.1. Soxhlet metoda .....	16
2.3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija .....	18
2.3.1.3. Mikrovalna ekstrakcija .....	23
2.3.2. Esterifikacija i hidroliza estera .....	26
2.3.3. Plinska kromatografija.....	27
3. Eksperimentalni dio.....	31
3.1. Kemikalije .....	31
3.2. Pribor i instrumentacija .....	32
3.3. Odabir uzoraka za analizu .....	32
3.4. Priprema uzoraka za analizu.....	32
3.4.1. Ekstrakcija .....	33
3.4.1.1. Soxhlet ekstrakcija.....	33
3.4.1.2. Ekstrakcija mikrovalovima.....	34
3.4.1.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	37

3.4.2. Priprema metilnih estera masnih kiselina .....	38
3.4.3. Plinska kromatografija.....	40
4. Rezultati i rasprava .....	41
4.1. Rezultati analize plinskom kromatografijom .....	42
5. Zaključak .....	50
6. Popis literature.....	51
7. Životopis.....	53
8. Prilozi .....	55
8.1. Tablica: Nazivi masnih kiselina .....	55
8.2. Poster i sažetak rada prezentiranog na 27. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera ..	56



## 1. Uvod

Masne kiseline su ravnolančane monokarboksilne kiseline. Nastaju hidrolizom triacilglicerola (masti ili ulja) s vodom u prisutnosti kiseline, baze ili enzima. Tom reakcijom nastaju tri masne kiseline i alkohol glicerol. Masne kiseline imaju niz važnih funkcija u organizmu, poput: glavno su metaboličko gorivo (skladištenje i transport energije), sastavni su dio staničnih membrana (fosfolipidi), regulatori su gena. Osim funkcija u slobodnom obliku, kao sastavni dio lipida imaju važnu ulogu pri toplinskoj, električnoj i mehaničkoj izolaciji živog organizma. Slobodne masne kiseline i njihove soli imaju amfipatska svojstva i stvaraju micide pa se koriste kao deterdženti i sapuni.

Glavni izvori masnih kiselina su: biljna ulja, mliječni proizvodi, mesni proizvodi, žitarice, riba i riblje ulje.

Razlikujemo zasićene i nezasićene masne kiseline. Razlika je ta da su zasićene masne kiseline zasićene vodikom, odnosno nemaju dvostruke ugljik-ugljik veze, a nezasićene imaju barem 1 dvostruku ugljik-ugljik vezu koja se može pojaviti na različitim položajima. Masti imaju visok postotak zasićenih, a ulja nezasićenih masnih kiselina.

Nezasićene masne kiseline mogu biti mononezasićene (samo 1 dvostruka ugljik-ugljik veza) i polinezasićene (više od 1 dvostruke ugljik-ugljik veze). Ukoliko se prva dvostruka veza nalazi između 3. i 4. C atoma, riječ je o  $\omega$ -3 masnoj kiselini, a ako je između 6. i 7. C atoma, tada je to  $\omega$ -6 masna kiselina.

Najčešće zasićene masne kiseline su palmitinska i stearinska, a nezasićena oleinska. Esencijalne kiseline su linolna i linolenska. Esencijalne kiseline organizam ne može sam sintetizirati pa ih je potrebno unositi prehranom.

Zajednička svojstva masnim kiselinama su: imaju nerazgranate lance, u prirodi se pojavljuju s parnim brojem C atoma, talište ovisi o stupnju nezasićenosti, u prirodnim masnim kiselinama dvostruka veza ima Z konfiguraciju.

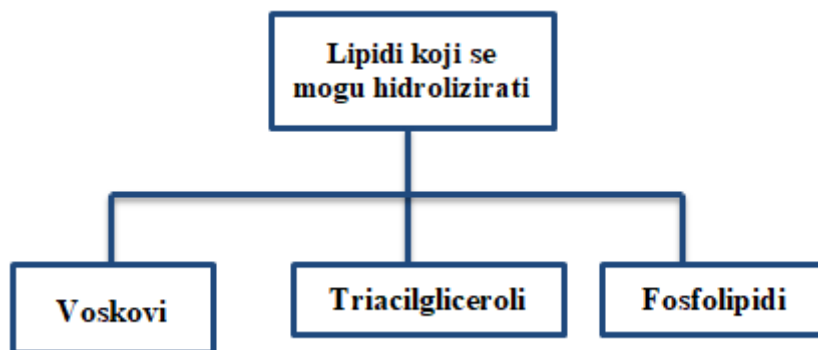
## 2. Literaturni pregled

### 2.1. Lipidi

Riječ lipid dolazi od grč. *lipos* što znači mast. Lipidi su organske molekule topive u organskim otapalima. Jedinstvena su skupina organskih spojeva jer se klasificiraju prema zajedničkom fizikalnom svojstvu (topljivost u organskim otapalima), a ne prema funkcijskoj skupini poput ostalih organskih spojeva. Veliki broj ugljik-ugljik i ugljik-vodik veza u lipidima, čini ih dobro topivima u organskim otapalima, a netopivima u vodi. Zato što nemaju zajedničku funkcijsku skupinu, dolaze u raznolikim strukturama i s različitim funkcijama u stanici. [1]

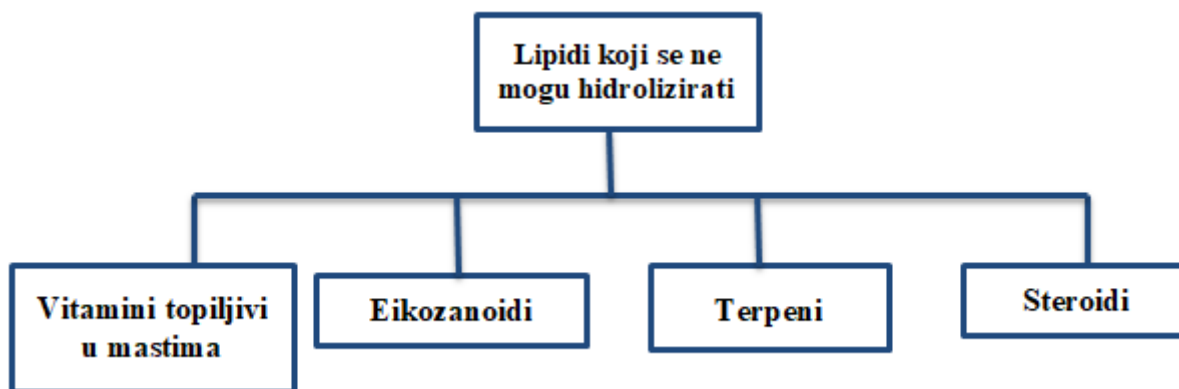
Lipidi se dijele na one koji se mogu hidrolizirati i one koji se ne mogu hidrolizirati.

Lipidi koji hidroliziraju mogu se cijepati na manje molekule hidrolizom, a to su: voskovi, triacilgliceroli i fosfolipidi (slika 1.). Većina lipida koji se mogu hidrolizirati sadrže estersku jedincu. [1]



**Slika 1.** Shematski prikaz podjele lipida koji se mogu hidrolizirati [1]

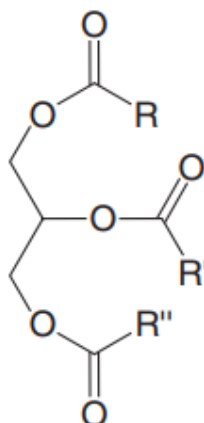
Lipidi koji ne hidroliziraju se ne mogu cijepati na manje molekule hidrolizom i općenito dolaze u raznolikijim strukturama. Lipidi koji ne hidroliziraju su: vitamini topljivi u mastima, eikozanoidi, terpeni i steroidi (slika 2.). [1]



**Slika 2.** Shematski prikaz podjele lipida koji se ne mogu hidrolizirati [1]

### 2.1.1. Triacilgliceroli

Triacilgliceroli ili trigliceridi sadrže 3 esterske skupine, a svaka esterska skupina sadrži dugi ugljikovodični lanac vezan za karbonilnu skupinu. Opću strukturnu formulu triglicerida vidimo na slici 3. [1]



**Slika 3.** Opća strukturna formula triacilglicerola [1]

Triacilgliceroli su najzastupljeniji lipidi u prirodi. Jednostavni triacilgliceroli se sastoje od 3 identična bočna lanca, a mješoviti sadrže 2 ili 3 različita bočna lanca. [1]

#### 2.1.1.1. Masti i ulja

Masti i ulja su triacilgliceroli koji sadrže masne kiseline. Najčešće masne kiseline koje možemo pronaći u mastima i uljima navedene su u tablici 1. [1]

**Tablica 1.** Najčešće masne kiseline u mastima i uljima [1]

Broj C atoma	Broj C=C veza	Struktura	Ime	Vrelište (°C)
<b>Zasićene masne kiseline</b>				
12	0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	laurinska	44
14	0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	miristinska	58
16	0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	palmitinska	63
18	0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	stearinska	69
20	0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	arahidinska	77
<b>Nezasićene masne kiseline</b>				
16	1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	palmitoleinska	1
18	1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	oleinska	4
18	2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	linolna	-5
18	3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	linolenska	-11
20	4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	arahidonska	-49

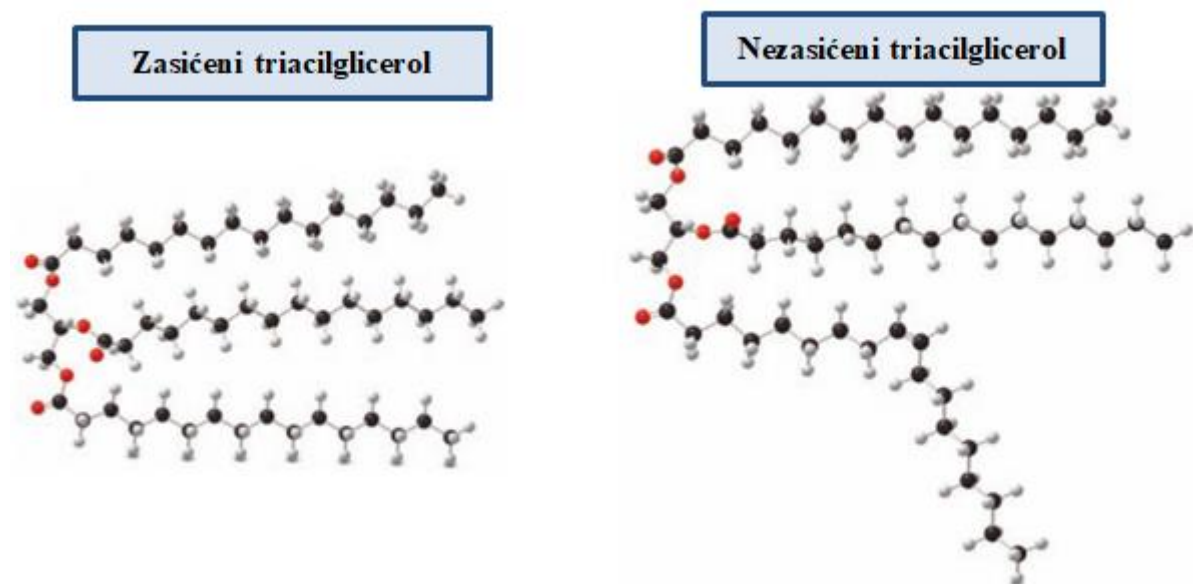
Zajedničke karakteristike masnih kiselina navedenih u tablici 1 su:

- lanci svih masnih kiselina su nerazgranati, ali mogu biti zasićeni ili nezasićeni,
- masne kiseline u prirodi imaju paran broj ugljikovih atoma,
- dvostruke veze u prirodnim masnim kiselinama obično imaju Z konfiguraciju,
- talište masne kiseline ovisi o stupnju nezasićenosti. [1]

Najčešće zasićene masne kiseline su: palmitinska i stearinska, a najzastupljenija nezasićena masna kiselina je oleinska kiselina. Linolna i linolenska kiselina se smatraju esencijalnim masnim kiselinama jer ih ne možemo sintetizirati zbog čega ih moramo unositi prehranom u organizam. [1]

Pri sobnoj temperaturi, masti su u čvrstom stanju jer imaju viša tališta, dok su ulja pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju jer imaju niža tališta. Ta razlika u talištu u korelaciji je sa stupnjem nezasićenosti u bočnim lancima masnih kiselina. Što je veći stupanj nezasićenosti, tj. što je broj dvostrukih veza veći, smanjuje se i temperatura tališta.

Trodimenzionalna struktura zasićenog triacilglicerola (masti) i nezasićenog triacilglicerola (ulja) prikazana je na slici 4. Na strukturi je vidljivo da 3 bočna lanca leže paralelno jedan s drugim što omogućava slaganje molekule u kristalnu rešetku što rezultira visokim talištem. U nezasićenim triacilglicerolima, dvostruka veza Z konfiguracije razlog je pregiba u bočnom lancu što otežava slaganje u kristalnu rešetku i dovodi do niže točke tališta. [1]



**Slika 4.** Razlika u građi između masti (lijevo) i ulja (desno) [1]

U tablici 2. navedene su masne kiseline koje čine sastav čestih masti i ulja.

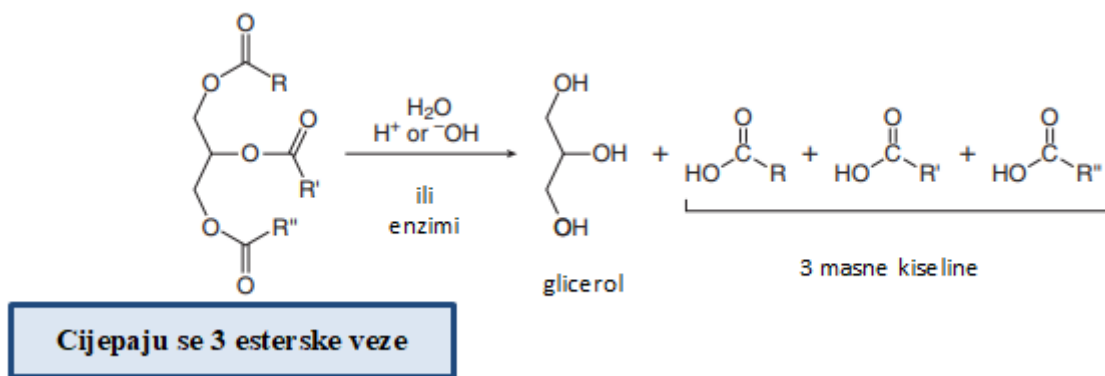
**Tablica 2.** Sastav učestalih masti i ulja [2]

Izvor	% zasićenih masnih kiselina	% oleinske kiseline	% linolne kiseline
govedina	49-62	37-43	2-3
mlijeko	37	33	3
kokos	86	7	-
kukuruz	11-16	19-49	34-62
maslina	11	84	4
palma	43	40	8
šafiran	9	13	78
soja	15	20	52

#### 2.1.1.2. Reakcije triacilglicerola

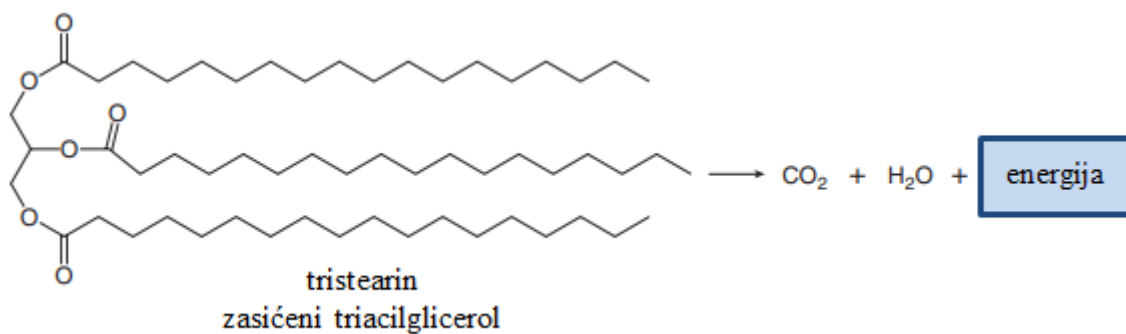
##### 1. Hidroliza triacilglicerola

Hidroliza triacilglicerola u prisutnosti kiseline, baze ili enzima daje alkohol glicerol i 3 masne kiseline (slika 5.). Ova reakcija je prvi korak u metabolizmu triacilglicerola. [1]



**Slika 5.** Reakcija hidrolize triacilglicerola [1]

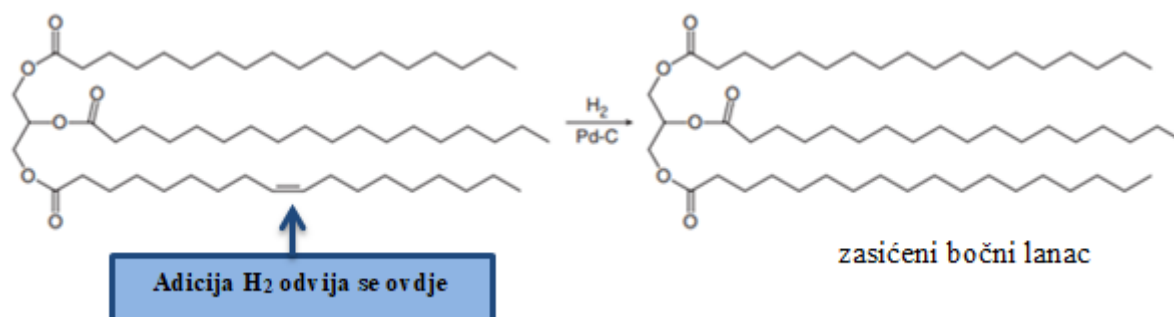
Potpuni metabolizam triacilglicerola daje  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  i veliku količinu energije zbog čega je glavna uloga triacilglicerola u stanici skladištenje energije (slika 6.). [1]



**Slika 6.** Reakcija metabolizma triacilglicerola [1]

## 2. Hidrogeniranje nezasićenih masnih kiselina

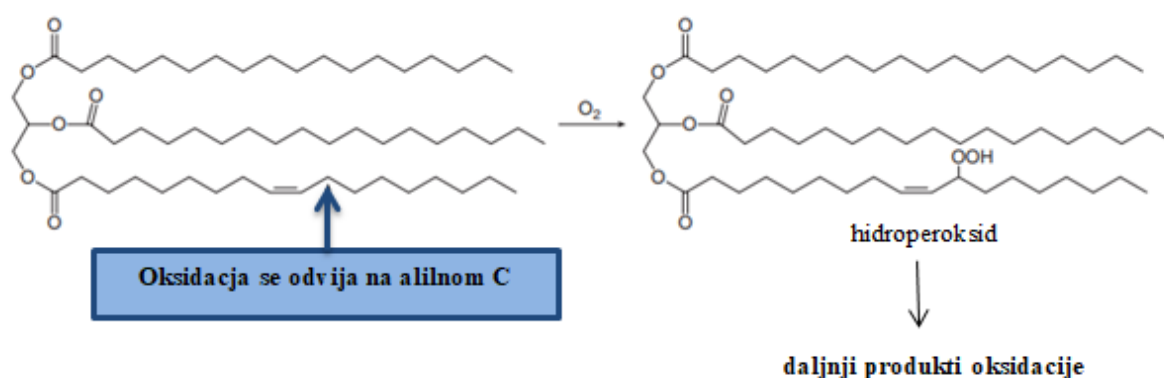
Dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina mogu se hidrogenirati pomoću  $\text{H}_2$  uz prisutost prijelaznog metala kao katalizatora (slika 7.). Reakcijom se tekuće ulje pretvara u krutu mast, a postupak se naziva još i stvrdnjavanje te se koristi za dobivanje margarina iz biljnih ulja. [1]



**Slika 7.** Reakcija hidrogeniranja nezasićenih masnih kiselina [1]

### 3. Oksidacija nezasićenih masnih kiselina

Alilne ugljik-vodik veze slabije su od ostalih ugljik-vodik veza zbog čega su podložne oksidaciji molekularnim kisikom radikalskim mehanizmom, reakcija je prikazana na slici 8. Nastali hidroperoksid je nestabilan i podvrgava se daljnjoj oksidaciji u produkte koji imaju često neugodan miris. Ovim procesom ulje postaje užeglo. [1]

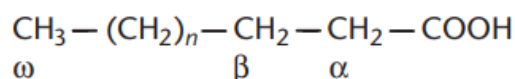


**Slika 8.** Reakcija oksidacije nezasićenih masnih kiselina [1]

## 2.2. Masne kiseline

Masne kiseline, kako u slobodnom obliku tako i kao dio lipida, imaju niz važnih funkcija u organizmu kao što su: glavno metaboličko gorivo (skladištenje i transport energije), sastavni dio staničnih membrana (fosfolipidi), regulatori gena, itd. Lipidi u prehrani osiguravaju polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA*) koje su prekursori snažnih lokalno djelujućih metabolita tj. eikozanoida. Kao dio složenih lipida, igraju važnu ulogu pri toplinskoj, električnoj i mehaničkoj izolaciji organizma, dok slobodne masne kiseline i njihove soli djeluju kao deterdženti i sapuni zbog amfipatskih svojstava i stvaranja micela. [3]

Masne kiseline su ugljikovodični lanci s metilnom skupinom na jednom kraju molekule (oznaka  $\omega$ ) i karboksilnom skupinom na drugom kraju kao što je prikazano na slici 9. Atom ugljika koji se nalazi do karboksilne kiseline naziva se  $\alpha$  ugljik, a sljedeći  $\beta$  ugljik. Slovo n se često koristi umjesto  $\omega$  za označavanje položaja dvostruke veze najbliže metilnom kraju, odnosno polazeći od zadnjeg atoma ugljika u hidrofobnom lancu u molekuli. [3]



**Slika 9.** Način označavanja C atoma u masnim kiselina [3]

Masne kiseline se imenuju prema duljini njihovog lanca, stupnju nezasićenosti (broju dvostrukih veza) i položaju dvostrukih veza. Tako oznake 14:0 i 16:0 označavaju masne kiseline sa 14, tj. 16 atoma ugljika koje ne sadrže dvostruke veze. Primjeri kako se imenuju nezasićene masne kiseline su izrazi 18:1  $\omega$ -9 i 18:1  $\omega$ -7 što označava masne kiseline od 18 ugljikovih atoma koji sadrže jednu dvostruku vezu na 9. tj. 7. atomu polazeći od zadnjeg atoma ugljika u hidrofobnom lancu molekule. Još jedan od načina sustavne nomenklature masnih kiselina jest taj da se dvostruka veza označava u odnosu na karboksilnu skupinu, tada se koristi oznaka  $\Delta$ . Tako oznake 18:1  $\Delta^9$  i 18:1  $\Delta^{11}$  označavaju masne kiseline koje se sastoje od 18 atoma ugljika s jednom dvostrukom vezom na 9., odnosno 11. atomu ugljika u odnosu na karboksilnu skupinu. [3, 4]

### 2.2.1. Zasićene masne kiseline

Zasićene masne kiseline su zasićene vodikom, tj. nemaju dvostruke ugljik-ugljik veze. Većinom su to ravni ugljikovodični lanci s parnim brojem ugljikovih atoma. Najčešće zasićene masne kiseline sadrže 12-22 atoma ugljika. [3]

### 2.2.2. Nezasićene masne kiseline

Mononezasićene masne kiseline imaju samo 1 dvostruku ugljik-ugljik vezu koja se pojavljuje na različitim položajima. Većina mononezasićenih masnih kiselina ima lanac koji se sastoji od 16 do 22 atoma ugljika, a dvostruka veza je *cis*- konfiguracije te omogućuje savijanje molekule. *Trans*- izomeri se mogu dobiti industrijskom preradom (hidrogeniranjem) nezasićenih ulja i u gastrointestinalnom traktu. Prisutnost dvostruke veze ograničava pokretljivost acilnog lanca. Masne kiseline sa *cis*- konfiguracijom su manje termodinamički stabilne od onih s *trans*- konfiguracijom zbog čega imaju i niža tališta. [3]

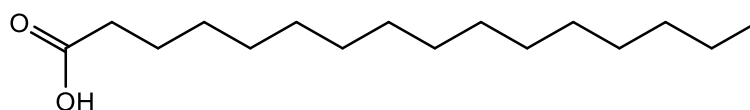


U polinezasićenim masnim kiselinama, prva dvostruka veza se može nalaziti između 3. i 4. ugljikovog atoma zbog čega se te masne kiseline nazivaju  $\omega$ -3 masnim kiselinama. Ukoliko se prva dvostruka ugljik-ugljik veza nalazi između 6. i 7. ugljikovog atoma, tada je riječ o  $\omega$ -6 masnim kiselinama. Dvostruke veze u polinezasićenim masnim kiselinama odvojene su metilenskom skupinom. Bitno je naglasiti da se  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masne kiseline ne mogu međusobno prevoditi jedne u druge. [3]

### 2.2.3. Predstavnici

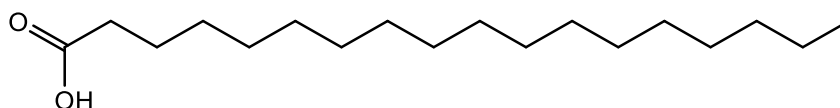
Masne kiseline čine 30-35 % ukupnog unosa energije u većini industrijskih zemalja, a glavni izvori masnih kiselina su: biljna ulja, mliječni proizvodi, mesni proizvodi, žitarice, riba i riblje ulje. [3]

Najčešća zasićena masna kiselina u životinja, biljaka i mikroorganizama je palmitinska kiselina koja sadrži 16 atoma ugljika, a čija je struktura prikazana na slici 10. [3]



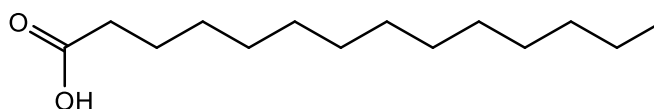
**Slika 10.** Strukturalna formula palmitinske kiseline

Stearinsku kiselinu čini 18 ugljikovih atoma te je među zastupljenijim masnim kiselinama u životinjama i nekim gljivama, a u manjim količinama nalazi se i u većini biljaka (slika 11.). [3]



**Slika 11.** Strukturalna formula stearinske kiseline

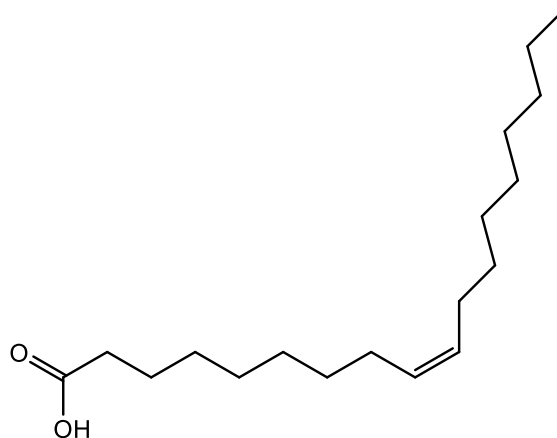
Miristinska kiselina ima 14 ugljikovih atoma te je vrlo raširena u prirodi. Njena strukturalna formula je prikazana na slici 12. [3]



**Slika 12.** Strukturalna formula miristinske kiseline

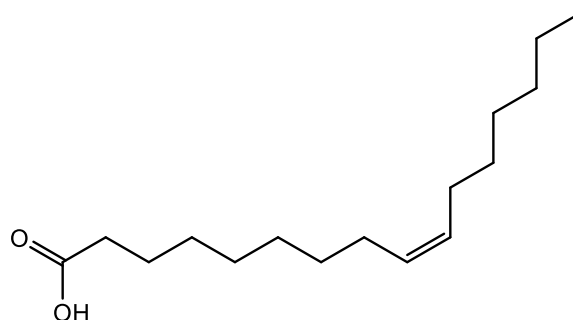
Zasićene masne kiseline kraćeg lanca s 8-10 atoma ugljika nalaze se u mlijeku i kokosovim triacilgliceridima. [3]

Oleinska kiselina (18:1  $\omega$ -9) najčešća je mononezasićena masna kiselina u biljkama, životinjama i mikroorganizmima (slika 13.). [3]



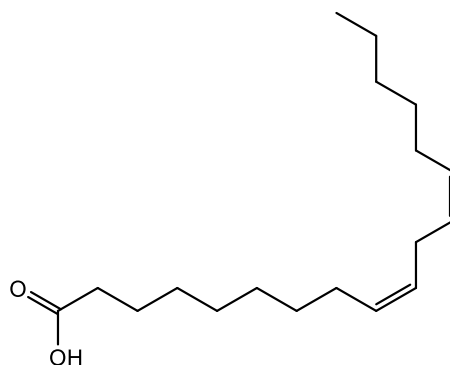
**Slika 13.** Strukturna formula oleinske kiseline

Palmitoleinska kiselina (16:1  $\omega$ -7) je također mononezasićena masna kiselina koja se osim u životinjama, biljkama i mikroorganizmima, nalazi i u sjemenkama gdje je glavna komponenta. Njena struktura prikazna je na slici 14. [3]



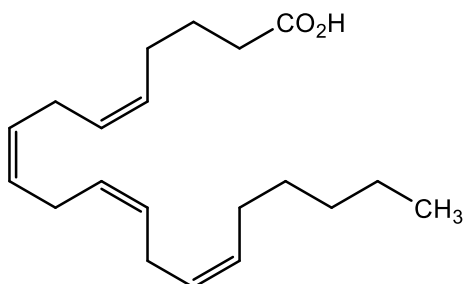
**Slika 14.** Strukturna formula palmitoleinske kiseline

Linolna kiselina (18:2  $\omega$ -6) glavna je komponenta u biljnim lipidima (slika 15.). [3]



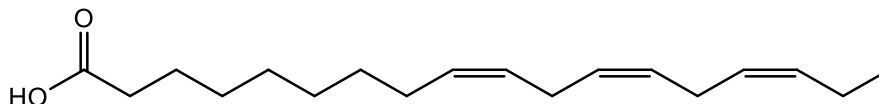
**Slika 15.** Strukturna formula linolne kiseline

Arahidonska kiselina (20:4  $\omega$ -6) je glavna komponenta membranskih fosfolipida, dok je u prehrani relativno slabo zastupljena (slika 16.). [3]



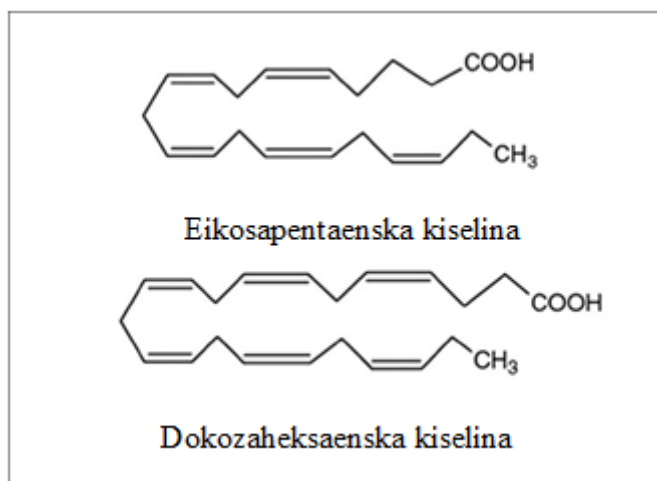
**Slika 16.** Strkturna formula arahidonske kiseline

$\alpha$ -linolenska kiselina (18:3  $\omega$ -3) se nalazi u sojinom mlijeku, ulju sjemenki repice i algama (slika 17.). [3]



**Slika 17.** Strukturna formula  $\alpha$ -linolenske kiseline

Eikosapentaenska kiselina (EPA; 20:5  $\omega$ -3) i dokozaheksaenska kiselina (DHA; 22:6  $\omega$ -3) glavne su masne kiseline morskih algi, masne ribe i ribljeg ulja, a možemo ih vidjeti na slici 18. [3]

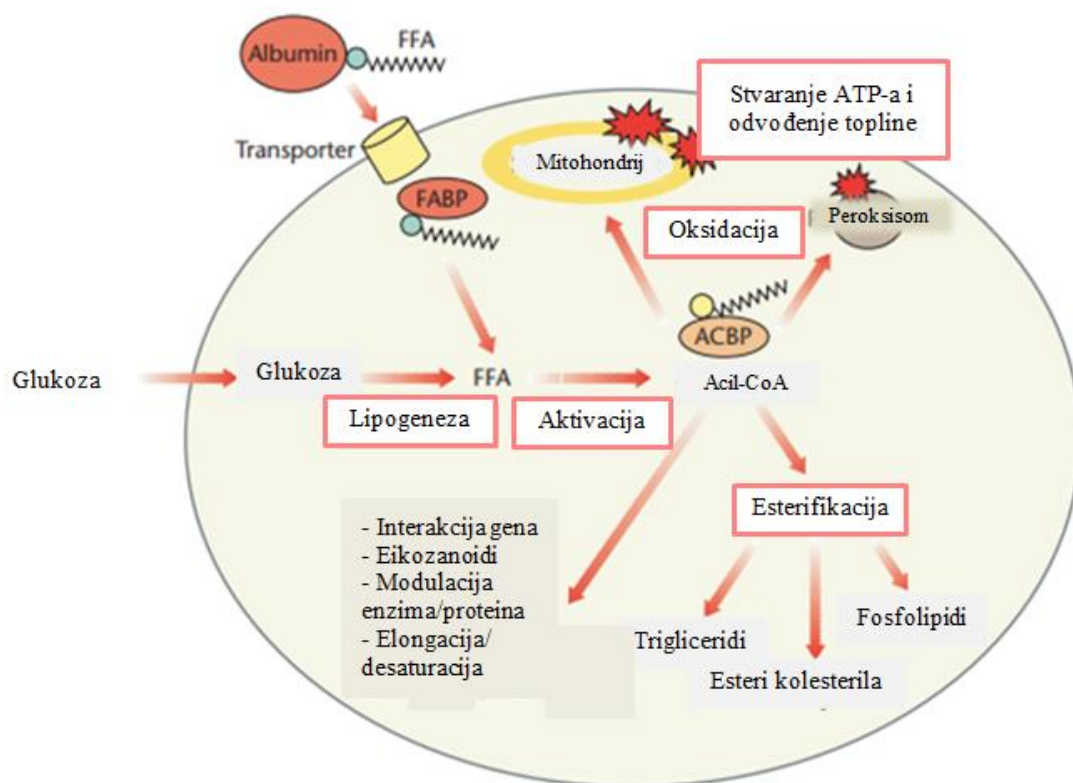


**Slika 18.** Strukturne formule eikosapentaenske (gore) i dokozaheksaenske kiseline (dolje) [8]

#### 2.2.4. Metabolizam masnih kiselina

Tijekom probave masti u organizmu nastaju slobodne masne kiseline i monoacilgliceroli koji se apsorbiraju u tankom crijevu. Slobodne masne kiseline se ponovno esterificiraju u triacilglicerole u tankom crijevu odakle se transportiraju limfnim žilama u cirkulaciju kao dio hilomikrona. Masne kiseline se u cirkulaciji transportiraju tako što su vezane za albumin ili su dio lipoproteina. [3]

Metabolizam masnih kiselina u organizmu prikazan je na slici 19. Slobodne masne kiseline se u stanice unose proteinskim transporterima u plazmatskoj membrani, a unutar stanice se transportiraju pomoću proteina koji vežu masne kiseline (eng. *Fatty Acid-Binding Protein*, FABP). Slobodne masne kiseline se zatim aktiviraju vezanjem s koenzimom A (acil-CoA) i transportiraju pomoću proteina koji veže acil-CoA (eng. *Acyl-CoA-Binding Protein*, ACBP). Postoje 3 mjesta gdje kompleks može biti transportiran; u mitohondrije ili peroksisome gdje se odvija  $\beta$ -oksidacija ili u endoplazmatski retikulum gdje se odvija esterifikacija u različite skupine lipida. Acil-CoA i određene slobodne masne kiseline mogu se vezati za transkripcijske faktore koji reguliraju ekspresiju gena ili se pretvaraju u signalne molekule kao što su eikozanoidi. Glukoza se može pretvoriti u masne kiseline (lipogeneze) ako postoji višak glukoze odnosno energije u stanicama. [3]



**Slika 19.** Matabolizam masnih kiselina u organizmu [3]

### 2.2.5. Fizikalna svojstva masnih kiselina

U svom nedisociranom, tj. kiselom obliku, masne kiseline su slabo topljive u vodi, a kao soli kalija ili natrija su relativno hidrofilne, stoga je teško odrediti njihovu stvarnu topljivost u vodi, osobito onih kiselina s dugačkim ugljikovodičnim lancem. Na topljivost masnih kiselina utječe i pH kao i tendencija povezivanja u micelle. Stvaranje micela u vodenoj otopini lipida povezano je s brzim promjenama fizikalnih svojstava u ograničenom rasponu koncentracija. Točka promjene naziva se kritičnom micelarnom koncentracijom (engl. *Critical Micelle Concentration*, CMC) pri kojoj se lipidi teže povezati, umjesto da ostanu u obliku pojedinačnih molekula. CMC nije fiksna vrijednost, nego predstavlja mali raspon koncentracija na koje značajno utječu prisutnost drugih iona i temperatura. [3]

Masne kiseline se mogu lako ekstrahirati iz otopina ili suspenzija pomoću nepolarnih otapala i snižavanjem pH kako bi karboksilna skupina ostala u neutralnom obliku. Povišenjem pH povećava se topljivost masnih kiselina u vodi jer se stvaraju soli alkalijskih metala ili sapuni, koji su površinski aktivne tvari. [3]

Na talište masne kiseline utječe njena struktura. Masne kiseline s razgranatim ugljikovodičnim lancima i sa *cis*- konfiguracijom dvostruke veze imaju niže točke tališta u odnosu na njihove ekvivalente sa zasićenim lancima. Na talište utječe i ima li lanac paran ili neparan broj ugljikovih atoma, tj. viša tališta imaju masne kiseline koje imaju neparan broj ugljikovih atoma u lancima. [3]

Zasićene masne kiseline su vrlo stabilne, a nezasićene su osjetljive na oksidaciju. Povećanjem stupnja nezasićenosti, povećava se i osjetljivost na oksidaciju. S takvim masnim kiselinama treba rukovati u atmosferi inertnog plina i držati podalje od oksidansa i spojeva koji dovode do stvaranja slobodnih radikala. [3]

### 2.2.6. Mehanizmi djelovanja na biološke sustave

#### 1. Eikozanoidi

Eikosa na grčkom znači „dvadeset“ i označava broj ugljikovih atoma u polinezasićenim masnim kiselinama koji djeluju kao prekursori eikozanoida. Važni su za nekoliko staničnih funkcija, poput agregacije trombocita (sposobnost skupljanja i stapanja), kemotaksije (kretanje krvnih stanica) i rasta stanica. [3]

## 2. Specifičnost supstrata

Masne kiseline ostvaruju interakcije s različitim supstratima, kao što su enzimi ili receptori, a njihova sposobnost interakcije sa supstratom ovisi o njihovoj strukturi. Jedan od primjera utjecaja strukture na sposobnost interakcija sa supstratom je EPA koja kao supstrat u reakciji esterifikacije daje puno manje kolesterola i diacilglicerola od svih ostalih masnih kiselina. [3]

## 3. Fluidnost membrane

Pri unosu velike količine  $\omega$ -3 masnih kiselina dugog ugljikovodičnog lanca, dolazi do ugradnje EPA i DHA u membranske fosfolipide što mijenja svojstva membrane i funkcije proteina membrane. Pokazalo se da je fleksibilnost membrana krvnih stanica povećana kod životinja hranjenih ribljim uljem. [3]

## 4. Peroksidacija lipida

Proizvodi peroksidacije lipida mogu djelovati kao biološki signali. Jedna od glavnih briga pri unosu polinezasićenih masnih kiselina je njihov stupanj nezasićenosti, tj. mogućnost da se olakša peroksidacija lipoproteina niske gustoće (eng. *Low-Density Lipoprotein, LDL*) tzv. lošeg kolesterola. Peroksidirani LDL može biti endocitiziran makrofagima i potaknuti razvoj ateroskleroze. Iako su neki od objavljenih podataka kontradiktorni, većina studija ipak sugerira na važnost unosa odgovarajuće količine antioksidansa putem prehrane s polinezasićenim masnim kiselinama kako bi se smanjio rizik od peroksidacije lipida. [3]

## 5. Aciliranje proteina

Proteini su najčešće acilirani stearinskom (18:0), palmitinskom (16:0) ili miristinskom (14:0) kiselinom. Aciliranje proteina je važno za smještanje proteina unutar membrana i za njihovo savijanje. Proteini su najčešće acilirani zasićenim masnim kiselinama, no i neke polinezasićene masne kiseline mogu sudjelovati u acilaciji proteina. [3]

## 6. Interakcije s genima

Masne kiseline i njihovi derivati (acil-CoA ili eikozanoidi) mogu stvoriti interakcije s proteinima nuklearnih receptora koji se vežu na određena regulatorna područja DNA i na taj način mijenjati transkripciju tih gena, tj. nastali kompleks može funkcionirati kao transkripcijski faktor. Zbog toga što masne kiseline mogu utjecati na regulaciju transkripcije gena, mogu regulirati i metabolizam, staničnu proliferaciju i staničnu smrt. [3]

### 2.2.7. Biološki učinci

Zamjena zasićenih masnih kiselina s mono- i polinezasićenim masnim kiselinama (osobito  $\omega$ -6 kiselinama) smanjuje koncentraciju ukupnog i LDL kolesterola u plazmi (tablica 3.). Pretpostavlja se da je to posljedica povećanog prijenosa LDL kolesterola iz cirkulacije u jetru. [3]

**Tablica 3.** Utjecaj masnih kiselina na koncentraciju ukupnog i LDL kolesterola [3]

	$\Delta$ kolesterol (mmol L <sup>-1</sup> )	$\Delta$ LDL kolesterol (mmol L <sup>-1</sup> )
12:0	+0,01	+0,01
14:0	+0,12	+0,071
16:0	+0,057	+0,047
<i>Trans</i> masne kiseline (morskog podrijetla)	+0,039	+0,043
<i>Trans</i> masne kiseline (biljnog podrijetla)	+0,031	+0,025
18:1	-0,0044	-0,0044
18:2/3	-0,017	-0,017

$\omega$ -3 masne kiseline koje uzimamo prehranom, kao što su EPA i DHA, smanjuju razinu triacilglicerola u plazmi tako što smanjuju njihovu proizvodnju. U tablici 4. navedeni su metabolički, imunološki i kardiovaskularni učinci masnih kiselina koje unosimo prehranom. [3]

**Tablica 4.** Metabolički, imunološki i kardiovaskularni učinci masnih kiselina koje unosimo prehranom [3]

Bolest	Negativan utjecaj	Pozitivan utjecaj
Koronarna bolest	Zasićuje	$\omega$ -3 PUFA i monoeni
Moždani udar	Zasićuje	?
Krvni tlak	Zasićuje	$\omega$ -3 PUFA
Dijabetes	Zasićuje	$\omega$ -3 PUFA
Zgrušavanje krvi i fibrinoliza	?	$\omega$ -3 PUFA (?) i $\omega$ -6 PUFA (?)
Funkcija trombocita	?	$\omega$ -3 PUFA i $\omega$ -6 PUFA (?)
Hiperlipidemija	Zasićuje	$\omega$ -3 PUFA, $\omega$ -6 PUFA i monoeni
Oksidacija LDL	$\omega$ -6 PUFA (?)	Monoeni
Aterogeneza (reaktivnost leukocita, imunološke funkcije)	Zasićuje i monoeni	$\omega$ -3 PUFA i $\omega$ -6 PUFA
Endotelna disfunkcija	?	$\omega$ -3 PUFA(?)
Srčane aritmije	Zasićuje	$\omega$ -3 PUFA i $\omega$ -6 PUFA
Upala (reumatoidni artritis)		$\omega$ -3 PUFA

\*  $\omega$ -3 PUFA, dugolančane  $\omega$ -3 masne kiseline (EPA i DHA);  $\omega$ -6 PUFA, većinom linolna kiselina (18:2,  $\omega$ -6); monoeni (*cis* 18:1,  $\omega$ -9); zasićene masne kiseline, većinom miristinska i palmitinska kiselina (14:0 i 16:0)

Esencijalne  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masne kiseline su važne za rast i razvoj fetusa. Posebno su važne za središnji živčani sustav, utječu na oštrinu vida i na kognitivne funkcije. Njihov nedostatak potiče upale kože i odgađa zacjeljivanje rana. [3]

Iako je dokazano da EPA i DHA inhibiraju proliferaciju određenih staničnih linija raka i tako smanjuju napredovanje tumora u pokusima na životinjama, i dalje je nejasno utječu li masne kiseline na razvoj raka kod ljudi. [3]

### 2.2.8. Prehrana

Podataka o potrebnom unosu esencijalnih masnih kiselina je relativno malo. Smatra se da je odgovarajući unos linolne (18:2  $\omega$ -6) i linolenske kiseline (18:3  $\omega$ -3) 2 % i 1 % ukupne energije. U tablici 5. navedene su minimalne količine esencijalnih kiselina koje su potrebne kako bi se izbjegli klinički simptomi uzrokovani nedostatkom esencijalnih kiselina. Predloženo je da bi omjer  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 kiselina trebao biti 1:4. [3]

**Tablica 5.** Minimalne količine esencijalnih kiselina koje su potrebne kako bi se izbjegli klinički simptomi uzrokovani nedostatkom esencijalnih kiselina [3]

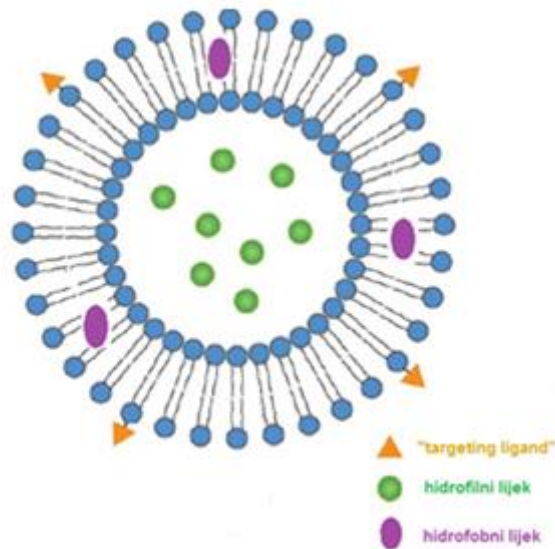
	Unos (% energije)		Unos (mg dan <sup>-1</sup> )	
	$\omega$ -3	$\omega$ -6	$\omega$ -3	$\omega$ -6
Minimum	0,2 - 0,3	1 - 3	400 - 600	2 400 - 7 200
Optimalno	1 - 2	3 - 5	2 400 - 4 800	7 200 - 12 000

\*Brojevi se temelje na podacima pacijenata s nedostatkom esencijalnih masnih kiselina i na procjeni potrebnog i optimalnog unosa u zdravih, normalnih osoba s unosom energije od 9,2 MJ dan<sup>-1</sup>

### 2.2.9. Upotreba u farmaceutskoj industriji

Masne kiseline se koriste u farmaceutskoj industriji kao neaktivni sastojci (pomoćne tvari) te je upotreba formulacija lipida kao nosača aktivnih tvari sve veća. Lipidi se u farmaceutskoj industriji najviše koriste u proizvodnji emulzija masti, uglavnom za kliničku prehranu i kao nosači lijekova. Još jedna često korištena formulacija lipida je liposom. Liposomi su modelni membranski sustavi koji u svoj lipidni dvosloj mogu inkorporirati različite aktivne tvari. Na slici 20. prikazana je građa liposoma. Masne kiseline se koriste zbog njihovih funkcionalnih učinaka kao i zbog njihove biokompatibilnosti. Mogu se koristiti slobodne masne kiseline ili kao dio složenih lipida. [3]





**Slika 20.** Shematski prikaz građe liposoma

## 2.3. Određivanje masnih kiselina

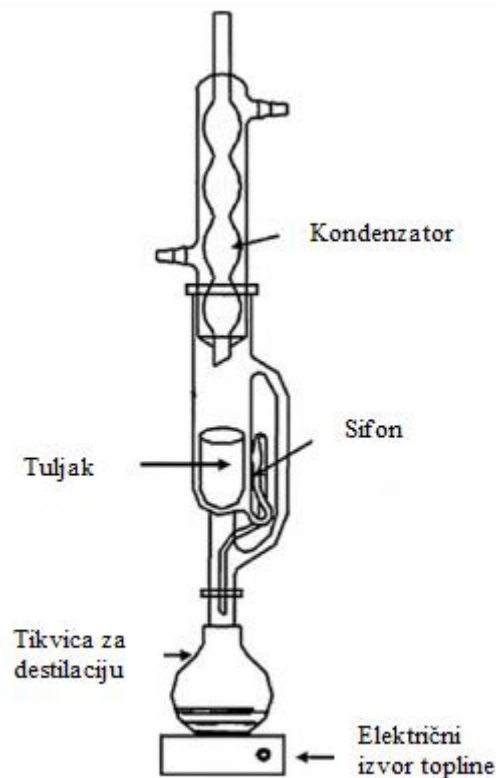
### 2.3.1. Ekstrakcija

Kako bi se mogao odrediti profil masnih kiselina u hrani za nesilice, potrebno je prvo pripremiti uzorak. Priprema započinje ekstrakcijom masnih kiselina iz hrane za nesilice. U ovom radu opisana su 3 načina ekstrakcije, a to su redom: Soxhlet metoda, ultrazvučna ekstrakcija te mikrovalna ekstrakcija.

#### 2.3.1.1. Soxhlet metoda

Soxhlet je 1879. razvio novi sustav ekstrakcije, tzv. Soxhlet ekstraktor po kojem je tehnika i dobila ime. Ova metoda je dugo bila najraširenija metoda ekstrakcije te je standardna metoda više od stoljeća. [6]

Soxhlet metoda se provodi tako da se uzorak stavlja u tuljak koji se postepeno puni kondenziranim ekstraktom iz destilacijske tikvice kao što je vidljivo na slici 21. Kada tekućina dosegne razinu prelijevanja, tada se vraća u destilacijsku tikvicu putem sifona i na taj način se ekstrahirani analit vraća u uzorak. Postupak je potrebno ponavljati sve dok se ne postigne potpuna ekstrakcija. [7]



**Slika 21.** Shematski prikaz Soxhlet aparature [7]

Prednosti ove metode leže u tome što se uzorak više puta dovodi u kontakt sa svježim dijelovima ekstrakta, čime se potiče pomicanje ravnoteže prijenosa mase, temperatura sustava ostaje relativno visoka jer toplina koja se primjenjuje na destilacijsku tikvicu doseže i u ostale dijelove sustava, nije potrebna filtracija, protok uzorka se može povećati istovremenom paralelnom ekstrakcijom jer je osnovna oprema jeftina, jednostavna metodologija koja ne zahtijeva puno obuke i potrebna je mala količina uzorka. [6, 7]

S druge strane, nedostaci ove tehnike u odnosu na druge konvencionalne tehnike su: dugo vrijeme ekstrahiranja, velika količina ekstrakcijskog otpada (troškovi odlaganja, ekološki problemi), uzorci se obično ekstrahiraju na temperaturi vrelišta tvari koja se ekstrahira pri čemu se ne mogu zanemariti toplinska razlaganja termolabilnih spojeva. Također, konvencionalni Soxhletov ekstraktor ne može izazvati miješanje što bi ubrzalo metodu, potreban je korak isparavanja otapala/koncentriranja smjese nakon ekstrakcije zbog velike količine korištenog otapala, tehniku ograničava selektivnost otapala te ju nije lako automatizirati. [7]

Broj službenih metoda koje se temelje na konvencionalnoj Soxhlet metodi je impresivan, većinom se primjenjuje za ekstrakciju masti iz različitih matrica, dok se rjeđe koristi za izolaciju drugih polarnijih spojeva. [7]

#### 2.3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvukom se smatraju valovi s frekvencijom približno 20 000 Hz, što se smatra gornjom granicom osjetljivosti ljudskog uha. Valna duljina ultrazvučnih valova razlikuje se po tome u kojem se mediju nalaze. Valne duljine u zraku su do 0,5  $\mu\text{m}$ , dok su u tekućinama i čvrstim tijelima za 4 do 12 puta veće. Na tu razliku utječe brzina širenja ultrazvuka. Ultrazvuk se u prirodi pojavljuje zajedno sa zvučnim valovima, a umjetno ih proizvode ultrazvučni generatori koji pretvaraju druge oblike energije u energiju ultrazvučnih valova. [8]

Razlikujemo ultrazvuk niskog intenziteta i ultrazvuk visokog intenziteta.

Pri dijagnostičkom ultrazvuku niskog intenziteta (intenzitet je manji od 1  $\text{Wcm}^{-2}$ ) primjenjuju se visoke frekvencije od barem 2 MHz. Ultrazvuk takvih frekvencija ne uzrokuje niti kemijske niti fizikalne promjene medija na koji se primijenio te se zbog toga ova metoda smatra neinvazivnom. Ova analitička metoda se koristi za kontrolu obrađene hrane, mjerenje viskoznosti, sastava i teksture, određivanje koncentracije tvari u hrani i dr. [9]

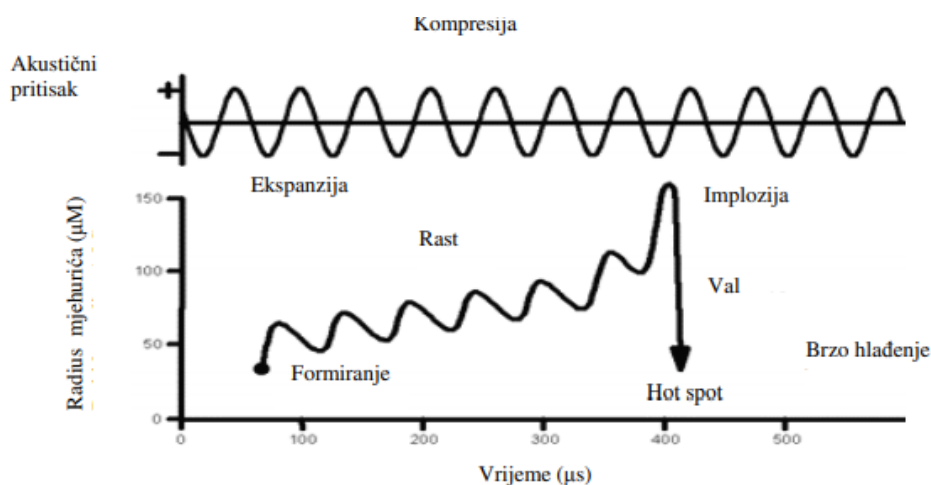
Ultrazvuk visokog intenziteta (intenzitet je u rasponu od 1 do 1 000  $\text{Wcm}^{-2}$ ) s frekvencijama 20-100 kHz uzrokuje fizikalne i kemijske promjene medija na koje se primjenjuje te se zbog toga tehnika smatra invazivnom. Koristi se za ekstrakciju, otplinjavanje tekućina, emulgiranje, sušenje i sterilizaciju. [9]

Najčešća metoda za stvaranje ultrazvuka visokog intenziteta je pomoću električne energije. Ultrazvučni pretvarači pretvaraju električnu i/ili mehaničku energiju u energiju zvuka. Ti elektroakustični sustavi su najčešće magnetnostriktivni ili piezoelektrični pretvornici. U promjenjivom električnom polju se piezoelektrični kristali šire i kontrahiraju. Zbog privlačenja molekula koje su polarizirane nastaju mehaničke vibracije. Na pojačalu se mehaničke vibracije pojačavaju, a sondom se u mediju emitiraju ultrazvučni valovi. Kako ultrazvučni valovi prolaze kroz medij, tako nastaju longitudinalni valovi zbog čega nastaje područje s promjenjivim kompresijama i ekspanzijom tlaka. Formiraju se milijuni mikroskopskih mjehurića ili šupljina koji se šire zbog djelovanja negativnog tlaka, a kada dođu pod utjecaj pozitivnog tlaka naglo implodiraju. Za pravilan rad pretvarača jako je bitno da u sondi nema zraka kako ne bi došlo do gubitaka akustične energije uzrokovanih niskom akustičnom impedancijom i visokom

akustičnom apsorpcijom zraka. Zraka ultrazvuka može biti fokusirana geometrijskim (npr. lećom) ili elektroničkim putem (podešavanjem relativne faze elementa u području sonde („fazno polje“)). [9]

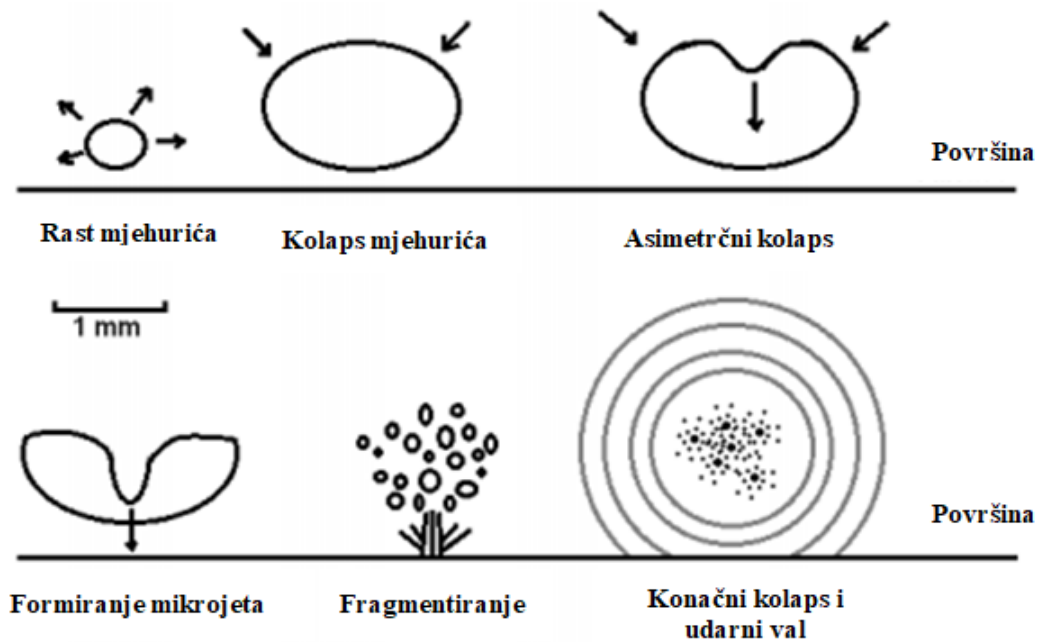
Ultrazvuk visokog intenziteta se može dobiti i pomoću mlaza plina ili pokretanjem tekućine, ali te metode su rjeđe u odnosu na metodu pomoću električne energije. [9]

Kao što je već opisano, širenje zvučnih valova u tekućem mediju uzrokuje nastanak longitudinalnih valova što stvara izmjenične cikluse kontrakcija i ekspanzija te ekspanzivne vrtloge. Zbog oscilacije tlaka u tekućem mediju, osciliraju i mjehurići koji uvijek malo više narastu u fazi ekspanzije nego što se smanje u fazi kompresije. Kada mjehurić dosegne određenu kritičnu veličinu, urušava se sam u sebe i ne može apsorbirati energiju. Do urušavanja dolazi jer se mjehurić bez ulazne energije ne može sam održavati (slika 22.). Kritična veličina mjehurića ovisna je o primjenjenoj frekvenciji i o tretiranom mediju. Te ciklusne fluktuacije tlaka stvaraju veliki broj udubljenja što su posljedice povećanja difuzije plina unutar mjehurića za vrijeme ciklusa ekspanzije jer se povećava površina mjehurića. Ukoliko energija ultrazvuka nije dovoljna za zadržavanje plinske faze unutar mjehurića, dogodit će se brza kondenzacija, a molekule nastale kondenzacijom se sudaraju velikim brzinama i dolazi do nastajanja udarnih valova. Udarni valovi su uzrok pojave visokih temperatura (do 5 500 K) i visokih tlakova (do 100 MPa) što uzrokuje fizikalne i kemijske promjene svojstava lokalnih molekula. Frekvencija ultrazvuka je najvažniji faktor za stvaranje kavitacije, a na kavitaciju utječu i svojstva medija (viskoznost, površinska napetost, gustoća) i temperatura (temperatura je obrnuto proporcionalna početku kavitacije). [9]



**Slika 22.** Grafički prikaz usporedbe ciklusa kompresije i ekspanzije s formiranjem, rastom te implzijom kavitacijskog mjehurića [9]

Na slici 23. vidimo prethodno opisani postupak nastanka i urušavanja kavitacijskog mjehurića što rezultira nastankom udarnih valova.



**Slika 23.** Nastanak i urušavanje kavitacijskog mjehurića [10]

Pri ultrazvučnoj ekstrakciji, koristi se ultrazvuk visoke snage koji omogućava otapalima veća prodiranja u materijale i povećava prijenos masa. Ultrazvuk dolazi u direktan kontakt sa sadržajem stanice kada dođe do pucanja stanične stijenke što ubrzava ekstrakciju i povećava njenu efikasnost. Prednosti ekstrakcije ultrazvuka leže u tome da se neka organska otapala mogu nadomjestiti onima koja su generalno priznata kao sigurna (engl. *generally recognised as safe*, GRAS), smanjuju se količine otapala i ubrzava ekstrakcija. [9]

U tablici 6. prikazan je mehanički učinak ultrazvuka, odnosno njegovo djelovanje nakon oštećenja stijenke koje je nastalo djelovanjem kavitacije čime se poboljšao prijenos mase i olakšao prilaz otapala sadržaju stanice što je povećalo prinos ekstrakcije. [9]

**Tablica 6.** Mehanički učinak ultrazvuka pri ekstrakciji [9]

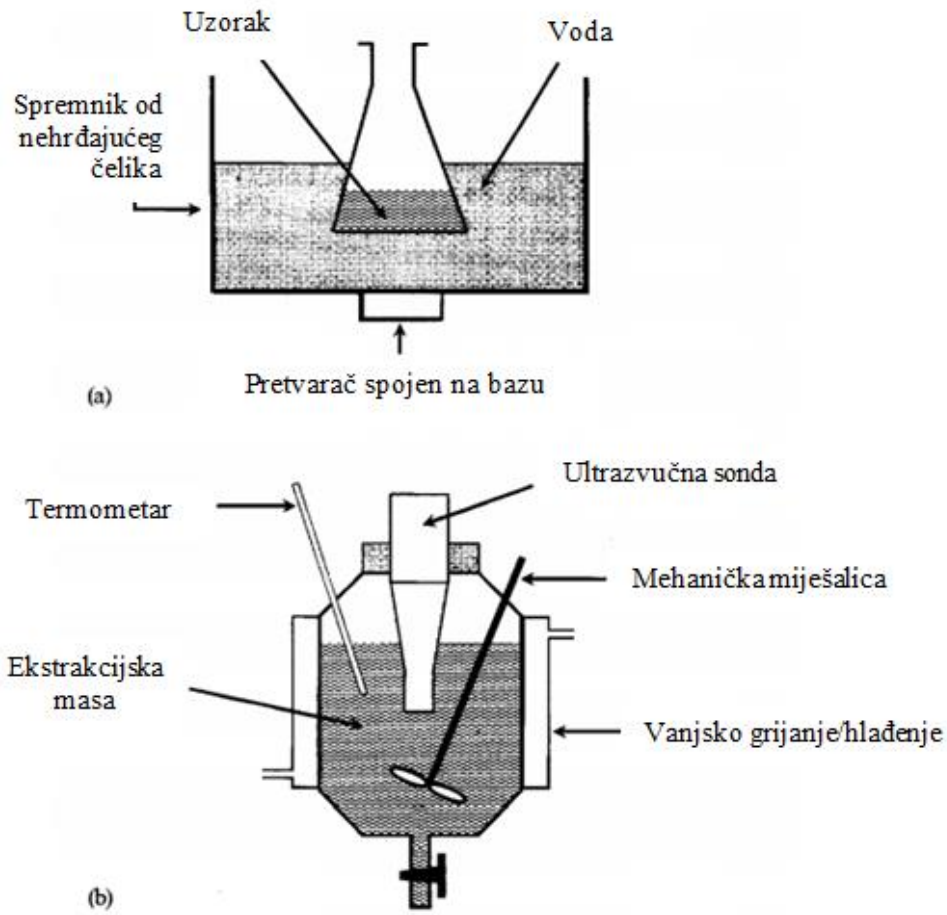
Uzorak	Ultrazvuk	Otapalo	Performanse
Bademovo ulje	UZV kupelj, 20 kHz	Superkritični CO <sub>2</sub>	30% povišenje prinosa ili smanjenje vremena redukcije
Biljni ekstrakti (komorač, hmelj, neven, menta)	Miješana kupelj, 20 do 2 400 kHz	Voda i etanol	34% povećanje prinosa uz miješanje
Ginseng saponini	Kupelj, 38.5 kHz	Voda, metanol i n-butanol	Trostruko povećanje brzine ekstrakcije
Đumbir	Kupka, 20 kHz	Superkritični CO <sub>2</sub>	30% povišenje prinosa ili smanjenje vremena redukcije
Sojini proteini	Kontinuirano, 20 kHz, 3 W po gramu	Voda i lužina (NaOH)	53% i 23% povećanje prinosa u odnosu na ekvivalentne UZV kupelji
Sojini izoflavoni	Kupelj, 24 kHz	Voda i otapalo	15% povećanje učinkovitosti ekstrakcije
Rutin	Kupelj, 20 kHz	Voda i metanol	20% povećanje u 30 minuta
Kamozinska kiselina	Kupelj, 20 kHz i 40 kHz	Butanon i etil-acetat	Redukcija u ekstrakcijskom vremenu
Polifenoli, amino k, kafein ( zeleni čaj)	Kupelj 40 kHz	Voda	Povećan prinos pri 65°C u usporedbi sa 85°C

Ultrazvuk nižih frekvencija je puno korisniji od ultrazvuka viših frekvencija koji je gotovo zanemariv. Razlog tomu je taj što je kod nižih frekvencija dominantan mehanički učinak fenomena kavitacije (npr. turbulencije i strujanje tekućine). U tablici 7 vidljivo je kako djeluju različite frekvencije na poboljšanje prinosa.

**Tablica 7.** Djelovanje različitih frekvencija pri ultrazvučnoj ekstrakciji [9]

UZV frekvencija (kHz)	Biljni materijal	Rezultati
2400	Kora <i>Cinchona-e</i>	Nema prinosa (previsoke frekvencije ultrazvuka)
400	Ulje kikirikija	Prinos poboljšan kada se koristi heksan kao otapalo
500	Listovi beladone	Sličan prinos kao i kod maceracije, očuvanje alkaloida
25	Korijenje <i>Rauwolfia-e</i>	Isti prinos nakon sonifikacije (15 min) i maceracije (8 h)
20-40	Anđeoska truba	9% više alkaloida u 1 h, 40 kHz su efikasnije
20	Kora <i>Cinchona-e</i>	15% više alkaloida u 1,5 h UZV ekstrakciji nego 7 h Soxhletom
1 000	Otrovni orah	Prinos alkaloida UE (20 min) 1,2 i 0,95%, dok kod SE 0,64 i 0,94% (8 h)
800	Listovi digitalisa	Malo povišen prinos UE, ali dolazi do smanjenja koncentracije glikozida uslijed formiranja H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
20	Berberin	50% viši prinos UE (0,5 h) nego ekstrakcija lužinama (24 h)
1 000	Kopriva	UE daje bolje rezultate nakon 5 min korištenja 1 W cm <sup>-2</sup> UZV
800	Oman i kolotoč	Bolji prinos u kraćem vremenu (10-40 min), nema degradacije inulina
1 000	Amarant	5 min sonifikacije ne šteti ekstrahiranim aminokiselinskim komponentama

Razlikujemo direktnu i indirektnu ultrazvučnu ekstrakciju. Za indirektnu ultrazvučnu ekstrakciju potrebna je ultrazvučna kupelj koju napunimo vodom. Voda je medij koji prenosi ultrazvučne valove, koje proizvodi pretvarač, do tikvice s uzorkom i zbog toga se metoda naziva indirektnom. Za razliku od indirektna, kod direktne ultrazvučne ekstrakcije se u tikvicu s uzorkom uroni sonda koja proizvodi ultrazvučne valove. Na slici 24. vidimo shematski prikaz indirektna i direktne ultrazvučne ekstrakcije.

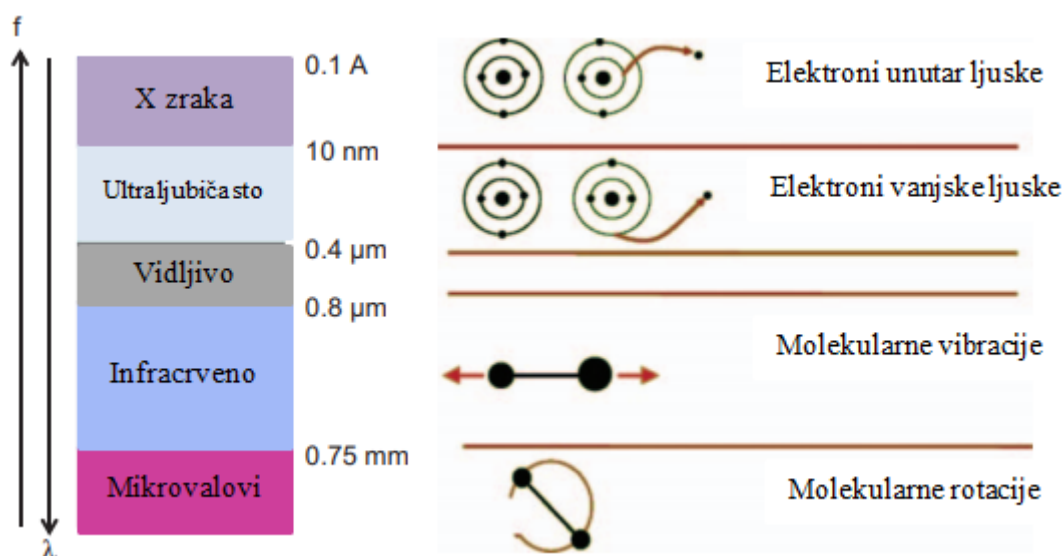


**Slika 24.** Shematski prikaz indirektne ultrazvučne ekstrakcije (gore) i direktne ultrazvučne ekstrakcije (dolje) [11]

### 2.3.1.3. Mikrovalna ekstrakcija

Energija mikrovalnog zračenja je neionizirajuće zračenje od 300 MHz do 300 GHz s valnom duljinom u zraku ili vakuumu od 1 m do 1 mm. Na slici 25. prikazan je elektromagnetski spektar na kojem je označen i položaj mikrovalova. [12]



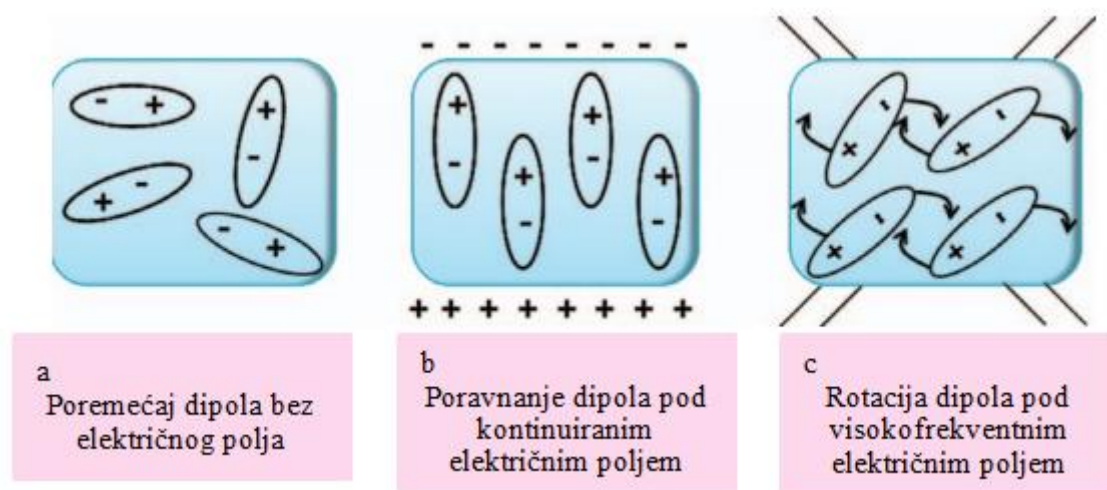


**Slika 25.** Elektromagnetski spektar [12]

Mikrovalne pećnice emitiraju elektromagnetske valove koji su sastavljeni od 2 međusobno okomita polja: električnog i magnetskog polja. Mikrovalovi se mogu koristiti kao nositelji informacija i kao energetske vektore. Kao energetske vektore primjenjuju se za izravno djelovanje valova na materijal koji može apsorbirati dio elektromagnetske energije i pretvoriti ju u toplinu. Pretvorba elektromagnetske energije u toplinsku odvija se pomoću 2 mehanizma: ionskom vodljivošću i rotacijom dipola i u otapalu i u uzroku. Istodobnom primjenom oba mehanizma, povećava se učinkovitost pretvorbe mikrovalne energije u toplinsku. [12]

Ionska vodljivost je posljedica elektroforetske migracije iona zbog promjene elektromagnetskog polja. Opor otopine protoku iona i sudari između molekula rezultiraju trenjem, tj. zagrijavanjem otopine. Osim toga, pokretljivost iona povećava i prodiranje otapala u matriks te na taj način olakšava otapanje ciljnih spojeva. [12]

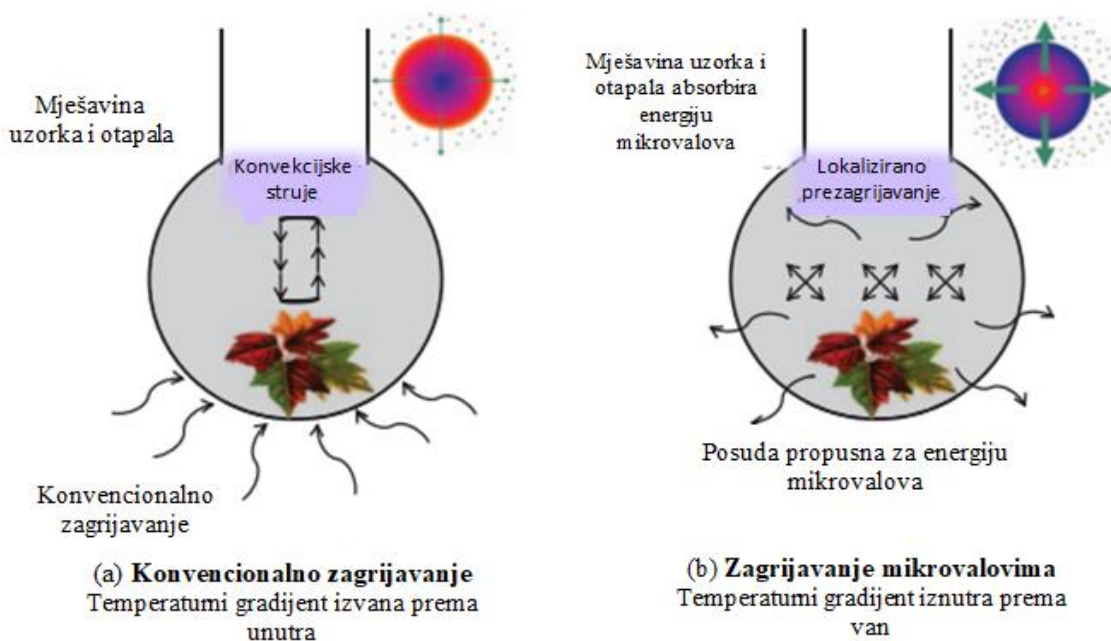
Rotacija dipola povezana je s kretanjem polarnih molekula koje imaju dipolne momente, bilo stalne ili inducirane električnim poljem. Smanjivanje polja uzrokuje toplinski poremećaj pri čemu dolazi do oslobađanja toplinske energije. Na slici 26. prikazano je ponašanje dipolarnih molekula bez električnog polja i pod kontinuiranim ili visokofrekventnim električnim poljem. Što je veći dipolni moment, to je i oscilacija u mikrovalnom polju snažnija. Rotacija dipola dovodi do narušavanja vodikovih veza. Na rotaciju molekula utječe i viskoznost medija. Što je viskoznost medija veća, opisani mehanizam je slabiji. [12]



**Slika 26.** Ponašanje dipolarnih molekula bez električnog polja (a), pod kontinuiranim električnim poljem (b) i pod visokofrekventnim električnim poljem [12]

Nastanak topline u uzorku pomoću mikrovalnog polja zahtijeva prisutnost dielektričnog spoja, a oslobađanje topline zapaža se samo ako uzorak ima dielektrične gubitke ili gubitke vodljivosti pod mikrovalnim zračenjem. Ta sposobnost otapala da apsorbira mikrovalnu energiju u toplinsku ovisi o faktoru disipacije ( $\tan \delta$ ). Što je faktor disipacije veći, veća je i toplinska energija. Polarna otapala, kao što je voda, imaju velike dielektrične gubitke te će na njihove dipole utjecati mikrovalovi. S druge strane, nepolarna otapala, npr. heksan, neće se zagrijati ako se izlože mikrovalovima pa se zbog toga nazivaju otapalima koja su prozorna za mikrovalove. Dakle, mikrovalno zagrijavanje je selektivno jer se mogu zagrijavati samo polarne molekule. [12]

Na slici 27. vidimo razliku između klasičnog zagrijavanja i zagrijavanja mikrovalovima. Mikrovalno zagrijavanje je volumetrijsko što znači da se cijeli uzorak zagrijava u isto vrijeme. Gradijent temperature obrnut je u usporedbi s konvencionalnim zagrijavanjem jer se zagrijavanje odvija u središtu smjese otapala i matrice, dok se pri konvencionalnom prvo zagrijava površina. Pri mikrovalnom zagrijavanju nema inercije i temperatura brzo postaje homogena u mediju. Temperatura koju otapalo postigne može biti i viša od temperature vrelišta, a objašnjava se nedostatkom mjesta nukleacije. [12]



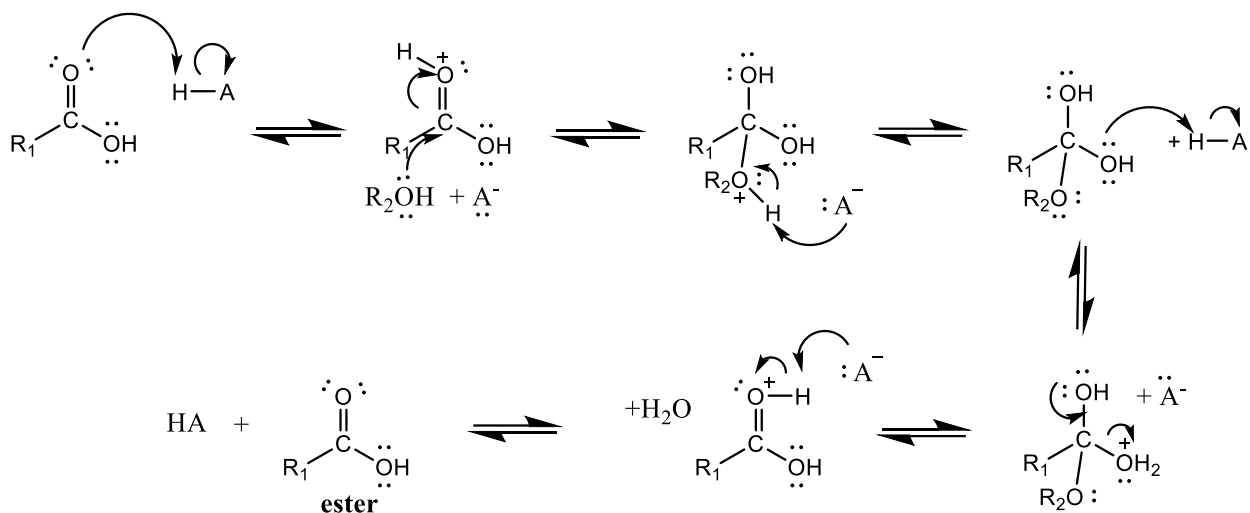
**Slika 27.** Razlika između konvencionalnog zagrijavanja (a) i zagrijavanja mikrovalovima (b)

[12]

### 2.3.2. Esterifikacija i hidroliza estera

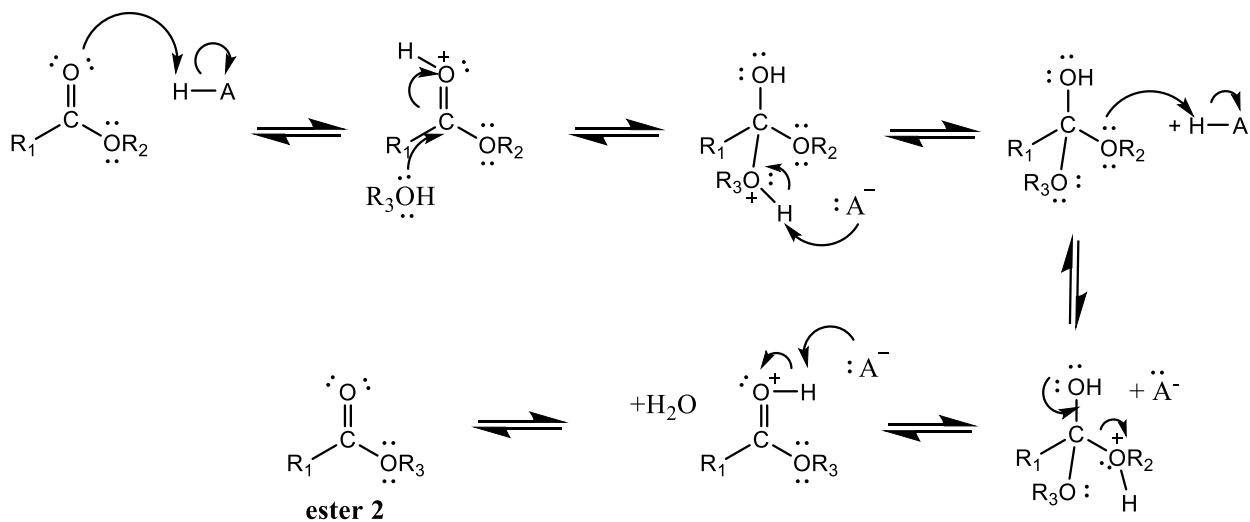
Nakon ekstrakcije triacilglicerola iz uzorka, provedene su reakcije hidrolize i esterifikacije. Hidrolizom masti i ulja nastaju masne kiseline koje se zatim prevode u pogodan oblik za analizu plinskom kromatografijom, a to su metilni esteri masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Methyl Ester Methode*, FAME).

Karboksilne kiseline mogu se esterificirati alkoholima u prisutnosti prikladnog kiselog katalizatora. Mehanizam Fisherove esterifikacije prikazan je na slici 28. Početni korak je protoniranje karbonilnog kisika karboksilne kiseline kako bi se povećala njena elektrofilnost. Zatim slijedi nukleofilna adicija alkohola i nastanak međuprodukta. Naredne reakcije deprotoniranja i protoniranja dovode do izdvajanja dobre odlazeće skupine ( $H_2O$ ) i nastanka estera. Svaki korak je reverzibilan, ali u prisutnosti velikog viška alkohola, ravnoteža reakcije se pomiče udesno kako bi iskorištenje reakcije bilo veće, dok u prisutnosti vode, koja je snažniji elektron donor od alifatskih alkohola, formiranje međuprodukta (2) nije favorizirano i povratna reakcija hidrolize je vjerojatnija. [13]



**Slika 28.** Mehanizam Fisherove esterifikacije

Transesterifikacija je reakcija zamjene alkilne skupine vezane na atom kisika estera s alkilnom skupinom alkohola. Reakcija zahtijeva kisele ili bazične katalizatore zbog snižavanja aktivacijske energije. Na slici 29. je prikazan mehanizam transesterifikacije katalizirane odgovarajućom kiselinom.



**Slika 29.** Mehanizam transesterifikacije kataliziran odgovarajućom kiselinom

### 2.3.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je analitička tehnika separacije gdje se tvar raspoređuje između dviju faza koje se ne smiju međusobno miješati. Specifično za ovu metodu je to da je pokretna ili mobilna faza plin, a kreće se kroz ili preko stacionarne ili nepokretne faze koja ispunjava kolonu. Prednost plinske kromatografije leži u tome da se mogu

analizirati i tvari koje su hlapljive. Mehanizam GC-a temelji se na adsorpciji, masenoj distribuciji ili isključivo po veličini. [14]

Kada je riječ o plinskoj kromatografiji, podrazumijeva se da je riječ o plinsko-tekućinskoj kromatografiji (engl. *Gas-Liquid Chromatography*, GLC) čiji je temelj razdjeljivanje tvari između mobilne plinovite i stacionarne tekuće faze. Analizirani spojevi se prevode u plinoviti oblik i eluiraju mobilnom fazom (plinom) kroz kolonu pri čemu je mobilna faza nosač i ne stvaraju se interakcije s analitom. [14]

Kod plinsko-adsorpcijske kromatografije (engl. *Gas-Solid Chromatography*, GSC) odvija se adsorpcijsko-desorpcijski proces između stacionarne i mobilne faze. Najčešće stacionarne faze su anorganski adsorbensi (molekularna sita, porozni polimeri, silikagel i dr.). Prednosti ove tehnike u odnosu na GLC su: široki radni temperaturni intervali, brza uspostava ravnoteže i stabilnost bazne linije, dok su nedostaci: linearno područje adsorpcijske izoterme je usko pa se javljaju asimetrični pikovi, adsorpcijske medije je teško standardizirati pa im je ograničena primjena, vremena zadržavanja su duga zbog velikih adsorpcijskih entalpija, katalitičke aktivnosti i heterogene površine većine adsorbenasa. GSC se koristi za separaciju plinova koji imaju niska vrelišta ( $H_2$ ,  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CH_4$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ , inertni plinovi) i za analizu plinova u zraku. [14]

Sustavi za plinsku kromatografiju razlikuju se po plinu nosaču, sustavu injektiranja, vrsti kolona i detektorima. Za plinove nosače najčešće se koriste helij, argon, ugljikov dioksid i vodik, a njihov protok mora biti konstantan. Uzorci za analizu se injektiraju u sustav preko injektora u struju plina nosača gdje dolazi do isparavanja tvari i nju zatim plin nosač odvodi u kolonu. Obično je temperatura sustava za evaporaciju  $50\text{ }^\circ\text{C}$  iznad temperature vrelišta najteže isparljive tvari u uzorku. [14]

Kolone se mogu razlikovati po duljini i promjeru te su punjene ili kapilarne. Kod punjenih je kolona, na granuliranoj podlozi imobilizirana stacionarna faza, a najčešći nosači kod takvih kolona su dijatomejske zemlje. Za kapilarne kolone je karakteristično da su to silikonske cijevi kod kojih je unutarnja stijenka kapilare presvučena tankim slojem tekuće stacionarne faze. Stijenka može biti presvučena preko tankog sloja poroznog nosača ili izravno. Kapilarne kolone su duže od punjenih. [14]

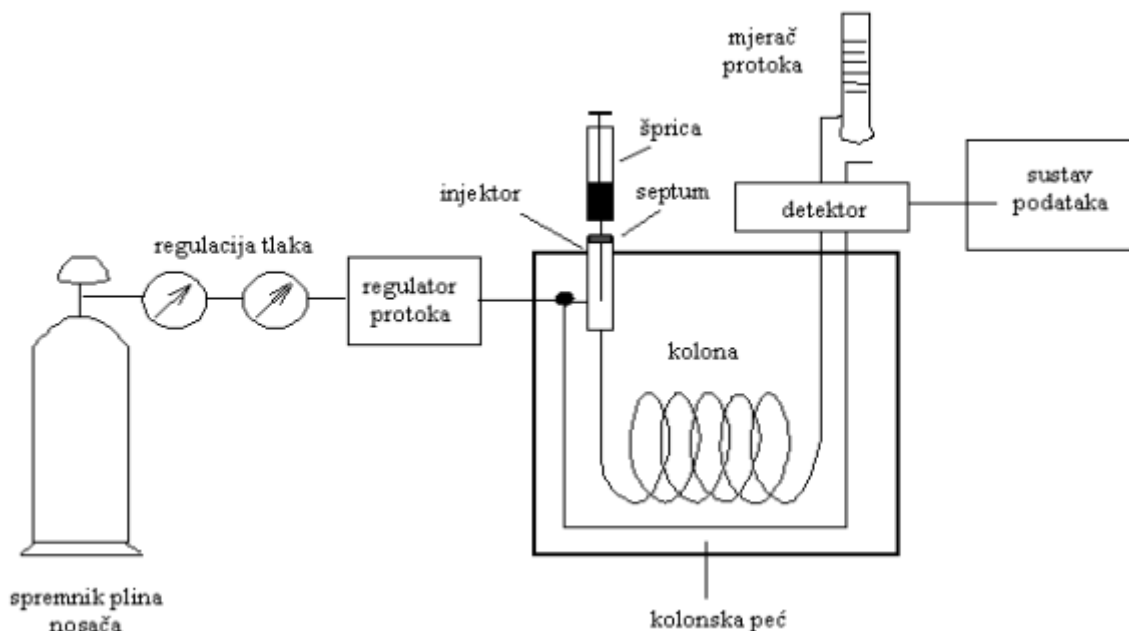
Detektori omogućavaju selektivno i osjetljivo dokazivanje. Najčešći detektori su: detektor apsorpcije elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD), plamenoionizacijski detektor

(engl. *Flame Ionization Detector*, FID) i detektor termičke vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD), a mogu se koristiti i termionski detektori i spektroskopski detektori. [14]

Za stacionarne faze, tekućine koje se koriste moraju biti kemijski i termički stabilne, niske isparljivosti, dok im temperatura vrelišta im mora biti za oko 100 °C više od temperature kolone. Polarne stacionarne faze koje se koriste trebaju imati neke od sljedeće nabrojanih funkcionalnih skupina: -CN, -OH, C=O, poli- ili trifluoroesterske skupine. Nabrojane funkcionalne skupine su pokazale selektivnost za organske kiseline, amine i alkohole. Nepolarne stacionarne faze koje se koriste su uglavnom ugljikovodici i siloksani koji su se pokazali pogodnima za odjeljivanje halogeniranih ili zasićenih ugljikovodika. Uvođenjem pogodnih supstituenata, mijenja se selektivnost tekuće stacionarne faze. [14]

Kod izotermne plinske kromatografije je temperatura kolone konstantna, a takvo odjeljivanje se koristi ako se odjeljuju spojevi ograničenog područja vrelišta. Ako se analizira smjesa čiji sastojci imaju široko područje vrelišta, potrebno je provesti temperaturno programiranu plinsku kromatografiju gdje se temperatura povećava za vrijeme analize stupnjevito ili kontinuirano bez da se narušavaju granice dokazivanja i preciznost mjerenja pika. [14]

Na slici 30. vidljiv je shematski prikaz sustava za plinsku kromatografiju.



**Slika 30.** Shematski prikaz sustava za plinsku kromatografiju [14]

Glavne komponente sustava za plinsku kromatografiju su: sustav za dopremanje plinova, injektor, kolona, pećnica, detektor i sustav za obrađivanje podataka. Integralni dijelovi su: injektor, pećnica i detektor, dok odvojeno djeluju sustav za dopremanje plinova, kolona i sustav za obradu podataka. [14]

Plinovima je potrebno prije ulaska u sam instrument regulirati tlak te ih se filtrira kako bi se osigurao visok stupanj čistoće. Zadaća regulatora tlaka koji se nalaze na spremnicima ili generatorima plina je kontroliranje količine plina koja se dostavlja do plinskog kromatografa. Zadatak tlačnih regulatora koji su na uređaju jest kontrola protoka plina nakon ulaska u instrument. [14]

Uzorak se unosi u instrument tako da se injektira na zagrijani injektorski blok pri čemu uzorak isparava. Komponente uzorka koje su hlapljive prelaze u paru te se miješaju s plinom nosačem koji ih nosi na kolonu gdje se odvija odjeljivanje. [14]

Postoji više vrsta injektora, neki od njih su:

- *Split/splitless* – kod *split* injektora, injektor dijeli volumen uzorka na 2 dijela koja nisu jednaka te samo manji volumen ulazi u kolonu kako bi se spriječilo prekapacitiranje kolone; *splitless* injektor ne dijele uzorak na 2 dijela, nego cijeli volumen uzorka prenose u kolonu pa su prikladni za analizu elemenata u tragovima;
- *Programmed Thermal Vaporizing* (PTV) – vrsta injektora kod kojih se postupno podiže temperatura pri čemu komponente s nižim vrelištimama isparavaju i ispuštaju se kroz ventil zbog čega ne ulaze u kolonu;
- *Cool-on-column* (COC) – injektor uvodi termalno manje stabilne uzorke u tekućem stanju, bitno je da je velika razlika u temperaturama vrelišta komponenata uzorka. [14]

Injektori se razlikuju u po tehnici injektiranja uzorka u sustav. Postoje tehnike injektiranja sa i bez brizgalice. [14]

Kada uzorak uđe u kolonu, njegove komponente nosi inertni plin te one stvaraju interakcije sa stacionarnom fazom. Komponente se razdvajaju između mobilne i stacionarne faze, a stupanj razdjeljivanja ovisan je o kemijskom afinitetu analita za nepokretnu fazu kao i o tlaku para analita koji je ovisan o temperaturi kolone. Komponente uzorka sa slabijim afinitetom za nepokretnu fazu kreću se brže kroz kolonu te stižu prije do detektora. Kolona se nalazi u pećnici koja kontrolira temperaturu kolone. Vrijeme zadržavanja komponente ovisi o veličini kolone (duljina i promjer) te o kemijskoj strukturi i debljini sloja stacionarne faze. [14]

Nakon što je izašao iz kolone, analit je dalje nošen inertnim plinom do detektora. Detektor reagira na neko određeno kemijsko i/ili fizikalno svojstvo analita, umnoža odgovor te stvara elektronički signal koji je proporcionalan količini analita. Taj signal se zatim šalje u sustav za obrađivanje podataka gdje uređaj za snimanje signala prikaže intenzitet odgovora detektora ovisno o vremenu koje je potrebno da bi uzorak došao do instrumenta nakon što je injektiran. Ono što se dobije je serija pikova, tj. kromatogram kojeg vidimo na računalu. [14]

### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Kemikalije

Soxhlet ekstrakcija: - petroleter 40-65 °C (Carlo Erba, Italija)

Ekstrakcija mikrovalovima: - metanol (J.T. Baker, Nizozemska),

- kalijev hidroksid (T.T.T., Hrvatska),
- otopina za metilaciju,
- pentan (Carlo Erba, Francuska),
- natrijev klorid (Gram-mol, Hrvatska),
- bezvodni natrijev sulfat (T.T.T., Hrvatska).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom: - petroleter 40-65 °C (Carlo Erba, Italija)

Priprema metilnih estera masnih kiselina: - borov trifluorid (BF<sub>3</sub>), 12 % otopina u metanolu

(AcrosOrganics, Belgija),

- metanol (J.T. Baker, Nizozemska),
- n-heksan (Carlo Erba, Francuska),
- natrijev klorid (Gram-mol, Hrvatska),
- natrijev hidroksid (T.T.T., Hrvatska),
- bezvodni natrijev sulfat (T.T.T., Hrvatska).



### 3.2. Pribor i instrumentacija

- vaga
- aparatura za Soxhlet ekstrakciju
- rotacijski uparivač (BUCHI, Rotavapor R-300)
- ultrazvučna kada (BANDELIN, SONOREX)
- ultrazvučna sonda (BANDELIN, SONOPLUS)
- mikrovalna pećnica (ONE TOUCH, MARS 6)
- aparatura za pripremu uzoraka za analizu profila masnih kiselina
- sušionik (ST-05, Instrumentaria)
- uređaj za plinsku kromatografiju (SCION 436 GC)

### 3.3. Odabir uzoraka za analizu

Uzorci za analizu odabrani su prema sastavu hrane i prikazani su u tablici 8. Uzorci hrane prikupljeni su u suradnji sa Fakultetom agrobiotehničkih znanosti Osijek.

**Tablica 8.** Uzorci hrane za nesilice odabrani za analizu

Oznaka uzorka hrane za nesilice	Sastav hrane
H1	Hrana dostupna na tržištu
H2	Hrana dostupna na tržištu
H3	Hrana dostupna na tržištu
H4	Hrana s dodatkom ribljeg, repičinog i lanenog ulja te drugih nutricina
H5	Hrana s dodatkom ribljeg i sojinog ulja (omjer ulja 1) te drugih nutricina
H6	Hrana s dodatkom ribljeg i sojinog ulja (omjer ulja 2) te drugih nutricina

### 3.4. Priprema uzoraka za analizu

Prvi korak analize je ekstrakcija lipida iz uzoraka. U ovom istraživanju radili smo ekstrakcije pomoću 4 metode, od toga su 2 standardne i 2 nestandardne metode. Standardne metode su ekstrakcija Soxhlet metodom i mikrovalna ekstrakcija, a nestandardne direktna i indirektna ultrazvučna ekstrakcija. Standardnim metodama pripremali smo 6 uzoraka, dok smo nestandardnim metodama pripremali za svih 6 uzoraka paralelni uzorak.

### 3.4.1. Ekstrakcija

#### 3.4.1.1. Soxhlet ekstrakcija

Aparatura za Soxhlet ekstrakciju prikazana je na slici 31. U tuljcu napravljenom od filter papira odvagano je 5 g hrane i tuljac je stavljen u posudu za ekstrakciju. U tikvicu je sipano 150 mL petroletera. Temperature vodene kupelji održavana je na 60 °C.



**Slika 31.** Aparatura za ekstrakciju Soxhlet metodom

Nakon 4 sata zagrijavanja, otapalo je upareno pomoću rotavapora pod sniženim tlakom (slika 32.). Eventualni ostaci vode uklonjeni su sušenjem u sušioniku na 102 °C do stalne mase (slika 33.).



**Slika 32.** Uparavanje uzorka na rotacijskom uparivaču



**Slika 33.** Sušionik

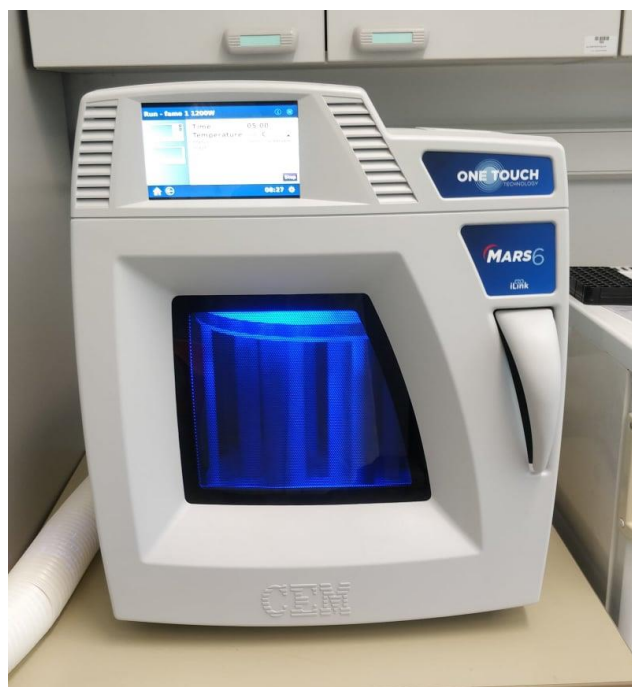
#### 3.4.1.2. Ekstrakcija mikrovalovima

Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju prikazan je na slici 34. Postupak ekstrakcije i cijele pripreme uzoraka za određivanje profila masnih kiselina ranije je opisan. [15]



**Slika 34.** Pravilno poslagani uzorci za mikrovalnu ekstrakciju

Odvagano je 0,5 g suhog uzorka hrane u kivetu posebno namijenjenoj korištenju pri mikrovalnoj ekstrakciji. U kivetu se doda 10 mL metanolne otopine kalijevog hidroksida u miješaće tijelo te se kiveta zatvori, uloži u omotač izrađen od kevlara i smjesti u nosač u mikrovalnoj pećnici (slika 35.).

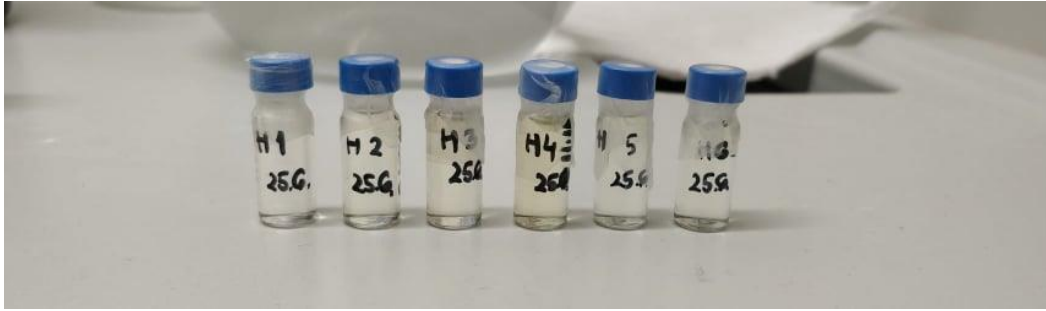


**Slika 35.** Zagrijavanje uzoraka u mikrovalnoj pećnici

Uzorak se 10 minuta zagrijava na 90 °C. Nakon zagrijavanja, kivete se vade iz nosača, uklanja se omotač i hlade u ledenoj vodi do temperature od oko 30 °C. U kivete se potom doda 15 mL otopine za metilaciju, ponovo se omataju omotačem i smještaju u nosač u mikrovalnoj pećnici te se zagrijava 6 minuta na 120 °C. Kivete se ponovo hlade do sobne temperature, dodaje se 10 mL pentana, kivete se zatvore i smjesa se izmiješa laganim okretanjem kivete naopako. Potom se doda zasićena vodena otopina natrijevog klorida dok sloj pentana ne dođe do navoja na kiveti (slika 36.). Uzme se nekoliko mililitara pentanskog sloja, prenese u staklenu vijalicu u koju se stavi manja količina bezvodnog natrijevog sulfata. Oprezno se u vijalicu za GC analizu prenese tako pripremljen uzorak (slika 37.).



**Slika 36.** Nastanak organskog (gore) i vodenog (dolje) sloja



**Slika 37.** Uzorci pripremljeni mikrovalnom ekstrakcijom spremni za analizu plinskom kromatografijom

### 3.4.1.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom rađena je na dva načina: direktnom ekstrakcijom i indirektnom ekstrakcijom.

Uređaj za indirektnu ekstrakciju ultrazvukom sa uzorcima prikazan je na slici 38. U Elenmayerovu tikvicu od 100 mL odvagano je 5 g uzorka hrane, dodano je 100 mL petroletera. Uzorak je smješten u vodenu kupelj i ekstrakcija je trajala 2 sata uz kontrolu temperature (temperatura nije prelazila 35 °C). Nakon ekstrakcije, otapalo i eventualni ostaci vode uklonjeni su kao i nakon Soxhlet ekstrakcije.



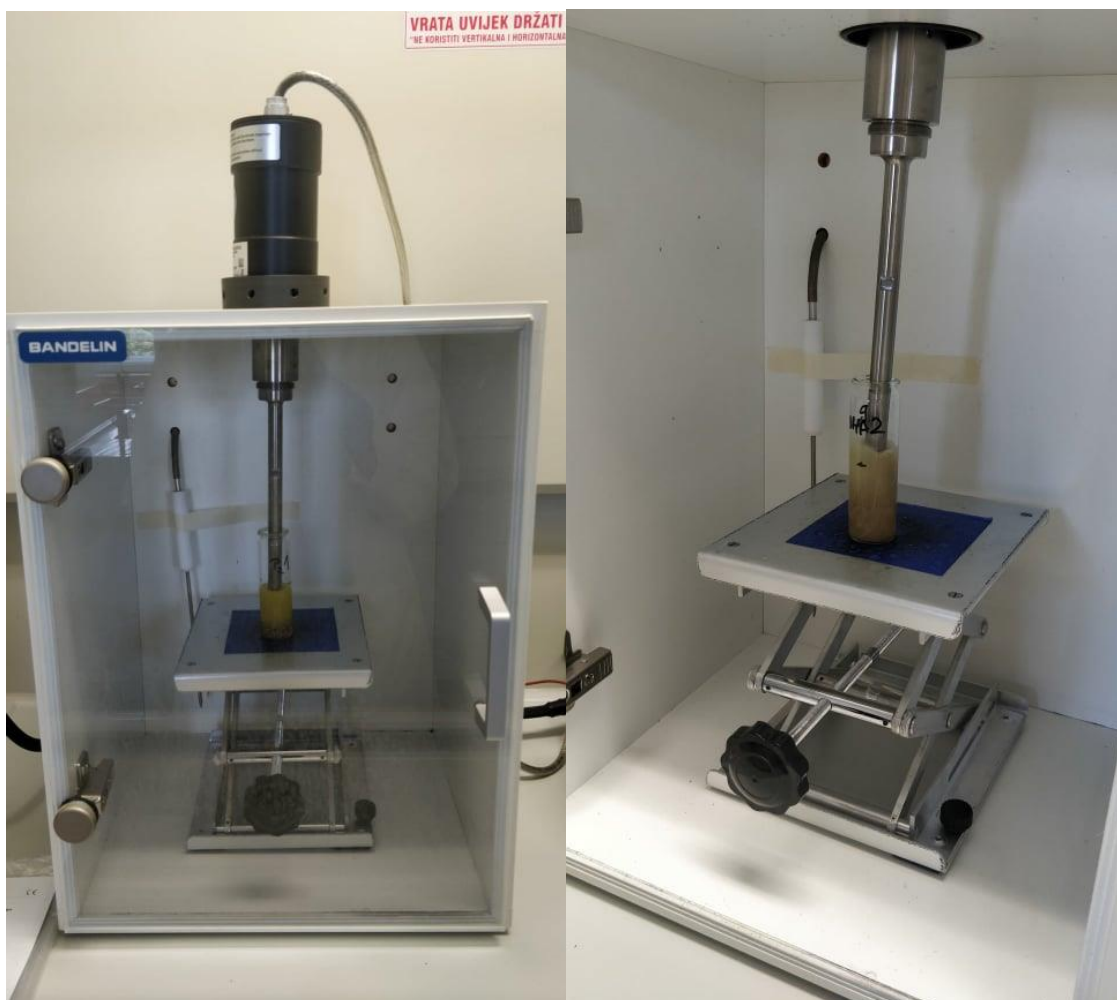
**Slika 38.** Indirektna ultrazvučna ekstrakcija uzoraka

Uređaj za direktnu ekstrakciju prikazan je slici 39. Za analizu je u kivete za centrifugu odvagano 5 g uzorka hrane i dodano je 25 mL petroletera.

### Parametri za direktnu ekstrakciju ultrazvukom:

- Uređaj: Sonoplus 3100 (Bandelin)
- Sonda: VS 70 T (Bandelin)
- Amplituda: 70 %
- Interval ultrazvuka: 3 s
- Interval pauze: 2 s
- Ukupno vrijeme: 10 min.

Nakon ekstrakcije, otapalo i eventualni ostaci vode uklonjeni su kao kod i nakon Soxhlet ekstrakcije.



**Slika 39.** Direktna ultrazvučna ekstrakcija uzorka

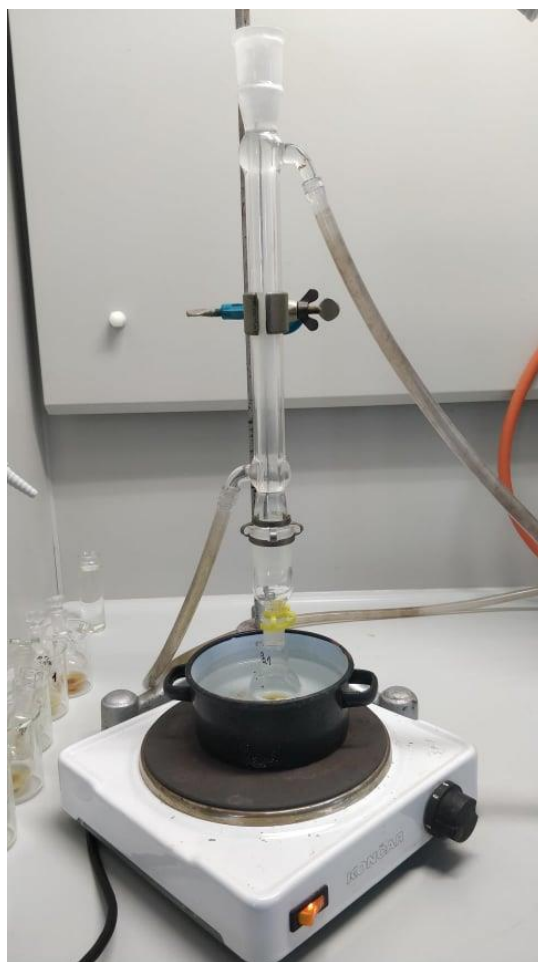
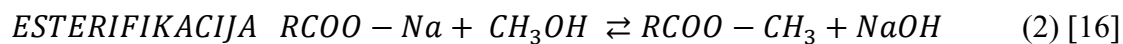
### **3.4.2. Priprema metilnih estera masnih kiselina**

Nakon Soxhlet ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom te uklanjanja ostatka otapala, metilni esteri masnih kiselina pripremljeni su uz borov trifluorid ( $\text{BF}_3$ ) u metanolu kao

katalizatorom (slika 40.). U tikvicu s uzorkom doda se 4 mL 0,5 M otopine natrijevog hidroksida u metanolu i tikvica se stavi na refluks do nestanka masnih kapljica (jednadžba 1).



Kada su masne kapljice nestale, preko hladila se doda 4 mL metanolne otopine  $\text{BF}_3$  i smjesa se zagrijava 3 minute (jednadžba 2), potom se doda 4 mL n-heksana i smjesa se zagrijava još 1 minutu.



**Slika 40.** Aparatura za hidrolizu i esterifikaciju

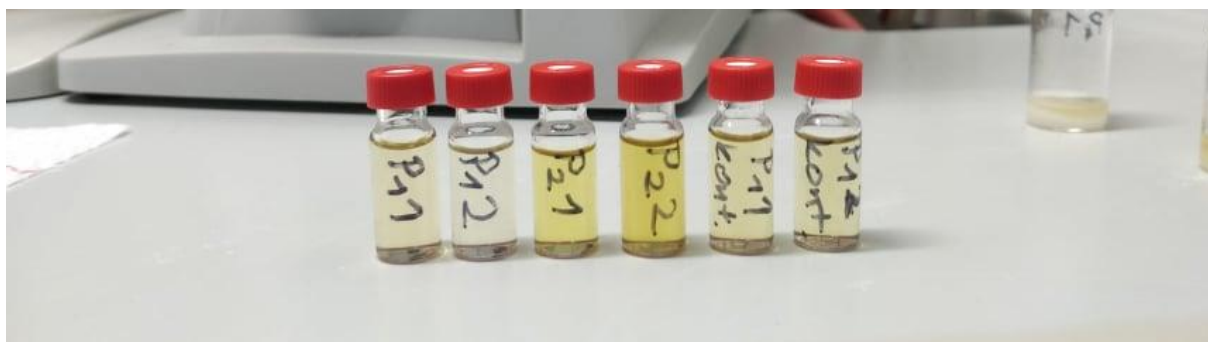
U tikvicu se doda zasićena otopina  $\text{NaCl}$  kako bi se razina organskog sloja podigla do grla tikvice (slika 41.).





**Slika 41.** Nastanak organskog (gore) i vodenog (dolje) sloja

Alikvot gornjeg sloja se prenese u suhu i čistu bočicu u koju se doda bezvodni  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  kako bi se uklonila zaostala voda. Nakon ovog koraka uzorak je spreman za analizu na plinskom kromatografu (slika 42.).



**Slika 42.** Uzorci pripremljeni hidrolizom i esterifikacijom spremni za analizu plinskom kromatografijom

### 3.4.3. Plinska kromatografija

Profil masnih kiselina analiziran je plinskom kromatografijom na uređaju SCION 436 GC (slika 43.), s kapilarnom kolonom FAMEWAX (RESTEK, Bellefonte, USA) duljine 30 m x 0,32 mm unutrašnjim promjerom i filmom 0,25  $\mu\text{m}$ , uz plameno ionizacijski detektor (engl. *flame ionisation detector*, FID). Temperatura injektora: 230 °C, temperatura detektora: 230 °C, protok vodika: 25 mL/min. Temperatura pećnice postavljena je prema temperaturnom programu: 50 – 160 °C/ 20 °C u minuti te 160-225 °C/ 10 °C u minuti i zadržano na 225 °C tokom 9 minuta. Ukupno vrijeme trajanja analize je 21 minuta. Za identifikaciju pojedinih masnih kiselina, korištena je mješavina standarda masnih kiselina (Supelco 37 Component FAME Mix).

Količina pojedinih masnih kiselina izražena je u postocima u odnosu na ukupnu količinu prisutnih masnih kiselina. [17]



**Slika 43.** Plinski kromatograf na kojem su analizirani uzorci hrane

#### **4. Rezultati i rasprava**

Nakon Soxhlet ekstrakcije i ekstrakcije ultrazvukom, uzorci su stavljeni u sušionik kako bi se uklonila zaostala voda te se odredio sadržaj masti u uzorku. Rezultat je izražen kao postotak odvagane mase uzorka za analizu. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 9.

**Tablica 9.** Usporedba postotka masnoće u uzorcima hrane nakon Soxhlet ekstrakcije te nakon ekstrakcije ultrazvukom.

Uzorak	Soxhlet	UZV ekstrakcija		
		% masnoće u uzorcima		Direktna
		Indirektna		
H1	3,72	1	5,64	4,76
		2	5,94	3,84
H2	5,86	1	5,96	4,54
		2	5,90	3,82
H3	5,76	1	5,78	3,74
		2	5,92	4,40
H4	7,92	1	6,34	4,30
		2	6,46	4,26
H5	5,30	1	5,14	4,32
		2	5,26	3,62
H6	5,58	1	5,50	3,74
		2	5,50	4,40

Najveći postotak masnoće u uzorcima određen je u uzorku H4 nakon Soxhlet ekstrakcije (7,92 %) što je očekivano s obzirom na sastav uzorka. Uspoređujući postotke masnoće, Soxhlet ekstrakcija i indirektna ultrazvučna ekstrakcija dale su slične rezultate, dok su nešto niži postoci određeni direktnom ultrazvučnom ekstrakcijom.

#### 4.1. Rezultati analize plinskom kromatografijom

Nakon ekstrakcije, uzorci su analizirani pomoću plinske kromatografije prema ranije opisanom postupku. Detaljni rezultati analiza prikazani su u tablicama 10., 11., 12. i 13. U tablicama su rezultati prikazani kao postotak u odnosu na ukupno određene masne kiseline. Pregledom tablica može se uočiti da je najviše masnih kiselina određeno u uzorcima pripremljenim ultrazvučnom ekstrakcijom (direktnom i indirektnom), nešto manji broj masnih kiselina određen je u uzorcima pripremljenim Soxhlet ekstrakcijom dok je najmanji broj određen u uzorcima pripremljenim mikrovalnom ekstrakcijom. U tablici 14 prikazana je usporedba svih ekstrakcija i određenog broja masnih kiselina te su navedene određene značajne masne kiseline i raspon njihovih udjela u uzorku. Ponovno su se direktna i indirektna ultrazvučna ekstrakcija pokazale kao najuspješnije jer su u svim skupinama masnih kiselina određene značajne masne kiseline. Kod Soxhlet ekstrakcije, iako je po broju ukupno određenih masnih kiselina bolja od mikrovalne ekstrakcije, nije određena ni jedna masna kiselina iz skupine PUFA n-3 dok su kod mikrovalne ekstrakcije određene tri značajne masne kiseline koliko je određeno i ultrazvučnom ekstrakcijom. Soxhlet ekstrakcijom određena je jedna SFA više nego kod mikrovalne ekstrakcije.

**Tablica 10.** Rezultati analize plinskom kromatografijom uzoraka pripremljenih Soxhlet ekstrakcijom

SOXHLET EKSTRAKCIJA						
Uzorak	H1	H2	H3	H4	H5	H6
<b>MK</b>	<b>% masne kiseline (w/w uzorka)</b>					
C6:0	1,146	0,555	0,981	0,455	1,137	0,616
C8:0	1,756	0,930	1,842	0,732	1,586	1,090
C10:0	0,161	0,192	0,179	0,144	0,209	0,171
C12:0	0,174	0,245	0,134	0,139	0,187	0,181
C14:0	0,582	3,434	0,255	2,872	1,025	3,065
C15:0	0,053	0,544	0,067	0,331	0,181	0,494
C16:0	32,353	28,391	32,516	23,763	34,472	33,013
C17:0	0,224	0,588	0,218	0,330	0,348	0,572
C18:0	12,913	9,728	12,646	7,714	12,794	10,339
C20:0	1,094	1,193	1,073	0,927	1,118	0,928
C22:0	1,018	0,745	0,974	0,553	1,024	0,791
<b>∑SFA</b>	<b>51,472</b>	<b>46,545</b>	<b>50,884</b>	<b>37,959</b>	<b>54,079</b>	<b>51,262</b>
C16:1	0,191	1,932	0,198	1,376	0,666	2,140
C18:1 cis+trans	41,102	48,258	41,878	55,361	41,307	34,624
C20:1	0,225	2,020	0,242	3,209	0,421	0,830
<b>∑MUFA</b>	<b>41,517</b>	<b>52,210</b>	<b>42,317</b>	<b>59,946</b>	<b>42,395</b>	<b>37,593</b>
C18:2 n-6 cis	7,011	1,245	6,799	2,094	3,527	11,144
<b>∑n-6 PUFA</b>	<b>7,011</b>	<b>1,245</b>	<b>6,799</b>	<b>2,094</b>	<b>3,527</b>	<b>11,144</b>

**Tablica 11.** Rezultati analize plinskom kromatografijom uzoraka pripremljenih mikrovalnom ekstrakcijom

MIKROVALNA EKSTRAKCIJA						
uzorak	H1	H2	H3	H4	H5	H6
<b>MK</b>	<b>% masne kiseline (w/w uzorka)</b>					
C14:0	0,039	0,889	0,087	0,916	0,269	1,068
C16:0	11,689	10,736	11,890	10,168	11,984	14,449
C18:0	4,781	4,127	4,982	3,859	4,854	4,661
<b>∑SFA</b>	<b>16,509</b>	<b>15,752</b>	<b>16,960</b>	<b>14,943</b>	<b>17,107</b>	<b>20,179</b>
C16:1	0,219	0,814	0,108	0,667	0,290	1,030
C18:1 cis+trans	23,806	28,500	23,826	30,974	23,828	22,516
C20:1	0,175	1,093	0,212	2,071	0,364	0,642
<b>∑MUFA</b>	<b>24,200</b>	<b>30,407</b>	<b>24,146</b>	<b>33,711</b>	<b>24,481</b>	<b>24,188</b>
C18:2 n-6 cis	53,673	29,682	53,599	29,969	51,649	45,814
<b>∑n-6 PUFA</b>	<b>53,673</b>	<b>29,682</b>	<b>53,599</b>	<b>29,969</b>	<b>51,649</b>	<b>45,814</b>
C18:3 n-3	5,314	17,268	5,295	17,137	5,305	4,056
C20:5 n-3	0,304	1,939	/	1,413	0,472	1,661
C22:6 n-3	/	4,952	/	2,827	0,986	4,103
<b>∑n-3 PUFA</b>	<b>5,618</b>	<b>24,159</b>	<b>5,295</b>	<b>21,377</b>	<b>6,763</b>	<b>9,819</b>

**Tablica 12.** Rezultati analize plinskom kromatografijom uzoraka pripremljenih indirektnom ultrazvučnom ekstrakcijom

INDIREKTNA ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA												
UZORAK	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<b>MK</b>	<b>% masne kiseline (w/w uzorka)</b>											
C6:0	0,051	0,019	0,017	0,025	0,173	0,149	0,037	0,025	0,089	0,059	0,078	0,068
C8:0	0,079	0,047	0,059	0,075	0,155	0,120	0,108	0,063	0,091	0,075	0,092	0,082
C10:0	0,049	0,042	0,052	0,055	0,067	0,064	0,083	0,052	0,054	0,050	0,068	0,063
C12:0	0,072	0,065	0,091	0,102	0,065	0,065	0,109	0,078	0,067	0,062	0,091	0,089
C14:0	0,073	0,070	1,300	1,358	0,106	0,106	1,462	1,309	0,379	0,365	1,430	1,396
C15:0	0,019	0,017	0,204	0,211	0,026	0,025	0,162	0,148	0,066	0,063	0,230	0,226
C16:0	12,583	11,874	11,710	12,379	14,321	13,926	12,130	11,186	13,245	12,645	15,919	15,507
C17:0	0,094	0,088	0,244	0,252	0,106	0,101	0,167	0,159	0,135	0,128	0,281	0,278
C18:0	4,911	4,607	3,882	4,122	5,440	5,182	3,872	3,544	4,788	4,513	4,821	4,795
C20:0	0,415	0,390	0,443	0,456	0,471	0,451	0,394	0,378	0,425	0,405	0,443	0,436
C22:0	0,845	0,611	0,426	0,409	1,247	1,042	0,312	0,320	0,594	0,524	0,522	0,549
C24:0	0,154	0,151	0,161	0,167	0,191	0,181	0,185	0,156	0,165	0,156	0,164	0,158
<b>ΣSFA</b>	<b>19,344</b>	<b>17,979</b>	<b>18,590</b>	<b>19,611</b>	<b>22,367</b>	<b>21,412</b>	<b>19,020</b>	<b>17,418</b>	<b>20,098</b>	<b>19,044</b>	<b>24,138</b>	<b>23,649</b>
C16:1	0,103	0,098	1,073	1,110	0,119	0,114	0,938	0,869	0,368	0,359	1,340	1,328
C18:1 cis+trans	26,285	25,150	32,318	29,626	25,262	24,632	31,130	34,764	26,259	25,572	21,393	21,824
C20:1	0,142	0,150	0,999	0,959	0,166	0,165	1,978	2,023	0,287	0,298	0,700	0,730
C24:1	/	/	0,253	0,263	/	/	0,298	0,273	0,055	0,062	0,223	0,230
<b>ΣMUFA</b>	<b>26,530</b>	<b>25,398</b>	<b>34,643</b>	<b>31,959</b>	<b>25,547</b>	<b>24,911</b>	<b>34,345</b>	<b>37,929</b>	<b>26,969</b>	<b>26,291</b>	<b>23,656</b>	<b>24,112</b>
C18:2 n-6 cis	49,047	50,974	25,918	27,437	47,575	48,750	25,812	24,827	46,801	48,244	43,134	42,954
C20:2 n-6	0,244	0,364	0,233	0,216	0,313	0,428	0,121	0,113	0,168	0,108	0,195	0,158
C20:4 n-6	/	/	0,238	0,231	/	/	0,091	0,096	0,023	0,026	0,163	0,168
<b>Σn-6 PUFA</b>	<b>49,291</b>	<b>51,338</b>	<b>26,389</b>	<b>27,884</b>	<b>47,887</b>	<b>49,177</b>	<b>26,024</b>	<b>25,036</b>	<b>46,992</b>	<b>48,378</b>	<b>43,492</b>	<b>43,280</b>
C18:3 n-3	4,601	5,161	16,080	16,380	3,886	4,185	17,625	16,561	4,827	5,118	3,912	3,986
C20:5 n-3	0,234	0,124	1,429	1,420	0,313	0,315	1,150	1,140	0,480	0,461	1,635	1,627
C22:6 n-3	/	/	2,870	2,746	/	/	1,836	1,916	0,633	0,708	3,166	3,345
<b>Σn-3 PUFA</b>	<b>4,835</b>	<b>5,285</b>	<b>20,378</b>	<b>20,546</b>	<b>4,198</b>	<b>4,500</b>	<b>20,611</b>	<b>19,618</b>	<b>5,941</b>	<b>6,287</b>	<b>8,713</b>	<b>8,959</b>

**Tablica 13.** Rezultati analize plinskom kromatografijom uzoraka pripremljenih direktnom ultrazvučnom ekstrakcijom

DIREKTNA ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA												
UZORAK	H1		H2		H3		H4		H5		H6	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<b>MK</b>	<b>% masne kiseline (w/w uzorka)</b>											
C6:0	0,012	0,014	0,009	0,007	0,047	0,055	0,016	0,048	0,049	0,048	0,063	0,055
C8:0	0,038	0,041	0,041	0,041	0,060	0,062	0,048	0,093	0,061	0,059	0,074	0,070
C10:0	0,037	0,041	0,046	0,045	0,045	0,047	0,046	0,059	0,050	0,051	0,061	0,060
C12:0	0,164	0,090	0,093	0,088	0,052	0,054	0,071	0,087	0,065	0,069	0,093	0,083
C14:0	0,069	0,071	1,337	1,263	0,096	0,093	1,326	1,534	0,389	0,380	1,488	1,450
C15:0	0,018	0,018	0,212	0,200	0,022	0,022	0,147	0,170	0,068	0,067	0,238	0,231
C16:0	11,879	11,885	11,678	10,866	12,365	12,451	10,732	12,178	12,976	12,920	15,999	15,663
C17:0	0,091	0,090	0,255	0,240	0,095	0,094	0,153	0,175	0,135	0,134	0,288	0,279
C18:0	4,757	4,667	3,976	3,712	4,907	4,901	3,438	3,882	4,811	4,830	5,030	4,884
C20:0	0,400	0,393	0,445	0,415	0,422	0,416	0,348	0,379	0,422	0,423	0,444	0,434
C22:0	0,457	0,443	0,327	0,288	0,486	0,469	0,252	0,359	0,459	0,505	0,551	0,510
C24:0	0,151	0,148	0,156	0,144	0,169	0,167	0,145	0,167	0,166	0,164	0,162	0,164
<b>ΣSFA</b>	<b>18,073</b>	<b>17,901</b>	<b>18,575</b>	<b>17,310</b>	<b>18,766</b>	<b>18,830</b>	<b>16,723</b>	<b>19,130</b>	<b>19,650</b>	<b>19,649</b>	<b>24,491</b>	<b>23,882</b>
C16:1	0,098	0,101	1,130	1,073	0,109	0,107	0,877	0,972	0,380	0,376	1,372	1,343
C18:1 cis+trans	22,407	22,473	28,170	31,076	23,460	23,111	33,826	32,621	23,237	23,165	21,939	21,356
C20:1	0,167	0,164	1,065	1,016	0,192	0,172	1,998	2,083	0,312	0,305	0,686	0,647
C24:1	/	/	0,270	0,263	/	/	0,275	0,320	0,063	0,061	0,244	0,232
<b>ΣMUFA</b>	<b>22,673</b>	<b>22,739</b>	<b>30,635</b>	<b>33,428</b>	<b>23,761</b>	<b>23,390</b>	<b>36,975</b>	<b>35,996</b>	<b>23,992</b>	<b>23,906</b>	<b>24,242</b>	<b>23,578</b>
C18:2 n-6 cis	53,476	53,509	26,301	24,905	51,983	52,263	24,421	24,644	49,506	49,595	42,158	42,960
C20:2 n-6	0,131	0,114	0,156	0,138	0,207	0,234	0,121	0,125	0,141	0,158	0,247	0,288
C20:4 n-6	/	/	0,279	0,279	/	/	0,101	0,090	0,032	0,029	0,137	0,147
<b>Σn-6 PUFA</b>	<b>53,606</b>	<b>53,623</b>	<b>26,736</b>	<b>25,322</b>	<b>52,190</b>	<b>52,498</b>	<b>24,643</b>	<b>24,859</b>	<b>49,680</b>	<b>49,782</b>	<b>42,542</b>	<b>43,394</b>
C18:3 n-3	5,564	5,650	18,594	18,352	5,136	5,137	18,095	17,047	5,455	5,399	3,941	4,044
C20:5 n-3	0,085	0,087	1,729	1,756	0,147	0,145	1,303	1,169	0,516	0,502	1,661	1,730
C22:6 n-3	/	/	3,730	3,832	/	/	2,260	1,800	0,708	0,762	3,122	3,372
<b>Σn-3 PUFA</b>	<b>5,648</b>	<b>5,737</b>	<b>24,054</b>	<b>23,940</b>	<b>5,283</b>	<b>5,282</b>	<b>21,658</b>	<b>20,016</b>	<b>6,678</b>	<b>6,663</b>	<b>8,724</b>	<b>9,146</b>

**Tablica 14.:** Usporedba broja ukupno određenih masnih kiselina te određenih značajnih masnih kiselina prema načinu ekstrakcije

masne		MIKROVALNA EKSTRAKCIJA			SOXHLET EKSTRAKCIJA			INDIREKTNA ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA			DIREKTNA ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA		
kiseline	ukupno određenih MK	značajne MK	% (w/w uzorka)	ukupno određenih MK	značajne MK	% (w/w uzorka)	ukupno određenih MK	značajne MK	% (w/w uzorka)	ukupno određenih MK	značajne MK	% (w/w uzorka)	
SFA	3	/	/	11	C12:0	0,174 – 0,245	12	C12:0	0,062-0,109	12	C12:0	0,052-0,164	
		C14:0	0,039-1,068		C14:0	0,255- 3,434		C14:0	0,070-1,462		C14:0	0,069-1,534	
		C16:0	10,168-14,449		C16:0	23,763-34,472		C16:0	11,710-15,919		C16:0	10,732-15,999	
MUFA	3	C18:1	22,516-30,974	3	C18:1	34,624-55,361	4	C18:1	21,393-34,764	4	C18:1	21,356-33,826	
PUFA	n-3	3	C18:3 n-3	5,305-17,268	/	/	/	3	C18:3 n-3	3,886-17,625	3	C18:3 n-3	3,941-18,594
			C20:5 n-3	0,304-1,939					C20:5 n-3	0,124-1,635		C20:5 n-3	0,085-1,756
			C22:6 n-3	0,986-4,952					C22:6 n-3	0,633-3,345		C22:6 n-3	0,708-3,832
	n-6	1	C18:2 n-6 cis	29,682-53,673	1	C18:2 n-6 cis	1,245-11,144	3	C18:2 n-6 cis	24,827-50,974	3	C18:2 n-6 cis	24,905-53,476
									C20:4 n-6	0,023-0,238		C20:4 n-6	0,029-0,279

\* MK- masne kiseline, SFA – zasićene masne kiseline, MUFA- nezasićene masne kiseline, PUFA- višestruko nezasićene masne kiseline

Usporedbe udjela pojedinih skupina masnih kiselina (SFA, MUFA, PUFA n-3, PUFA n-6) u odnosu na ukupne masne kiseline određene u uzorcima prikazane su u tablicama 15., 16., 17. i 18. U uzorcima koji su ekstrahirani Soxhlet ekstrakcijom najveći udio se odredio za SFA (oko 50 %) i MUFA (37,6-60 %) dok je najmanji udio SFA određen u uzorcima ekstrahiranim mikrovalnom, indirektnom i direktnom ultrazvučnom ekstrakcijom (prosječno 50 % manji).

**Tablica 15.** Usporedba udjela zasićenih masnih kiselina (SFA) u uzorcima prema načinu ekstrakcije

Ekstrakcija	MK	UZORCI					
		H1	H2	H3	H4	H5	H6
MIKROVALNA	$\Sigma$ SFA	16,509	15,752	16,960	14,943	17,107	20,179
SOXHLET	$\Sigma$ SFA	51,472	46,545	50,884	37,959	54,079	51,262
INDIREKTNA UZV	$\Sigma$ SFA	18,661	19,101	21,889	18,219	19,571	23,893
DIREKTNA UZV	$\Sigma$ SFA	17,987	17,942	18,798	17,926	19,650	24,187

**Tablica 16.** Usporedba udjela nezasićenih masnih kiselina (MUFA) u uzorcima prema načinu ekstrakcije

Ekstrakcija	MK	UZORCI					
		H1	H2	H3	H4	H5	H6
MIKROVALNA	$\Sigma$ MUFA	24,200	30,407	24,146	33,711	24,481	24,188
SOXHLET	$\Sigma$ MUFA	41,517	52,210	42,317	59,946	42,395	37,593
INDIREKTNA UZV	$\Sigma$ MUFA	25,964	33,301	25,229	36,137	26,630	23,884
DIREKTNA UZV	$\Sigma$ MUFA	22,706	32,032	23,575	36,485	23,949	23,910

Za razliku od SFA i MUFA, Soxhlet ekstrakcija se pokazala kao manje uspješnom pri ekstrakciji PUFA n-3 gdje je udio ovih masnih kiselina u uzorcima značajno manji dok PUFA n-3 u uzorcima pripremljenim Soxhlet ekstrakcijom uopće nisu određene.



**Tablica 17.** Usporedba udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA n-3) u uzorcima prema načinu ekstrakcije

Ekstrakcija	MK	UZORCI					
		H1	H2	H3	H4	H5	H6
MIKROVALNA	$\sum^{n-6}$ PUFA	53,673	29,682	53,599	29,969	51,649	45,814
SOXHLET	$\sum^{n-6}$ PUFA	7,011	1,245	6,799	2,094	3,527	11,144
INDIREKTNA UZV	$\sum^{n-6}$ PUFA	50,315	27,137	48,532	25,530	47,685	43,386
DIREKTNA UZV	$\sum^{n-6}$ PUFA	53,615	26,029	52,344	24,751	49,731	42,968

**Tablica 18.** Usporedba udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA n-3) u uzorcima prema načinu ekstrakcije

Ekstrakcija	MK	UZORCI					
		H1	H2	H3	H4	H5	H6
MIKROVALNA	$\sum^{n-3}$ PUFA	5,618	24,159	5,295	21,377	6,763	9,819
SOXHLET	$\sum^{n-3}$ PUFA	/	/	/	/	/	/
INDIREKTNA UZV	$\sum^{n-3}$ PUFA	5,060	20,462	4,349	20,115	6,114	8,836
DIREKTNA UZV	$\sum^{n-3}$ PUFA	5,693	23,997	5,283	20,837	6,670	8,935

Soxhlet ekstrakcija je najstarija metoda od svih, u ovom radu, korištenih metoda ekstrakcije. Dugotrajna je i zamorna, koristi velike količine otapala što za sobom povlači problem zbrinjavanja otpadnih kemikalija. Prema rezultatima prikazanim o ovom radu ova ekstrakcija se može smatrati uspješnom. Ekstrakcija mikrovalovima je metoda novijeg datuma i ima puno prednosti (vrijeme potrebno za pripremu uzorka je oko 2 sata, manji volumeni korištenih otapala) no za ovu namjenu se pokazala kao najmanje uspješna što dovodi do zaključka da je potrebno prilagoditi metodu preporučenu od proizvođača uređaja. Najuspješnijima su se pokazale ultrazvučne ekstrakcije (direktna i indirektna) koje imaju jednostavnu i relativno jeftinu instrumentaciju. Vrijeme ekstrakcije je i ovdje uvelike smanjeno kao i upotreba otapala koja su se koristila za ekstrakciju. Kako uzorci koji su korišteni u radu nisu bili dodatno usitnjeni i na taj način homogenizirani pretpostavka je da bi se bolji rezultati u svim ekstrakcijama dobili dodatnim usitnjavanjem.

## 5. Zaključak

Lipidi su organske molekule koje su topive u organskim otapalima. Dijele se na one koji se mogu hidrolizirati (voskovi, triacilgliceroli, fosfolipidi) i one koji se ne mogu hidrolizirati (vitamini topljivi u mastima, eikozanoidi, terpeni, steroidi). Hidrolizom triacilglicerola nastaju masne kiseline. Masne kiseline su vrlo važne za normalan rad organizma zbog toga što su glavno metaboličko gorivo, sastavni su dio staničnih membrana, regulatori su gena, imaju važnu ulogu pri toplinskoj, električnoj i mehaničkoj izolaciji.

U ovom radu opisan je postupak određivanja profila masnih kiselina u hrani za nesilice. Uzorci su pripremljeni Soxhlet ekstrakcijom, ultrazvučnom (direktnom i indirektnom) i mikrovalnom ekstrakcijom. Ekstrahirani triacilgliceroli su zatim prevedeni u metilne estere masnih kiselina uz  $\text{BF}_3$  u metanolu kao katalizatorom koji su pogodni za analizu plinskom kromatografijom.

Rezultati su pokazali da je najviše masnih kiselina određeno u uzorcima pripremljenim ultrazvučnom ekstrakcijom (direktnom i indirektnom) ukupno 22, nešto manji broj masnih kiselina određen je u uzorcima pripremljenim Soxhlet ekstrakcijom 15, dok je najmanji broj određen u uzorcima pripremljenim mikrovalnom ekstrakcijom, ukupno 10.

Od svih metoda ekstrakcija korištenih u ovom radu, najuspješnijima su se pokazale direktna i indirektna ultrazvučna ekstrakcija. Njihova instrumentacija je relativno jeftina i jednostavna, a vrijeme ekstrakcije je znatno smanjeno kao i količina otapala. Uspješnom se pokazala i Soxhlet ekstrakcija, ali u odnosu na ultrazvučnu je dugotrajna i potrebne su velike količine otapala. Mikrovalna ekstrakcija se pokazala neuspješnom za određivanje profila masnih kiselina u hrani za nesilice te ju je potrebno prilagoditi za tu namjenu.

## 6. Popis literature

1. J. G. Smith, *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 2011.
2. Merck Index, Rahway, Wilson, *Principles of Nutrition*, 2nd ed. New York: Wiley, 1967.
3. A. C. Rustan, C. A Drevon, *Fatty Acids: Structures and Properties*, 2005.
4. J. R. Sargent, D. R. Tocher, J. G. Bell, *The Lipids*, Fish Nutrition, 2002.
5. [https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-eicosapentaenoic-acid-EPA-and-docosahexaenoic-acid-DHA\\_fig1\\_250920969](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-eicosapentaenoic-acid-EPA-and-docosahexaenoic-acid-DHA_fig1_250920969) (20.8.2021.)
6. M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, *Soxhlet extraction: Past and present panacea*, *Journal of Chromatography A*, 2383–2389, 2010.
7. M.A. Lopez-Bascon, M.D. Luque de Castro, *Soxhlet Extraction*, Liquid-Phase Extraction, Elsevier Inc, 2020.
8. <https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=63120> (20.8.2021.)
9. H. Drmić, A. Režek Jambrak, *Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva*, *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2 (2) 22-33, 2010.
10. B. Kieser, R. Pillion, S. Smith, T. McCartney, *The Application of Industrial Scale Ultrasonic Cleaning to Heat Exchangers*, Woodrising Resources, Calgary, Canada, (2009.)
11. M. Vinatoru, Maricela Toma, Otilia Radu, P.I. Filip, D. Lazurca, T.J. Mason, *The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials*, *Ultrasonics Sonochemistry* 4, 135-139, 1997.
12. E. Destandau, T. Michel, C. Elfakir, *Microwave-assisted Extraction*, RSC Green Chemistry No. 21 Natural Product Extraction: Principles and Applications, The Royal Society of Chemistry, 2013.
13. <https://lipidlibrary.aocs.org/lipid-analysis/selected-topics-in-the-analysis-of-lipids/preparation-of-ester-derivatives-of-fatty-acids-for-chromatographic-analysis> (20.8.2021.)
14. I. Dusper, *Pregled i razvoj spregnutih metoda plinske kromatografije u kontroli kakvoće farmaceutskih tvari i proizvoda*, Završni specijalistički, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutskobiokemijski fakultet, 2018.
15. CEM Corporation, *Rapid FAMES analysis*
16. D. Fišer, *Sastav masnih kiselina različitih vrsta čokolada određen metodom plinske kromatografije*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2020.

17. G. Kralik, Z. Kralik , M. Grcević, O. Galović, D. Hanžek, E. Biazik, *Fatty acid profile of eggs produced by laying hens fed diets containing different shares of fish oil*, Poultry Science, 2021.

## 7. Životopis

<b>Osobni podaci</b>	
Ime i prezime	<b>Slavica Mikić</b>
Datum i mjesto rođenja	23.9.1997., Neuss, SR Njemačka
Adresa	Ulica Bele Bartoka 60, 31000 Osijek
e-mail	<a href="mailto:slavica.mikic.os@gmail.com">slavica.mikic.os@gmail.com</a>
<b>Obrazovanje</b>	
2019.-2021.	<b>Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer</b>  Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2016.-2019.	<b>Preddiplomski sveučilišni studij kemije</b>  Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek  Završni rad: Određivanje sadržaja kolesterola u žumanjcima jaja tekućinskom kromatografijom Mentor: doc.dr.sc. Olivera Galović

2012.-2016.	<b>II. gimnazija Osijek</b>
<b>Osobne vještine</b>	
Materinski jezik	Hrvatski jezik
Strani jezici	Njemački jezik – aktivno u govoru i pismu Engleski jezik – aktivno u govoru i pismu
Računalne vještine	MS Office sustav, služenje internetom i mailom
<b>Sudjelovanje na kongresima</b>	
	O. Galović, S. Mikić, M. Grčević, M. Paurević, M. Šrajer Gajdošik, Z. Kralik: <i>Fatty acids determination in hens feed mixture</i> , poster, 27. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Veli Lošinj 5.-8.10.2021.

## 8. Prilozi

### 8.1. Tablica: Nazivi masnih kiselina

masne kiseline	nazivi masnih kiselina prema IUPAC-u	trivijalna imena
C6:0	heksanska kiselina	kapronska kiselina
C8:0	oktanska kiselina	kaprilna kiselina
C10:0	n-dekanska kiselina	kaprinska kiselina
C12:0	n-dodekanoična kiselina	laurinska kiselina
C14:0	n-tetradekanska kiselina	miristinska kiselina
C15:0	n-pentadekanska kiselina	pentadekanoinska kiselina
C16:0	n-heksadekanska kiselina	palmitinska kiselina
C17:0	n-heptadekanska kiselina	margarinska kiselina
C18:0	n-oktadekanska kiselina	stearinska kiselina
C20:0	n-elkozanska kiselina	arahidinska kiselina
C22:0	n-dokosanoinska kiselina	behenska kiselina
C24:0	n-tetrakosanoinska kiselina	lignocerinska kiselina
C16:1	cis-heksadek-9-enska kiselina	palmitoleinska kiselina
C18:1 cis+trans	18:1 cis- i trans-oktadek-9-enska kiselina	18:1 je oleinska kiselina
C20:1	Z-eikoz-11-enoinska kiselina	eikozenoinska ili gondoinska kiselina
C18:2 n-6 cis	cis, cis-oktadeka-9,12-dienska kiselina	linoleinska (linolna) kiselina
C20:2 n-6	[(11Z, 14Z)-eikoza-11,14-dienoinska kiselina]	eikozadienska kiselina ili eikozadienoinska kiselina
C20:4 n-6	[(5Z,8Z,11Z,14Z)-eikoza-5,8,11,14-tetraenoinska kiselina]	arahidonska kiselina
C18:3 n-3	cis, cis, cis-oktadeka-9,12,15-trienska kiselina	linolenska kiselina
C20:5 n-3	[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-ikoza-5,8,11,14,17-pentaenoinska kiselina]	eikosapentaenoična kiselina ili eikosapentaenska kiselina
C22:6 n-3	[(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-dokoza-4,7,10,13,16,19-heksaenoinska kiselina]	dokosaheksaenoična kiselina

## 8.2. Poster i sažetak rada prezentiranog na 27. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera



SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU  
ZNASTVENI CENTAR IZVRSNOSTI ZA  
PERSONALIZIRANU BRIGU O ZDRAVLJU



### FATTY ACIDS DETERMINATION IN HENS FEED MIXTURE

Olivera Galović,<sup>a,b,\*</sup> Slavica Mikić,<sup>a</sup> Manuela Grčević,<sup>c,b</sup> Marija Paurević,<sup>a</sup>  
Martina Šrajcer Gajdošik,<sup>a</sup> Zlata Kralik<sup>c,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Ulica cara Hadrijana 8a, 31000 Osijek, Croatia

<sup>b</sup>Scientific Center of Excellence for Personalized Health Care, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, 31000 Osijek, Croatia

<sup>c</sup>Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia

\*ogalovic@kemija.unios.hr

#### INTRODUCTION

It has long been known that fatty acids (FA) are essential for maintaining the health of the human body. The amount and composition of fatty acids in our body depends, among other things, on the composition of the food we consume, so it is necessary to monitor the food quality. Chicken meat and eggs are often consumed and are important sources of fatty acids. The composition of the feeding mixture for chickens affects the FA profile found in chicken meat and eggs, therefore it is necessary to control the composition of the feeding mixture.

#### METHODOLOGY

Three methods of FA extraction (Soxhlet, microwave and ultrasound-assisted extraction (UAE)) were applied to 6 feed mixtures and compared. After Soxhlet and ultrasound-assisted extraction, the solvent was removed and samples were prepared according to a standard Fatty acid methyl ester (FAME) boron trifluoride method, while after microwave extraction, the samples were ready for the analysis by gas chromatography (GC).

#### RESULTS AND DISCUSSION

In this study, the profile of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in hen feed samples has been determined using three different extraction methods. Microwave extraction resulted in the lowest number of peaks detected, Soxhlet extraction showed a slightly higher number of peaks while ultrasound-assisted extraction gave the best results with the highest number of total FA detected (Figure 1). More detailed profile is given in the Table 1 where it can be seen that the ultrasound-assisted extraction enabled detection of larger number of FA significant in hen nutrition.

The significance of these comparisons lies in the shortening of the sample preparation time and the greater number of peaks detected.

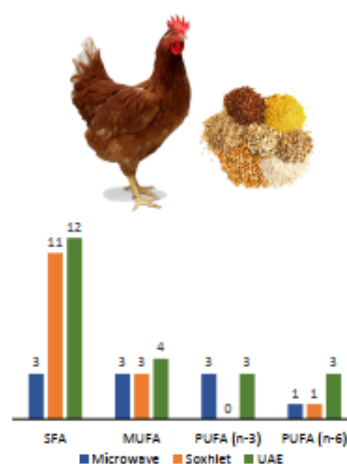


Figure 1. Total number of FA detected in each group (SFA – saturated fatty acids, MUFA – monounsaturated fatty acids, PUFA – polyunsaturated fatty acid) after Soxhlet, microwave and ultrasound-assisted extraction and followed by GC analysis

Table 1. Results of gas chromatography analysis of FA profile in hens feed mixtures

FA	MICROWAVE			SOXHLET			ULTRASOUND-ASSISTED		
	number of total FA detected	significant FA	% [w/w <sub>total</sub> ]	number of total FA detected	significant FA	% [w/w <sub>total</sub> ]	number of total FA detected	significant FA	% [w/w <sub>total</sub> ]
SFA	3	C14:0	0,039-1,068	11	C12:0	0,174 – 0,243	12	C12:0	0,049-0,109
		C16:0	10,168-14,449		C14:0	0,225- 3,434		C14:0	0,070-1,462
					C16:0	23,763-34,472		C16:0	11,710-15,919
MUFA	3	C18:1	22,516-30,974	3	C18:1	34,624-55,361	4	C18:1	21,393-34,764
PUFA	3	C18:3 n-3	5,305-17,268	/	/	/	3	C18:3 n-3	3,886-17,625
		C20:5 n-3	0,304-1,939					C20:5 n-3	0,124-1,635
		C22:6 n-3	0,986-4,952					C22:6 n-3	0,633-3,345
	1	C18:2 n-6 cis	29,682-53,673	1	C18:2 n-6 cis	1,243-11,144	3	C18:2 n-6 cis	24,827-50,974
								C20:4 n-6	0,023-0,238

ACKNOWLEDGEMENTS: This study is supported by the European Structural and Investment Funds grant for the Croatian National Scientific Center of Excellence for Personalized Health Care (grant #KK.01.1.1.01.0010) and by Ministry of Science and Education of the Republic of Croatia.



# FATTY ACID DETERMINATION IN HENS FEED MIXTURE

Olivera Galović<sup>a,b,\*</sup> Slavica Mikić,<sup>a</sup> Manuela Grčević,<sup>c,b</sup> Marija Paurević,<sup>a</sup>

Martina Šrajer Gajdošik,<sup>a</sup> Zlata Kralik<sup>c,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Ulica cara Hadrijana 8a, 31000 Osijek, Croatia

<sup>b</sup> Scientific Center of Excellence for Personalized Health Care, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, 31000 Osijek, Croatia

<sup>c</sup> Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia

\* ogalovic@kemija.unios.hr

It has long been known that fatty acids (FA) are essential for maintaining the health of the human body. The amount and composition of fatty acids in our body depends, among other things, on the composition of the food we consume, so it is necessary to monitor the food quality. Chicken meat and eggs are often consumed and are important sources of fatty acids. The composition of the feeding mixture for chickens affects the FA profile found in chicken meat and eggs, therefore it is necessary to control the composition of the feeding mixture. Three methods of FA extraction (Soxhlet, microwave and ultrasound-assisted extraction) were applied to 6 feed mixtures and compared. After Soxhlet and ultrasound-assisted extraction, the solvent was removed and samples were prepared according to a standard Fatty acid methyl ester (FAME) boron trifluoride method, while after microwave extraction, the samples were ready for the analysis by gas chromatography (GC). The significance of these comparisons lies in the, shortening of the sample preparation time and the greater number of peaks detected. Microwave extraction resulted in the lowest number of peaks detected, Soxhlet extraction showed a slightly higher number of peaks while ultrasound-assisted extraction gave the best results with the highest number of total FA detected (Figure 1).

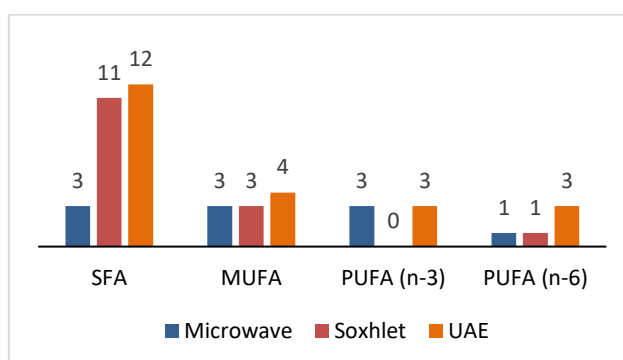


Figure 1. Total number of FA detected in each group (SFA – saturated fatty acids, MUFA – mono unsaturated fatty acids, PUFA – poly unsaturated fatty acid) after Soxhlet, microwave and ultrasound-assisted extraction and followed by GC analysis

**ACKNOWLEDGEMENTS:** This study is supported by the European Structural and Investment Funds grant for the Croatian National Scientific Center of Excellence for Personalized Health Care (grant #KK.01.1.1.01.0010) and by Ministry of Science and Education of the Republic of Croatia.