



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Alma Vuran

DETALJNA KARAKTERIZACIJA JESTIVIH ULJA I NJIHOVIH BINARNIH SMJESA POMOĆU SPEKTROSKOPIJE NMR

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Centru za NMR–Institut Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Jelene Parlov Vuković. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof.dr.sc.

Predrag Novak.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom
Valorisation of residues from the vegetable oil industry based on a biorefinery approach -
VALREO (HRZZ-IPS-2023-02-6614)

Zahvale

Hvala zaposlenicima Centra za NMR Instituta Ruđer Bošković na opremi i materijalima te na ugodnoj radnoj atmosferi koja mi je bila osobito važna prilikom izrade eksperimentalnog dijela.

Velika hvala mentorici dr. sc. Jeleni Parlov Vuković na pruženoj prilici, kao i svim savjetima, strpljenju i prenesenom znanju.

Hvala nastavniku prof. dr. sc. Predragu Novaku i ostalim članicama Povjerenstva za diplomski ispit na stručnim komentarima te sugestijama u ovom diplomskom radu.

Neizmjereno sam zahvalna Petri V. bez koje moj diplomski rad ne bi postojao u ovom obliku.

Zahvaljujem Tinu na nesebičnosti i podršci. Lovri na svakom zajedničkom učenju i polaganju ispita jer bez toga ne bi došao dan za polaganje ovog. Domagoju na svim prijatnim kavicama i zanimljivim raspravama, a Antunu na svakoj glasovnoj poruci te vođenju Discord kanala.

*Nešto po čemu ću pamtiti sve godine studiranja zaista su ljudi. Imala sam sreću da me pratio i podupirao velik broj osoba različitih godina, karaktera, svjetonazora... Svima njima želim poručiti **H V A L A!!!** Hvala vam na divnim trenucima, razgovorima, praćenju stanja uma, druženjima...*

Hvala mojoj obitelji, mami, tati, sekama Elmi i Lejli. Hvala na razumijevanju, podršci i velikoj vjeri u ono što radim. Hvala što ne sumnjate u mene kada ja sumnjam u sebe.

Za kraj, želim se zahvaliti Robiju što je od prvog dana izrade ovog diplomskog rada vjerovao da ja to mogu, nasmijavao me u teškim trenucima, pomagao mi i bio u pravu kad je govorio da će sve biti dobro.



Sadržaj

SAŽETAK.....	V
ABSTRACT	VI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Ulja	2
2.1.1. Maslinovo ulje.....	3
2.1.2. Ulje bučinih sjemenki.....	5
2.1.3. Suncokretovo ulje.....	5
2.2. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije.....	6
2.2.1. Jednodimenzijske tehnike NMR.....	7
2.2.2. Dvodimenzijske tehnike NMR	9
2.3. Primjena spektroskopije NMR u analizi biljnih ulja.....	12
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
2.4. Uzorci jestivih ulja	19
2.5. Priprema uzoraka	19
2.6. Uvjeti snimanja spektara NMR	21
2.6.1. Uvjeti snimanja spektara ^1H i ^{13}C	21
2.6.2. Uvjeti snimanja spektara DOSY NMR.....	21
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	22
2.7. Analiza spektara ^1H NMR.....	22
2.8. Analiza spektara ^{13}C NMR.....	30
2.9. Analiza spektara DOSY NMR	39
§ 5. ZAKLJUČAK	43
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	45
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	47
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

DETALJNA KARAKTERIZACIJA JESTIVIH ULJA I NJIHOVIH BINARNIH SMJESA POMOĆU SPEKTROSKOPIJE NMR

Alma Vuran

Ulja su jedan od tri glavna izvora energije koja su potrebna za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma. Biljna ulja složene su smjese koje se po sastavu dijele na sapunjivu frakciju u koju ubrajamo mono-, di- i tri- gliceride te neosapunjivu frakciju u koju podrazumijevamo alifatske alkohole, ugljikovodike, sterole, pigmente, tokoferole i fenolne skupine. S obzirom na veliku primjenu u različitim aspektima života, nužno je pooštavanje kontrole kvalitete. U ovom radu provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza pet uzoraka biljnih ulja tehnikama ^1H , ^{13}C i DOSY NMR. Dobiveni podaci poslužili su za karakterizaciju uzorka te određivanje strukturnih parametara. Analizom spektara ^1H NMR dobivene su informacije o udjelima protona te masnih kiselina u uzorcima dok je analiza spektara ^{13}C NMR pokazala patvorenje maslinovih sa suncokretovim uljem. Tehnika DOSY NMR pokazala je postojanje više komponenata prisutnih u ulju na temelju različitih translacijskih difuzijskih koeficijenata.

(48 stranica, 58 slika, 19 tablica, 43 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ^{13}C NMR, DOSY NMR, ^1H NMR, jestivo ulje, maslinovo ulje

Mentorica: dr. sc. Jelena Parlov Vuković, zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Predrag Novak

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
 2. prof. dr. sc. Ines Primožič
 3. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 17. listopada 2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DETAILED CHARACTERIZATION OF EDIBLE OILS AND THEIR BINARY MIXTURES USING NMR SPECTROSCOPY

Alma Vuran

Oils are one of the three main energy sources needed for proper functioning of the human body. Vegetable oils are complex mixtures which can be separated into a saponifiable fraction, including mono-, di- and triglycerides, and an unsaponifiable fraction, including aliphatic alcohols, hydrocarbons, sterols, pigments, tocopherols and phenolic compounds. Considering wide applications of oils in different aspects of life, stronger quality control is necessary. In this work, qualitative and quantitative analyses of five edible oil samples were performed by ^1H , ^{13}C and DOSY NMR techniques. Obtained data enabled characterization of the samples and determination of structural parameters. Information about proton and fatty acids percentages in samples was obtained by analysing ^1H NMR spectra while adulteration with sunflower oil was studied by ^{13}C NMR spectra. DOSY NMR spectroscopy showed presence of different species in each oil sample based on different translational diffusion coefficients. reflecting.
(48 pages, 58 figures, 19 tables, 43 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ^1H NMR, ^{13}C NMR, DOSY NMR, edible oil, olive oil

Mentor: Dr. Jelena Parlov Vuković, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Predrag Novak, Professor

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Full Professor with Tenure
 2. Dr. Ines Primožič, Full Professor with Tenure
 3. Dr. Mirta Rubčić, Full Professor
- Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Associate Professor

Date of exam: 17th October 2024

§ 1. UVOD

Jestiva ulja jedan su od tri glavna izvora energije potrebna za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma. Maslinovo ulje već je dugo vremena zbog svog sastava predstavljano kao najbolje ulje sa blagotvornim učinkom na ljudsko zdravlje. S obzirom na veliki porast proizvodnje maslinovog ulja dolazi do pooštavanja zahtjeva u kontroli kvalitete proizvodnog procesa. Ovakve analize obuhvaćaju i analizu krivotvorenja ulja visoke kvalitete s uljima niže kvalitete.¹ U današnje vrijeme se u analizi ulja koriste suvremene spektroskopske i kromatografske metode. Spektroskopija NMR posljednjih se godina sve češće koristi u analizi kompleksnih smjesa poput jestivih ulja. Iz spektara ^1H te ^{13}C NMR moguće je dobiti podatke o raspodjeli vodika i ugljika prema funkcijskim skupinama, a ti se podatci mogu iskoristiti u daljnjim izračunima u svrhu detaljne karakterizacije uzorka.²

U ovom radu istražena je mogućnost primjene spektroskopije NMR u detaljnoj kvalitativnoj i kvantitativnoj karakterizaciji jestivih ulja. Cilj je detaljno karakterizirati tri maslinova ulja, bučino i suncokretovo ulje kao i binarne smjese maslinovog te bučinog ulja sa suncokretovim uljem. U tu svrhu snimit će se spektri ^1H , ^{13}C te DOSY NMR. Analizom spektara ^1H NMR odredit će se udjeli vodikovih jezgri u uzorcima, kao i raspodjela masnih kiselina i stupanj nezasićenosti u uzorcima.

Nadalje, u radu je istražena primjena spektroskopije NMR u detekciji patvorenja u uzorcima maslinovih sa suncokretovim uljem. U tu svrhu analizirat će se spektri ^{13}C NMR posebice u području rezonancije olefina. Odredit će se udjeli ugljika i napraviti će se usporedba.

Snimit će se spektri DOSY NMR kako bi se dobili podatci o difuzijskim koeficijentima različitih vrsta prisutnih u uljima koji mogu poslužiti u daljnjoj karakterizaciji izračunom hidrodinamičkih radijusa kao i određivanju molekulskih masa.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ulja

Jestiva ulja predstavljaju jedan od tri glavna izvora energije potrebna za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma. Ulja biljnog podrijetla, prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima, su proizvodi koji se dobivaju iz sjemenki ili plodova biljaka te se sastoje od triglicerida, odnosno estera masnih kiselina s glicerolom, a mogu sadržavati i neznatne količine drugih lipida poput fosfolipida, voskova, neosapunjivih tvari, monoglicerida, diglicerida te slobodnih masnih kiselina. Ulja biljnog podrijetla se razvrstavaju ovisno o tehnološkom postupku koji se primjenjuje u proizvodnji te se prema tome razlikuju rafinirana, hladno prešana i djevičanska ulja.³ Većinu lipida konzumacijom hrane tijelo dobiva unosom triacilglicerola, a kako bi se mogli apsorbirati u crijevnom epitelu moraju se razgraditi do masnih kiselina. Upravo dobrobiti jestivih ulja za organizam su vezane uz masne kiseline koje ih sačinjavaju te esencijalne komponente kao što su makro i mikroelementi, vitamini A, C, K i E (tokoferoli, tokotrienoli), fitosteroli, fitostanoli, karotenoidi, klorofili, polifenoli i flavonoidi. Masne kiseline koje se nalaze u biljnim uljima se dijele na zasićene (C6:0–C20:0), mononezasićene (C16:1–C20:1) i polinezasićene (C18:2–C24:6) koje sadrže dvije do šest dvostrukih veza. Poznato je da su biljna ulja usko povezana s promicanjem zdravlja te prevencijom metaboličkih bolesti kao što su pretilost, dijabetes, ateroskleroza, kardiovaskularne i srčane bolesti, karcinomi itd.⁴ Ljudi u svojoj prehrani najčešće konzumiraju suncokretovo ulje te maslinovo ulje. Glavni enzim koji razgrađuje triacilglicerole na masne kiseline i glicerol je lipaza, enzim koji izlučuje gušterača. Triacilgliceroli se smatraju velikim zalihama energije. Energija dobivena potpunom oksidacijom masnih kiselina iznosi oko 38 kJ g^{-1} u usporedbi sa 17 kJ g^{-1} koja se dobiva iz ugljikohidrata i proteina. U sisavaca, triacilgliceroli se nakupljaju u citoplazmi adipoznih stanica (masnih stanica). Kapljice triacilglicerola se udružuju u kuglice te mogu zauzeti cijeli volumen stanice. U adipoznim stanicama triacilgliceroli se sintetiziraju, skladište i mobiliziraju u trenucima kada se triacilgliceroli koriste kao „gorivo“ u organizmu. Ptice selice, u vrijeme migracije mogu preletjeti velike udaljenosti bez potrebe za hranom, što je moguće time što im je energija pohranjena upravo u triacilglicerolima.⁵

2.1.1. Maslinovo ulje

Maslina (lat. *Olea europaea* L.) je suptropska zimzelena biljka iz porodice *Oleaceae*. Kultivirana maslina ima karakteristično nepravilno i razgranato stablo, a u slobodnom rastu može doseći visinu do 10 m. Zreo plod je ovalna, tamna koštunica bogata uljem⁶ koje se nalazi u vakuolama stanica mezokarpa ili razasuto po citoplazmi u obliku malih lipidnih inkluzija.

Iako je stablo masline otporno na nepovoljne uvjete, upravo će uvjeti određivati kakve će kvalitete biti plodovi i koliki će prinos biti. Čimbenici koji se prate su uzgoj, berba te čuvanje maslina do proizvodnje ulja. Osim navedenog, kvaliteta ulja ovisit će i o sorti masline, stupnju dozrijevanja ploda, transportu, čuvanju i tehnološkim procesima prerade maslina te skladištenju ulja. Proces prerade plodova maslina sastoji se od nekoliko faza. Potrebno je plod masline očistiti, oprati te ukloniti suvišno lišće. Zatim se mehaničkim postupcima obrađuje plod pri čemu se događa razdvajanje čvrste od tekuće faze. U zadnjoj fazi dolazi do odvajanja tekućih faza.⁷

Prema pravilniku o uljima od ploda i komine masline ulja se dijele u kategorije pod nazivima: djevičansko maslinovo ulje, rafinirano maslinovo ulje, maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja, sirovo ulje komine maslina, rafinirano ulje komine maslina te ulje komine maslina. Pod nazivom ekstra djevičansko maslinovo ulje podrazumijeva se ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, a takvo ulje sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja. Djevičansko maslinovo ulje dobiva se izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, a ono sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja.⁸⁻⁹

Maslinovo ulje u najvećem postotku čine triacilgliceroli. Najčešća masna kiselina koja se javlja u ovom ulju je mononezasićena oleinska kiselina. Osim nje, u sastavu maslinovog ulja često se nalaze stearinska, linolenska, linolna i palmitinska kiselina. Iako se navedene kiseline nalaze i u drugim uljima i mastima, ono što maslinovo ulje čini jedinstvenim jest omjer u kojem se različite kiseline nalaze. Hidrolizom triacilglicerola dolazi do oslobađanja masnih kiselina što rezultira kiselijim uljem i padom kvalitete ulja. Maslinovo ulje u svom sastavu sadržava veliki udio polifenola pa se često preporuča za konzumaciju kroz razne posebne režime prehrane poput mediteranske prehrane. Smatra se kako je unos 25–50 ml ekstra djevičanskog maslinovog ulja na dan dovoljno kako bi se ostvario pozitivan učinak na zdravlje.

Polifenoli su skupina prirodnih, sintetskih ili polusintetskih organskih molekula koji unutar strukture sadrže, kako im samo ime kaže, više fenolnih skupina. Poznato ih je više od 8000 vrsta uključujući stotine polifenola izoliranih upravo iz biljaka. Polifenoli ekstrapiranih maslinovih kiselina dijele se u šest glavnih skupina: fenolne kiseline, fenolni alkoholi, sekoiridoidi, lignani, flavonoidi i hidroksiizokromani.¹⁰ Polifenoli su u velikom postotku glavni sastojci raznog voća, povrća, sjemenki, vina i biljaka. Smatra se da polifenoli imaju važne uloge u organizmu kao snažni antioksidansi te da posjeduju protuupalno djelovanje. Jedni su od glavnih saveznika u smanjenju karcinoma, ali i raznih kardiovaskularnih te neurodegenerativnih oboljenja.¹¹ Njihova antioksidantska aktivnost može se objasniti smanjenjem koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva u ljudskom tijelu zbog same strukture polifenolnih spojeva. O-dihidroksi spojevi imaju velik antioksidativni kapacitet i antimikrobnu aktivnost. Najvažniji lipofilni fenoli u maslinovom ulju su tokoferoli i tokotrienoli. Uloga tokoferola je inhibicija autooksidacijskog kvarenja ulja. Najzastupljeniji tokoferol u maslinovom ulju je α -tokoferol ili vitamin E. Prisutni su još i β , γ , i δ oblici.

U sastav maslinovog ulja još ubrajamo i ugljikovodike, a najzastupljeniji su skvalen i β -karoten. Preostale ugljikovodike čine zasićeni alifatski ugljikovodici, dienski ugljikovodici, diterpeni, triterpeni, izoprenoidi i *n*-parafini. Karakterističnu boju maslinova ulja imaju od pigmenta klorofila i karotenoida. Na njihovu količinu utječu sorta ploda, stupanj sazrijevanja, proizvodni procesi i uvjeti skladištenja.⁷

Objašnjenje biološkog djelovanja maslinovog ulja, odnosno njegovih sastavnica, leži u objašnjenju samih procesa koji nisu povoljni za organizam. Tako je važno naglasiti da se normalnim metaboličkim procesima u tijelu razvijaju i slobodni radikali, a manji dio ih dolazi iz okoliša. Slobodni radikali su vrste koje sadrže jedan nespareni elektron u vanjskoj ljusci, imaju visok stupanj reaktivnosti i visok afinitet prema proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama, ugljikohidratima i drugim makromolekulama. Ukoliko se u organizmu prekomjerno stvaraju slobodni radikali, a antioksidacijska zaštita je smanjena dolazi do nastanka oksidativnog stresa koji rezultira razvojem bolesti poput ateroskleroze, dijabetesa, reumatoidnog artritisa, autoimunih bolesti, karcinoma. Organizam se od oksidativnog stresa može štititi endogenim i egzogenim molekulama i enzimskim sustavima. Egzogeni antioksidansi unose se u organizam izvana primjerice hranom, a to je u ovom slučaju maslinovo ulje.⁷

2.1.2. Ulje bučinih sjemenki

Buča, tikva ili bundeva (lat. *Cucurbita pepo* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka roda *Cucurbita* iz obitelji *Cucurbitaceae*. Pojedinačni plod sadržava između 100 i 400 sjemenki koje su eliptične, spljoštenog oblika i imaju izražene rubove. Iako se mogu konzumirati pržene, najčešće se koriste u proizvodnji bučinog ulja.¹²

Ulje bučinih sjemenki proizvodi se tradicionalnim metodama: očišćene sjemenke se suše, obrađuju mehaničkim putem, prže i naknadno prešaju. Ulje je tamnozelene do crne boje, prepoznatljive arome koja podsjeća na orašaste plodove. Ulje buče koristi se kao začín, a zbog svoje niske temperature dimljenja ne preporuča se koristiti za prženje.

Iz jednog kilograma sjemenki buče može se dobiti između 450 i 500 grama ulja. U procesu proizvodnje, moguće je u samom ulju identificirati razne alkohole, aldehide, ketone, sulfate, furane i pirazine. Ovo ulje izrazito je bogato polinezasićenim masnim kiselinama koje čine oko 84% ukupnih masnih kiselina u uzorku, ali i mineralima te vitaminima topivim u mastima. Najčešće masne kiseline u sastavu bučinog ulja su palmitinska kiselina, stearinska kiselina, oleinska kiselina i linolna kiselina. Smatra se da ulje bučinih sjemenki smanjuje upalna tkiva prostate te tako štiti od pojave raka prostate i sprječava nastanak bubrežnih kamenaca.¹³

2.1.3. Suncokretovo ulje

Suncokret (lat. *Helianthus annuus* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka koja može narasti visine do 4 metra, a korijen može prodrijeti u dubinu do 3 m. Sjemenke suncokreta sadrže znatnu količinu vitamina i minerala od kojih najčešće magnezij, željezo, bakar, kalcij, cink, natrij, kalij, fosfor, selen i mangan. Suncokret je važna uljna i proteinska kultura te su kod suncokreta svi dijelovi biljke iskoristivi.¹⁴ Suncokretovo ulje je drugo najčešće koje se proizvodi na svijetu, odmah nakon sojinog ulja. Sadrži oko 70% linolne kiseline, 20% oleinske kiseline dok su ostatak zasićene masne kiseline. Sam omjer kiselina ovisi o klimi u kojoj suncokret raste.¹⁵ Rast u toplijim područjima rezultirat će uljima koja će biti bogatija mononezasićenim kiselinama poput oleinske kiseline. U sastavu suncokretovog ulja nalazi se i vitamin E koji je dobar za konzumaciju zbog svojih antioksidativnih učinaka: borbe protiv reaktivnih kisikovih vrsti i oksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Polinezasićene masne kiseline dijelimo u dvije velike grupe: omega-3 i omega-6 masne kiseline. Ove masne kiseline ljudsko tijelo ne može sintetizirati samostalno, ali unosom ovih kiselina može pomoći da se sintetiziraju druge važne kiseline. Zbog povećanog udjela linolne i oleinske kiseline suncokretovo ulje smatra se dobrim

za konzumaciju u svrhu smanjenja kolesterola koji dovodi do smanjenja srčanih bolesti. Suncokretovo ulje bogato je i tokoferolima koji u tijelu djeluju protuupalno neutralizirajući slobodne radikale te smanjujući oksidativni stres stanica čime potpomažu smanjenju reumatoidnog artritisa i bronhijalne astme.¹⁶

2.2. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) je analitička tehnika koja se koristi za određivanja strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula. Jezgre posjeduju dva kvantna broja: kvantni broj nuklearnog spina I (polucijeli ili cijeli broj) i nuklearni magnetni spinski kvantni broj m_I koji govori o orijentaciji nuklearnog spina u magnetnom polju.¹⁷

Da bi došlo do same interakcije spinova, potrebno je zadovoljiti izborno pravilo da je kvantni broj nuklearnog spina I veći od 0. Interakcije spinova dijele se na električne i magnetne. Električne interakcije podrazumijevaju kvadrupolno sprezanje spinova s kvantnim brojem I većim od $\frac{1}{2}$. Magnetske interakcije dijele se na izotropni i anizotropni kemijski pomak te sprezanje spin-spin u koje ubrajamo J-sprezanje i dipolno sprezanje. Ove interakcije prisutne su u svim NMR aktivnim jezgrama. Spinovi jezgri se u spektroskopiji NMR pobuđuju primjenom polja B_1 što se naziva tehnika kontinuiranog vala ili primjenom radiofrekvencijskih pulseva (pulsne tehnike). Princip tehnike kontinuiranog vala temelji se na postupnoj promjeni frekvencije polja B_1 pri konstantnom vanjskom magnetnom polju B_0 . Kada dođe do izjednačavanja frekvencije polja B_1 sa Larmorovom frekvencijom promatrane jezgre dolazi do rezonancije, apsorpcije zračenja te prelaska jezgre u pobuđeno stanje, a to se registrira kao signal NMR. Primjena pulsnih tehnika podrazumijeva pobudu kratkim radiofrekvencijskim ili gradijentnim pulsevima.¹⁷

Osnovni parametri u spektroskopiji NMR su vrijeme relaksacije, kemijski pomak, zasjenjenje jezgre te konstanta sprege spin-spin J . Vrijeme relaksacije definira se kao vrijeme za koje spinovi prelaze iz pobuđenog u osnovno stanje. Kemijski pomak δ_i jezgre i označava položaj jezgre u spektru, a govori o pomaku NMR signala jezgre u odnosu na referentni signal. Kemijski pomak definira se kao razlika proučavanog i referentnog signala podijeljena frekvencijom vanjskog magnetnog polja, a izražen je u jedinicama ppm (*engl. parts per million*) prema jednadžbi:

$$\delta/\text{ppm} = \left(\frac{\nu_i - \nu_{\text{ref}}}{\nu_0} \right) \times 10^6 \quad (1)$$

Skala kemijskog pomaka ovisi o prirodi promatrane jezgre te će za jezgre ^1H iznositi približno do 15 ppm, dok će za jezgre ^{13}C iznositi približno do 250 ppm. Kemijski pomak izražen u jedinicama ppm ne ovisi o frekvenciji i jakosti primijenjenog magnetskog polja. Svaku jezgru okružuju elektroni koji stvaraju vlastita magnetna polja te je posljedica zasjenjenje jezgre od utjecaja vanjskog magnetnog polja. Pojedina jezgra tako osjeća efektivno magnetno polje koje je iznosom manje od utjecaja vanjskog magnetnog polja na promatranu jezgru. U izotropnom mediju opažaju se skalarne interakcije ili interakcije spin-spin koje opisuje konstanta sprege J izražena u Hertzima. Jezgre spregnute preko jedne ili više kemijskih veza jesu jezgre kod kojih spinsko stanje susjedne jezgre utječe na energijske razine promatrane jezgre.¹⁷

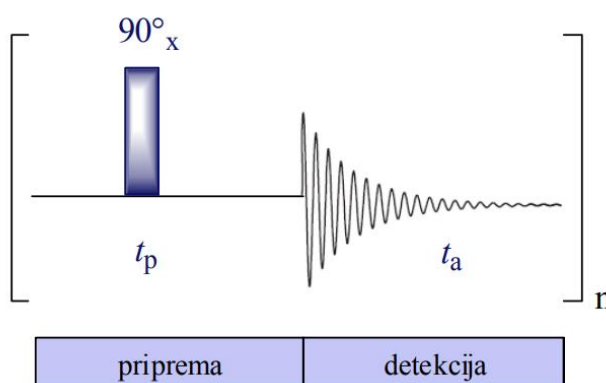
Spektri NMR snimaju se na spektrometru NMR koji se sastoji od supravodljivog magneta, sonde sa cjevčicom u kojoj se nalazi odabrani uzorak, nekoliko različitih zavojnica i elektronike koja omogućuje povezivanje instrumenta i sustava za obradu podataka. Ovim instrumentom omogućeno je snimanje čvrstih uzoraka, tekućih i otopina čvrstih uzoraka koji se otapaju u pogodnom deuteriranom otapalu.

2.2.1. Jednodimenzijske tehnike NMR

Jednodimenzijski spektri prikazuju ovisnost intenziteta signala o kemijskom pomaku proporcionalnom Larmorovoj frekvenciji. Detektirani signal u vremenskoj domeni se prevodi Fourierovom transformacijom u frekvencijsku domenu. Primjeri jednodimenzijskih tehnika NMR su ^1H NMR, ^{13}C NMR, APT (engl. *attached proton test*), INEPT (engl. *insensitive nuclei enhanced by polarization transfer*) i DEPT (engl. *Distortionless enhancement by polarisation transfer*)

2.2.1.1. ^1H NMR

Prvi uvid u strukturu spoja omogućuje spektroskopska tehnika ^1H NMR. Ovom tehnikom se detektiraju signali kemijski neekvivalentni protoni u spoju, a njihov broj proporcionalan je omjeru površina ispod pojedinih signala. Pulsni slijed tehnike ^1H NMR prikazan na slici 2.1 sastoji se od perioda pripreme i perioda detekcije koje odvaja puls od 90° po osi x u trajanju t_p . Vrijeme akvizicije označava vrijeme tijekom kojeg zavojnica prima signal i bilježi ga kao slobodno opadanje magnetizacije. Kako bi se poboljšao odnos signala prema šumu, opisani pulsni slijed ponavlja se n puta.¹⁷

Slika 2.1. Pulsni slijed ^1H NMR tehnike¹⁷

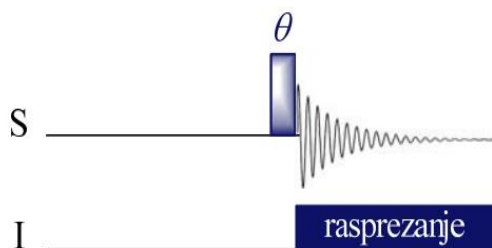
2.2.1.2. ^{13}C NMR

U svrhu identifikacije ugljikovih atoma u analiziranom uzorku koristi se spektroskopska tehnika ^{13}C NMR. Ovom tehnikom detektira se izotop ugljika ^{13}C prirodne zastupljenosti 1,11% što dovodi do dužeg vremena snimanja spektara u odnosu na snimanje ^1H NMR spektara. Broj signala dobivenih u spektru ^{13}C NMR odgovara broju različitih vrsta ugljikovih atoma u spoju. Prilikom snimanja spektara ^{13}C NMR u uzorak se dodaje vrlo mala količina reagensa poput krom(III) acetilacetona u svrhu smanjenja vremena relaksacije.¹⁷⁻¹⁸

Kako bi se provela kvantitativna analiza moguće je koristiti tehnike dvostruke rezonancije. Tu se podrazumijevaju tehnike koje osim primjene vanjskog magnetnog polja B_0 koriste i rasprezajuće polje B_2 ili pulseve. Na spinove jezgri koje se detektiraju primjenjuje se pobudni puls, a na spinove jezgri koji su u sprezi s detektiranim jezgrama primjenjuje se rasprezajuće polje. Rezultat rasprezajućeg polja ovisi o pulsnom slijedu, a moguće je dobiti spregnuti spektar uz pojačanje signala uz nuklearni Overhauserov efekt (NOE), raspregnuti spektar bez NOE (engl. *gated decoupling*) ili raspregnuti spektar uz NOE (engl. *power-gated decoupling*). Tehnika rasprezanja „*inverse gated*“ je heteronuklearna jednodimenzijska NMR tehnika kod koje je rasprezajuće polje uključeno samo tijekom vremena akvizicije, t_2 te je rezultat raspregnuti spektar bez NOE. Na slici 2.2. prikazan je pulsni slijed ove tehnike. Kod tehnika s dvostrukom rezonancijom važno je pripaziti na ovisnost NOE efekta o predznaku žiromagnetske konstante zato što će kod jezgri sa negativnom žiromagnetskom konstantom doći do smanjenja intenziteta signala. Nuklearni Overhauserov efekt se definira kao promjena intenziteta rezonancije promatranog spina zbog promjena u ravnotežnoj napučenosti spinova druge jezgre ako su navedeni procesi povezani tzv. mehanizmom križne relaksacije. Do

promijene u ravnotežnoj napučenosti može doći izjednačavanjem napučenosti višeg i nižeg energijskog stanja ili „inverzijom napučenosti“.

Tehnikama dvostruke rezonancije dolazi do prelazaka složenih multipleta u signlete, čime je dobiveni spektar jednostavniji za obradu. Integriranjem dobivenih signala i kvantitativnom analizom moguće je odrediti udjele pojedinih skupina ugljika te otkloniti sumnje na nepravilnosti u sastavu ulja.¹⁷⁻¹⁸



Slika 2.2. Pulsni slijed „inverse gated“ ^{13}C NMR tehnike¹⁷

2.2.2. Dvodimenzijske tehnike NMR

Dvodimenzijske tehnike NMR kao rezultat daju spektre u dvije dimenzije (evolucijska F_1 i detekcijska F_2). Svakom signalu u dvodimenzijskom spektru odgovara točno određeni intenzitet i frekvencije u navedenim dimenzijama, a prikaz signala moguć je u trodimenzijskom prostoru ili konturama čija gustoća odgovara intenzitetu signala.

Pulsni slijed svake dvodimenzijske tehnike NMR može se opisati uz pomoć nekoliko perioda, a to su priprema, evolucija, miješanje te detekcija. Periodi pripreme i miješanja uglavnom obuhvaćaju pulseve koji imaju konstantan iznos pulsne širine. Period detekcije analogan je odgovarajućem periodu detekcije u analognoj jednodimenzijskoj tehnici NMR. Obilježje dvodimenzijskih tehnika NMR je da se vrijeme evolucije povećava za jednaki iznos u svakom novom ponavljanju pulsnog slijeda tijekom evolucijskog perioda te se generira druga frekvencijska dimenzija.¹⁷⁻¹⁸ Najčešće korištene dvodimenzijske tehnike NMR jesu COSY (eng. *correlation spectroscopy*), HMQC (eng. *heteronuclear multiple quantum coherence*), HSQC (eng. *heteronuclear single quantum coherence*), HMBC (eng. *heteronuclear multiple bond correlation*)⁸

COSY je tehnika kojom se dobivaju informacije o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze. Tehnike HSQC i HMBC temelje se na skalarnoj sprezi između protona i heterojezgri (^{13}C , ^{15}N ...) kroz jednu vezu, a razlika između ove dvije tehnike je u primjeni različitoj pulsnog slijeda. Tehnikom HMBC omogućen je uvid u korelacije

protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze te je moguće povezivanje pojedinih spinskih sustava.¹⁷

2.2.2.1. DOSY NMR

Spektroskopija NMR s poredanom difuzijom, DOSY, je pseudo-dvodimenzijska tehnika u kojoj je jedna dimenzija karakterizirana kemijskim pomacima protona, a druga dimenzija odgovara translacijskim difuzijskim koeficijentima. Određivanjem difuzijskih koeficijenata komponenti smjese moguće je izračunati hidrodinamičke radijuse i volumene molekula te procijeniti molekulsku masu pojedinih komponenti. Ova tehnika primjenjuje se u analizi kompleksnih, složenih i heterogenih smjesa, a temelji se na razdvajanju signala NMR komponenti prema difuzijskim koeficijentima te stoga nije potrebno provoditi fizičko razdvajanje na pojedine komponente smjese.¹⁹ DOSY NMR tehnika pokazala se kao korisna u pružanju informacija o veličini, masi, obliku, agregaciji, kompleksiranju, sastavu smjesa kao i strukturi same molekule što ju čini iznimno korisnom u istraživanju molekulskih interakcija, proučavanju interakcija protein-ligand i karakterizaciji reaktivnih međuprodukata.²⁰

Ova tehnika primjenjuje gradijentne pulseve koji se temelje na primjeni dodatnog magnetnog polja B_g . Primijenjeno magnetno polje se linearno mijenja duž osi z odnosno duž cjevčice NMR čime se narušava homogenost polja te dolazi do defokusiranja magnetizacije koja se može refokusirati primjenom gradijentna suprotnog smjera.

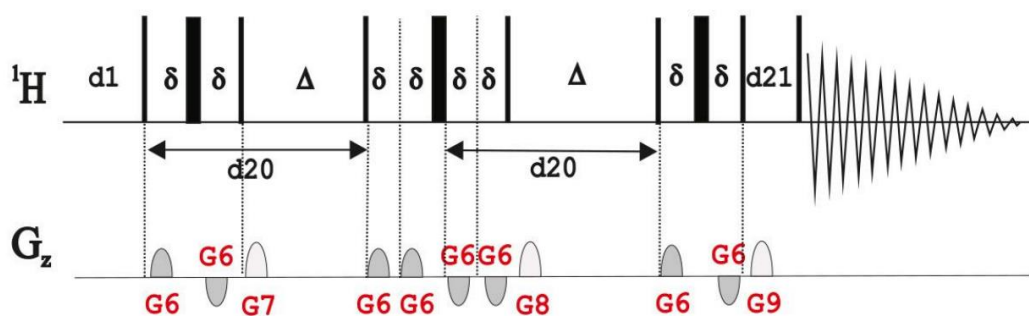
Snaga gradijenta ovisi o magnetožirnom omjeru (γ) promatrane jezgre, amplitudi gradijenta (g) i duljini trajanja gradijenta (δ). Tijekom eksperimenta DOSY NMR dolazi do povećanja gradijenta, a posljedica je eksponencijalno smanjenje intenziteta detektiranog signala (I) prema Stejskal-Tannerovoj jednadžbi (2). Stejskal-Tannerovom jednadžbom opisan je odnos intenziteta signala s primijenjenim gradijentom (I_G) i intenziteta signala bez gradijenta ($I_{G=0}$). Jednadžba sadrži i faktor nestabilnosti (α), eksperimentalno vrijeme difuzije (Δ) i vrijeme od polovine širine jednog gradijenta do polovine širine drugog gradijenta (τ).²⁰⁻²¹

$$I = I_0 e^{\{-D\delta^2 \gamma^2 g^2 [\Delta + \frac{\delta(\alpha^2 - 2)}{6} + \frac{\tau(\alpha^2 - 1)}{2}]\}} \quad (2)$$

Logaritmiranjem jednadžbe dobiva se linearni pravac iz kojeg je moguće pomoću vrijednosti nagiba pravca izračunati difuzijski koeficijent (D).²² Difuzijski koeficijent ovisi o molekulskoj masi i obliku te agregatnom stanju molekula, a prema Stokes-Einsteinovoj jednadžbi (3) ovisi i o temperaturi te viskoznosti otapala.

Primjenom gradijentnih pulseva može doći do određenih smetnji koje utječu na dobivene rezultate difuzijskih koeficijenata, a radi se o pojavi konvekcijskih i vrtložnih struja u cjevčici NMR. Konvekcijske struje posljedica su stvaranja temperaturnih gradijenata nastalih reguliranjem temperature tijekom eksperimenta što podrazumjeva strujanje prema gore toplije tekućine manje gustoće. Do porasta konvekcijskih struja može doći i smanjenjem viskoznosti otapala kao i kod većih molekula s manjim koeficijentom difuzije. Vrtložne struje su inducirane naglom izmjenom gradijentnih pulseva i stvaraju dodatno magnetno polje koje dovodi do promjena u fazi unutar spektra.²³

Utjecaj konvekcijskih i vrtložnih struja smanjuje se korištenjem pulsnog slijeda PGDSTE-BPP uz upotrebu bipolnih gradijenata (engl. *pulsed field gradient double stimulated echo with bipolar pulse pair*) uz tri *spoil* gradijenta. Ovaj pulsni slijed sastoji se od PGDSTE (engl. *pulse gradient double stimulated echo*) uz upotrebu bipolnih gradijenata i tri *spoil* gradijenta. Pulsni slijed PGDSTE predstavlja dvostruko primijenjen PGSTE (engl. *pulse gradient stimulated echo*) slijed. Pulsni slijed PGDSTE-BPP koristi se za uzorke otopljene u deuteriranom otapalu uz zaključavanje signala (engl. *lock*) čime je moguće kontrolirati homogenost i stabilnost magnetnog polja. Navedeni pulsni slijed shematski je prikazan na slici 2.3.



Slika 2.3. Pulsni slijed tehnike PGDSTE-BPP²⁴

Stokes-Einsteinovom jednažbom (3) moguće je definirati koeficijent difuzije. Koeficijent opisuje translacijsku difuziju molekula odnosno miješanje molekula ili atoma kao posljedicu nasumičnog termičkog gibanja.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (3)$$

Ova jednadžba u obzir uzima Boltzmannovu konstantu (k_B), apsolutnu temperaturu (T), viskoznost otapala (η) te hidrodinamički radijus solvatirane molekule (r_H) te se primjenjuje za sferne molekule veće od molekula otapala.

Jednadžbom (4) moguće je odrediti molekulsku masu iz difuzijskih mjerenja.

$$D = KM^{-\alpha} \quad (4)$$

Konstanta K ovisi o veličini molekule, a koeficijent α o obliku molekule te navedena jednadžba vrijedi za molekule sfernog oblika te razrijeđene otopine. S obzirom na teško određivanje veličina K i α , Evans i suradnici²⁵ predlažu drugi model izračuna molekulske mase:

$$D = \frac{k_B T \left(\frac{3\alpha}{2} + \frac{1}{1+\alpha} \right)}{6\pi\eta \sqrt[3]{\frac{3M_W}{4\pi\rho_{eff}N_A}}}, \alpha = \sqrt[3]{\frac{M_{WS}}{M_W}} \quad (5)$$

$$f_{GW} = \left(\frac{3\alpha}{2} + \frac{1}{1+\alpha} \right)^{-1} \quad (6)$$

Ovaj model kombinira Stokes-Einsteinovu jednadžbu i Gierer-Wirtzov korekcijski faktor, a difuzijski koeficijent ovim modelom ovisi o Boltzmannovoj konstanti (k_B), termodinamičkoj temperaturi (T), viskoznosti otapala (η), Avogadrovoj konstanti (N_A), efektivnoj gustoći (ρ_{eff}) i molekulskim masama proučavanih molekula (M_W) i otapala (M_{WS}). Uvođenjem parametra efektivne gustoće utjecaj oblika molekule i utjecaj sastava otopine može biti zanemaren.²⁵

2.3. Primjena spektroskopije NMR u analizi biljnih ulja

Jestiva ulja velikim su dijelom sastavni dio svakodnevne ljudske prehrane s obzirom da su lipidi jedan od tri glavna izvora energije. Maslinovo ulje posljednjih godina nalazi se u mnogobrojnim preporukama znanstvenika i stručnjaka kao ulje koje stvara pozitivan učinak na zdravlje. Velika potražnja dovodi do velikog porasta proizvodnje što zahtjeva pojačanu kontrolu kvalitete ulja kao i otkrivanje nepravilnosti u vidu patvorenja jestivih ulja i masti visoke kvalitete s onima niže kvalitete.²⁶ U svrhu provjere kvalitete ulja danas se koriste suvremene spektroskopske i kromatografske metode. Tri standarde analitičke metode koje su se koristile u analizi pojedinih sastavnica ulja su plinska i tekućinska kromatografija te tekućinska kromatografija visoke

djelotvornosti (HPLC). Plinskom kromatografijom s plameno ionizacijskim detektorom (GC-FID) moguće je određivanje voskova, sterola, masnih kiselina, alifatskih alkohola te drugih sastavnih dijelova jestivog ulja dok je HPLC-om moguće određivanje triacilglicerida.²⁷ Ovakve analize daju informacije o ukupnom sastavu masnih kiselina, no ne daju informacije o distribuciji lanaca na glicerol.²⁸ Zbog sve veće svjesnosti o zahtjevu da je hrana koja se postavlja na tržište te konzumira ispravna, sami proizvođači zahtijevaju da je analiza proizvoda jestivog ulja brza, jeftina te nedestruktivna u svrhu potvrđivanja autentičnosti ulja.²⁹ Stoga se posljednjih godina spektroskopija NMR nametnula kao vrlo korištena metoda u analizi kompleksnih smjesa poput biljnih ulja. Prednosti spektroskopije NMR su jednostavna priprema uzorka te je moguća automatizacija snimanja eksperimenta kao i velika reproducibilnost.³⁰

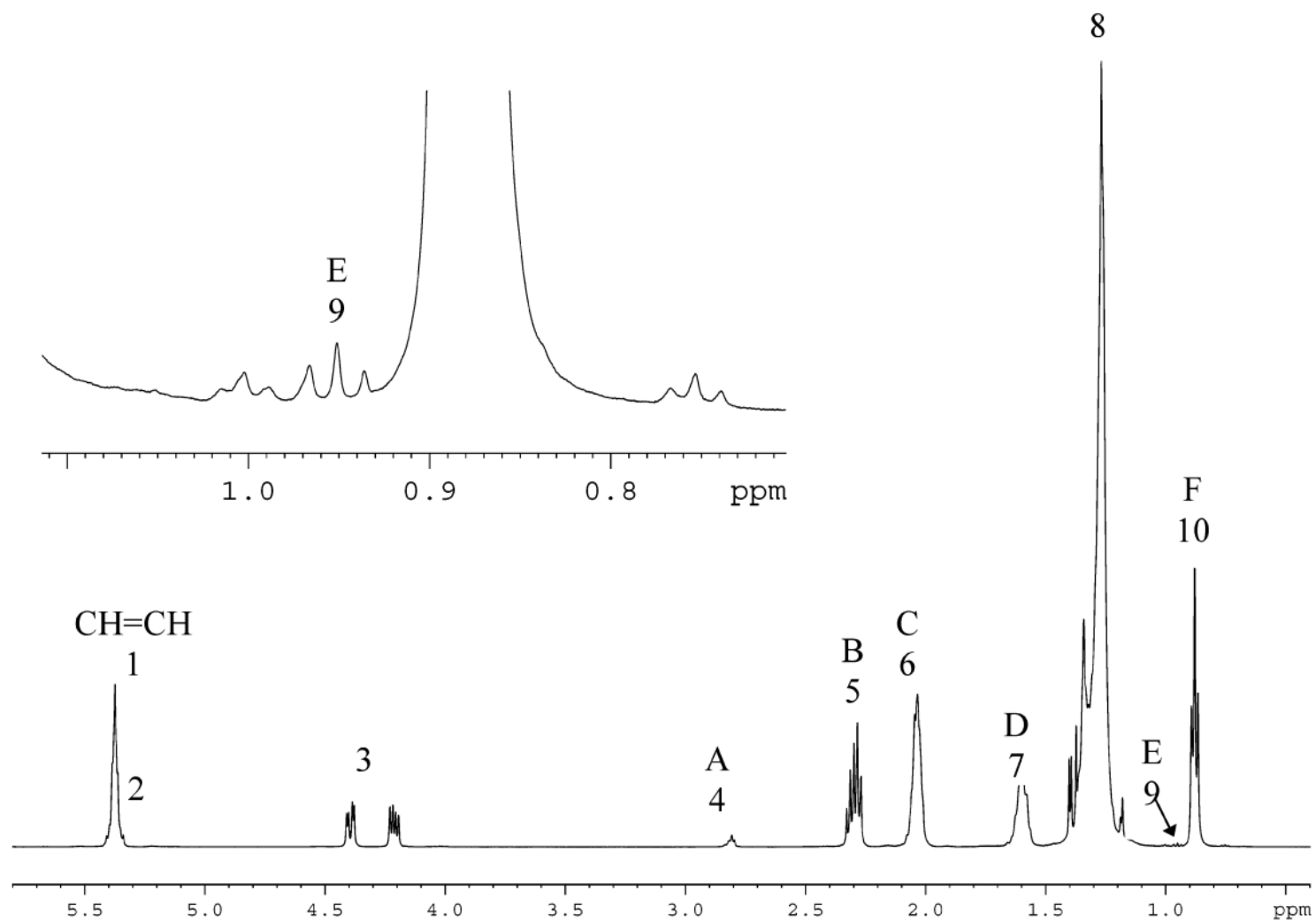
Kemijski sastav maslinovog ulja ovisi o tehnikama ekstrakcije koje se primjenjuju prilikom ekstrahiranja ulja iz plodova pri povišenom tlaku. Gotovo 99% ulja čine triacilgliceroli od čega 83% ukupnih masnih kiselina čini mononezasićena oleinska kiselina, zatim slijede palmitinska, stearinska, linolna te linolenska.

Lipidi koji u velikoj količini sadržavaju nezasićene masne kiseline podložni su hidrolizi i oksidaciji zbog endogenih enzima, ali i drugih vanjskih faktora poput temperature, izloženosti kisiku ili svjetlu. Ove pojave posebno su primijećene kod ulja koja sadržavaju u velikom postotku polinezasićene masne kiseline čime su osjetljivija na pojavu užglosti.³¹

Najkorištenija tehnika spektroskopije NMR u analizi ulja je tehnika ^1H NMR. Ova tehnika koristi se u kvalitativnoj, ali i kvantitativnoj analizi čime je moguće određivanje udjela različitih funkcijskih skupina, slobodnih masnih kiselina, zasićenih i nezasićenih masnih kiselina kao i raspodjela nezasićenih masnih kiselina. Ovom tehnikom moguća je i geografska karakterizacija kao i potvrđivanje autentičnosti proizvoda.^{30,32} Nedostatak ove tehnike se javlja zbog skalarnog sprezanja između susjednih protona i manjeg raspona kemijskog pomaka što rezultira vrlo napučenim spektrima za složene smjese koje je pritom teže i analizirati.³³

Određivanje slobodnih masnih kiselina dobiva se informacija o kvaliteti i svježini maslinovog ulja, a računaju se iz signala koji se u spektru javlja pri $\delta = 3,69\text{--}3,99$ ppm. Također, moguće je odrediti i jodni broj: empirijski broj koji definira stupanj nezasićenosti. On se računa iz signala koji se u spektru javlja pri $\delta = 5,00\text{--}5,20$ ppm što definira područje trans–dvostrukih veza iz svih nezasićenih masnih kiselina u uzorku. Određivanje ovakvih parametara važno je te može utjecati na konačno zadovoljstvo i učinak konzumiranog ulja. Vigli i suradnici³⁴ podijelili

su karakterističan spektar ^1H NMR djevičanskog maslinovog ulja prikazan na slici 2.4. na deset područja (tablica 2.1.)



Slika 2.4. Karakterističan spektar ^1H NMR maslinovog ulja pri 500 MHz preuzeto iz literaturnog izvora 34.

Tablica 2.1. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR u uzorku djevičanskog maslinovog ulja³⁴

oznaka signala	kemijski pomak/ppm	protoni	pripadnost
1	5,40	$\text{CH}=\text{CH}$	sve nezasićene masne kiseline
2	5,37	$\text{CH}-\text{OCOR}$	trigliceridi
3	4,22-4,42	CH_2-OCOR	trigliceridi
4 (A)	2,84	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ $\text{CH}=\text{CH}$	linolenski i linolni lanci
5 (B)	2,32	CH_2-COOH	svi acilni lanci
6 (C)	2,06	$\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$	svi nezasićeni acilni lanci
7 (D)	1,63	$\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{COOH}$	svi acilni lanci
8	1,30	$(\text{CH}_2)_n$	svi acilni lanci
9 (E)	0,95	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ CH_3	linolenski lanci
10 (F)	0,88	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_3$	svi acilni lanci osim linolenskih

Ovakvu raspodjelu koristili su i Guillen i suradnici³⁵ te su iz navedenih signala nadalje izračunali distribuciju oleinske, linolenske, linolne te zasićenih masnih kiselina kao i pripadajući jodni broj za uzorke maslinovog te suncokretovog ulja te su rezultati prikazani u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Udjeli masnih kiselina te jodni brojevi za uzorke suncokretovog i maslinovog ulja³⁴ te bučinog ulja³⁵

	suncokretovo ulje	maslinovo ulje	bučino ulje
oleinska kiselina	26,06±1,79	77,13±2,48	26,6-27,1
linolenska kiselina	0,61±0,26	0,47±0,10	0
linolna kiselina	60,78±2,65	7,89±1,36	53,7-54,4
zasićene masne kiseline	23,37±0,36	14,51±1,65	18,5-19,0
jodni broj	129,12±1,82	80,58±1,93	-

U svrhu otkrivanja patvorenja ulja, korisnijom se pokazala jednodimenzijska tehnika ^{13}C NMR. odnosu na ^1H NMR tehniku zbog jednostavnije asignacije spektara. U protonskom spektru često dolazi do preklapanja pojedinih signala koji se koriste u izračunu. Truzzi i suradnici³⁶ su u svom istraživanju koristili bazu podataka koja im je poslužila u usporedbi dobivenih rezultata za esencijalna i biljna ulja te njihovo međusobno miješanje.³⁶ Promatrali su 14 karakterističnih signala prikazanih u tablici 2.3. Najveći raspon signala upravo je na području olefinskih ugljika (128-130 ppm) gdje na kemijski pomak i intenzitet može utjecati i sam položaj masne kiseline u trigliceridu.

Tablica 2.3.. Asignacija kemijskih pomaka za 14 odabranih signala u ^{13}C NMR spektru (L-linolna kiselina; O-oleinska kiselina; P-palmitinska kiselina)

δ /ppm	oznaka C atoma	funkcijska skupina
14,390	L18	-CH ₃
14,433	O18	-CH ₃
128,04	L12, sn-2'	ω -6, -CH=CH-
128,216	L12, sn-1', 3'	ω -6, -CH=CH-
128,383	L10, sn-1', 3'	ω -9, -CH=CH-
128,401	L10, sn-2'	ω -9, -CH=CH-
129,994	O9, sn-2'	ω -9, -CH=CH-
130,021	O9, sn-1', 3'	ω -9, -CH=CH-
130,285	L9, sn-2'	ω -9, -CH=CH-
130,312	L9, sn-1', 3'	ω -9, -CH=CH-
130,523	L13, sn-1', 3'	ω -6, -CH=CH-
173,142	L1, sn-2'	-CH ₂ -OOC-CH ₂ -
173,552	L1, sn-1', 3'	-CH ₂ -OOC-CH ₂ -
173,595	P1, sn-1', 3'	-CH ₂ -OOC-CH ₂ -

Usporedbom rezultata iz baze podataka sa izmjerenim signalima za određena esencijalna ulja i biljna ulja uspješno su odredili krivotvorenja za određene binarne smjese ovih ulja.

Kao dodatnu potvrdu krivotvorenja te miješanja esencijalnih s biljnim uljima, provedena je i analiza DOSY NMR tehnikom. S obzirom da će se manje molekule brže kretati

kroz otapalo i imati veću vrijednost difuzijskog koeficijenta i obrnuto, provedena je analiza u kojoj su se pratile dvije veće skupine molekula. Trigliceridi u uljima kreću se sporije u odnosu na terpene u esencijalnim uljima, koje su najlakše skupine molekula te se stoga kreću puno brže. Ukoliko dođe do krivotvorenja, to se može uočiti prevladavanjem manjih difuzijskih koeficijenata, a potvrđuje se usporedbom dobivenih difuzijskih koeficijenata sa podacima iz literature.³⁶

U analizi ulja, koriste se i dvodimenzijske tehnike. Boerkamp i suradnici su koristili ^1H - ^{13}C HSQC NMR tehniku za proučavanje oksidacije lipida i formiranja epoksida u hrani bogatoj istima poput majoneze.³⁷

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

2.4. Uzorci jestivih ulja

Snimljeni su spektri ^1H NMR, ^{13}C NMR i DOSY NMR za pet uzoraka jestivih ulja navedenih u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Popis uzoraka biljnih ulja

OZNAKA	ULJE
1	maslinovo ulje: Istra 1
2	maslinovo ulje: Istra 2
3	maslinovo ulje: Dalmacija 1
4	bučino ulje: Zagrebačka županija
5	suncokretovo ulje: Suncokretovo ulje <i>Zvijezda</i>

2.5. Priprema uzoraka

Otopine uzoraka ulja za snimanje spektara ^1H NMR, ^{13}C NMR i DOSY NMR pripremljene su pipetiranjem 50 μL uzorka ulja te dodavanjem 550 μL otapala, deuteriranog kloroforma, CDCl_3 .

Pripremljeni su i snimljeni spektri ^1H NMR, ^{13}C NMR i DOSY NMR za uzorke smjesa maslinovog i bučinog sa suncokretovim uljem. Prilikom pripreme smjesa maslinovog ulja i bučinog ulja sa suncokretovim uljem uzorci su pripremljeni u određenim volumnim omjerima prikazanim u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Sastav uzoraka smjese maslinovog ulja i bučinog ulja sa suncokretovim uljem

OZNAKA	ULJE	V(maslinovo ulje/bučino ulje)/ μ L	V(suncokretovo ulje)/ μ L
1a	maslinovo ulje: Istra 1 + suncokretovo ulje Zvijezda	950	50
1b	maslinovo ulje: Istra 1 + suncokretovo ulje Zvijezda	900	100
1c	maslinovo ulje: Istra 1 + suncokretovo ulje Zvijezda	800	200
1d	maslinovo ulje: Istra 1 + suncokretovo ulje Zvijezda	700	300
2a	maslinovo ulje: Istra 2 + suncokretovo ulje Zvijezda	950	50
2b	maslinovo ulje: Istra 2 + suncokretovo ulje Zvijezda	900	100
2c	maslinovo ulje: Istra 2 + suncokretovo ulje Zvijezda	800	200
2d	maslinovo ulje: Istra 2 + suncokretovo ulje Zvijezda	700	300
3a	maslinovo ulje: Dalmacija 1 + suncokretovo ulje Zvijezda	950	50
3b	maslinovo ulje: Dalmacija 1 + suncokretovo ulje Zvijezda	900	100
3c	maslinovo ulje: Dalmacija 1 + suncokretovo ulje Zvijezda	800	200
3d	maslinovo ulje: Dalmacija 1 + suncokretovo ulje Zvijezda	700	300
4a	bučino ulje + suncokretovo ulje Zvijezda	950	50
4b	bučino ulje + suncokretovo ulje Zvijezda	900	100
4c	bučino ulje + suncokretovo ulje Zvijezda	800	200
4d	bučino ulje + suncokretovo ulje Zvijezda	700	300

Nakon pripreme uzorka, uzorak se unosi u cjevčicu NMR te se snimaju odabrani spektri. Vremenski period snimanja spektara ^1H NMR vrlo je kratak s obzirom na činjenicu da je prirodna zastupljenost protona vrlo visoka (99,98%). Prilikom snimanja ^{13}C NMR spektara, u uzorke za snimanje dodaje se mala količina kromova(III) acetilacetonata u svrhu smanjenja

vremena relaksacije. Vremenski period snimanja spektara ^{13}C NMR duži je u odnosu na ^1H NMR, iz razloga što je prirodna zastupljenost ^{13}C vrlo mala (1,11%).¹⁸

2.6. Uvjeti snimanja spektara NMR

2.6.1. Uvjeti snimanja spektara ^1H i ^{13}C

Spektri ^1H i ^{13}C NMR snimljeni su na *Bruker Avance* 600 MHz NMR spektrometru u 5 mm cjevčicama sa z-gradijentnom zavojnicom pri $\theta=25^\circ\text{C}$. Kao otapalo korišten je deuterirani kloroform (CDCl_3), a kao unutarnji standard tetrametilsilan (TMS).

Za snimanje spektara ^1H NMR spektralna širina iznosila je 6172,84 Hz, a razlučivanje 0,30 Hz. Spektri su dobiveni uz 32 snimke.

Za snimanje ^{13}C NMR spektralna širina iznosila je 17985,61 Hz. Akvizicijsko vrijeme je trajalo 1,82 s, a spektri su dobiveni uz 1024 snimke.

2.6.2. Uvjeti snimanja spektara DOSY NMR

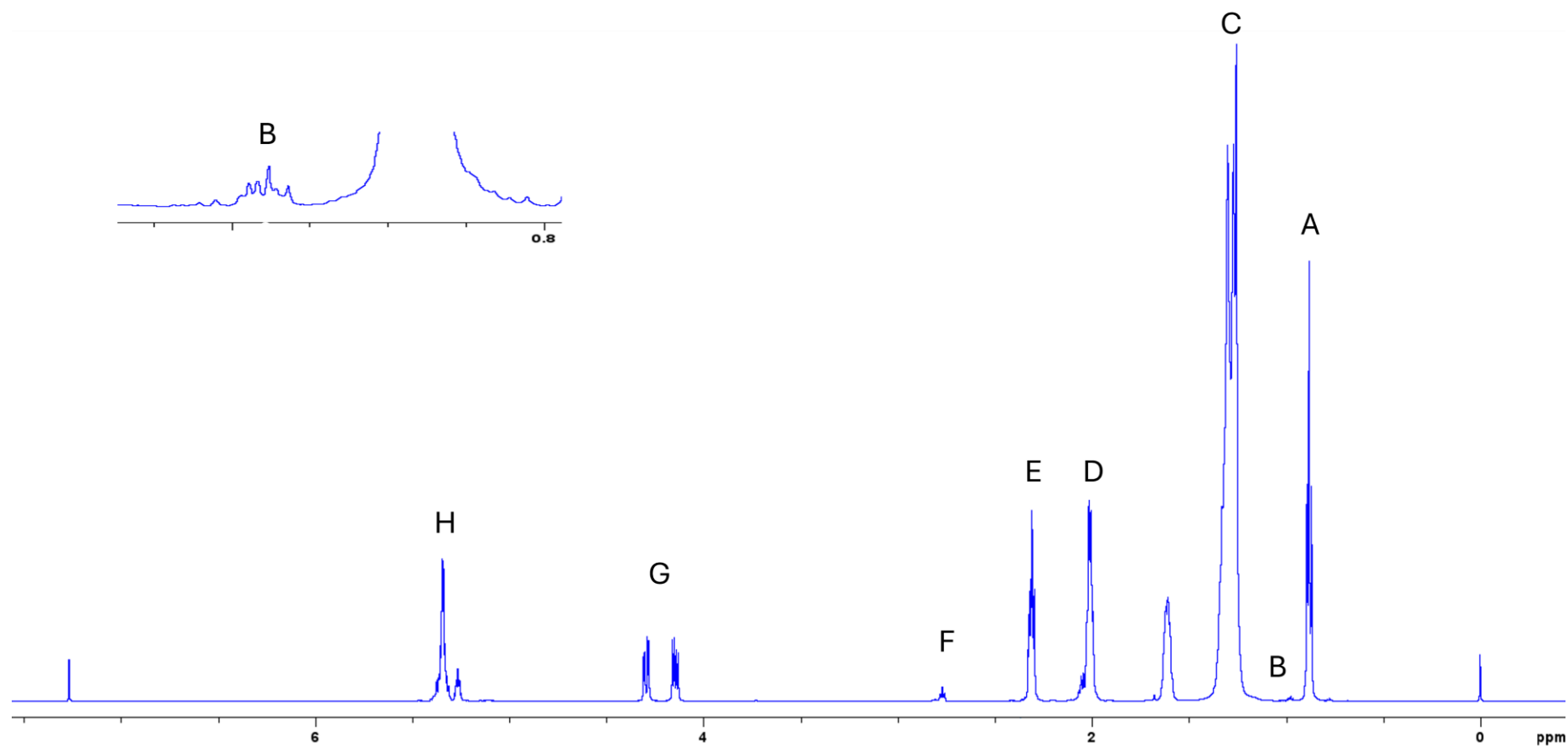
Spektri DOSY NMR snimljeni su na *Bruker Avance* 600 MHz NMR spektrometru u 5 mm inverznom probom TBI sa z-gradijentnom zavojnicom pri $\theta=25^\circ\text{C}$. Primijenjeni pulsni slijed je PGDSTE-BPP uz tzv. 3 spoil gradijenta. Spektri su dobiveni iz 16 snimki, snaga gradijentnog pulsa unutar svakog je bila u rasponu 0-0,05 G cm^{-1} . Snaga gradijenta varirala je od 2% do 95% maksimalne snage, a vrijeme trajanja gradijentnog pulsa i eksperimentalno vrijeme difuzije su bili konstantni. Kao otapalo korišten je deuterirani kloroform, a kao unutarnji standard tetrametilsilan. Dobiveni spektri obrađeni su programom *Dynamic center NMR* ver. 2.8.5.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu karakterizacije pet različitih uzoraka ulja (tri maslinova ulja, jedno bučino ulje i jedno suncokretovo ulje) te uzoraka binarnih smjesa maslinovog i suncokretovog ulja te bučinog i suncokretovog ulja snimljeni su i analizirani spektri ^1H NMR, ^{13}C NMR i DOSY NMR. Svi spektri snimljeni su na instrumentu *Bruker Avance* 600 MHz, a analizirani su programom *Bruker TopSpin* ver. 4.3.0. Analizom ^1H NMR i ^{13}C NMR određeni su udjeli vodika i ugljika u uzorcima te udjeli masnih kiselina. Analizom spektara DOSY NMR izmjereni su difuzijski koeficijenti komponenata ulja iz kojih je moguće odrediti hidrodinamičke radijuse te procijeniti molekulske mase pojedinih komponenata prisutnih u ulju.

2.7. Analiza spektara ^1H NMR

Snimljeni su spektri ^1H NMR u svrhu kvalitativne i kvantitativne karakterizacije maslinovih, bučinog i suncokretovog ulja te binarnih smjesa maslinovog i bučinog ulja sa suncokretovim uljem. Reprezentativni spektar biljnog ulja prikazan je na slici 4.1.



Slika 4.1. Reprezentativni spektar ^1H NMR uzorka maslinovog ulja 1 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C

Provedena je asignacija skupina atoma vodika čiji su kemijski pomaci karakteristični za signale funkcijskih skupina vodika prisutnih u ulju navedeni u tablici 4.1. Uzimajući u obzir složenost analiziranih uzoraka ulja, nije moguća asignacija pojedinih atoma vodika već se provodi asignacija funkcijskih skupina. Signali pojedinih skupina vodika u uljima i binarnim smjesama asignirani su usporedbom s podacima dostupnima u literaturi.^{34,38}

Tablica 4.1. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR u uzorcima jestivih biljnih ulja^{34,38}

oznaka signala	δ/ppm	Protoni	pripadnost
A	0,83-0,93	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_3$	svi acilni lanci osim linolenskih
B	0,96-0,98	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	linolenski lanci
C	1,20-1,40	$(-(\text{CH}_2)_n-)$	metilenske skupine
D	1,95-2,08	$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$	nezasićeni acilni lanci
E	2,28-2,34	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	acilni lanci
F	2,74-2,83	$-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$	linolenski i linolni lanci
G	4,26-4,34	$-\text{CH}_2-\text{OCOR}$	triacilgliceroli
H	5,29-5,42	$-\text{CH}=\text{CH}-$	nezasićene masne kiseline

Protoni terminalnih skupina $-\text{CH}_3$ oleinske, linolne i zasićenih masnih kiselina javljaju se u spektru između 0,83 i 0,93 ppm dok se signali protona linolenske kiseline javljaju između 0,96-0,98 ppm. Signali najjačeg intenziteta opaženi su u spektrima između 1,20-1,40 ppm te pripadaju metilenskim grupama $(-(\text{CH}_2)_n-)$. Područje spektra između 1,95 i 2,08 ppm pripada protonima iz nezasićenih acilnih lanaca. Signali u području kemijskih pomaka 2,74-2,83 ppm ukazuju na prisutnost metilenskih skupina okruženih dvjema dvostrukim vezama. Signali opaženi u području spektra od 5,29 do 5,42 ppm pripadaju protonima iz nezasićenih masnih kiselina, odnosno ukazuju na prisutnost olefinskih protona.

Detaljnou asignacijom i integriranjem površina u spektrima moguće je izračunati udio vodika dijeljenjem vrijednosti pojedinačnog integrala sa ukupnom sumom svih vrijednosti integrala u uzorcima ulja. Rezultati dobiveni za analizirana maslinova, bučino i suncokretovo ulje prikazani su u tablici 4.2.

Tablica 4.2. Udio (%) vodika u funkcijskim skupinama uzoraka jestivih biljnih ulja

oznaka signala	1	2	3	4	5
A	8,67	8,63	8,73	8,99	9,05
B	0,07	0,07	0,09	0,05	0,03
C	59,14	58,83	57,52	55,00	51,69
D	9,58	9,84	9,92	9,63	10,36
E	5,62	5,60	5,58	5,64	5,75
F	0,43	0,45	0,96	2,39	3,32
G	1,89	1,90	1,87	1,88	1,93
H	5,17	5,27	5,86	7,29	8,62

Raspodjela vodika po funkcijskim skupinama je izračunata i za uzorke smjesa maslinovog ulja i suncokretovog ulja te smjesa bučinog i suncokretovog ulja. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.3. i tablici 4.4.

Tablica 4.3. Udio (%) vodika u funkcijskim skupinama uzoraka smjesa maslinovog ulja i suncokretovog ulja

Oznaka signala	1a	1b	1c	1d
A	8,70	8,73	8,82	8,87
B	0,07	0,07	0,07	0,07
C	58,91	58,47	57,55	56,89
D	9,61	9,66	9,75	9,80
E	5,62	5,63	5,64	5,64
F	0,55	0,72	1,08	1,32
G	1,89	1,89	1,90	1,90
H	5,33	5,53	5,98	6,27

Tablica 4.4. Udio (%) vodika u funkcijskim skupinama uzoraka smjese bučinog ulja i suncokretovog ulja

Oznaka signala	4a	4b	4c	4d
A	8,96	8,97	9,04	9,00
B	0,04	0,04	0,05	0,04
C	54,82	57,78	54,33	53,98
D	9,67	9,66	9,75	9,84
E	5,64	5,60	5,60	5,66
F	2,44	2,47	2,59	2,67
G	1,88	1,88	1,89	1,89
H	7,34	7,41	7,58	7,67

Kod svih uzoraka kao i smjese uzoraka najveći postotak vodika javlja se u području nezasićenih metilenskih grupa ($\delta=1,20-1,40$ ppm) te on iznosi 50% i više. Prema rezultatima tablice 4.2. primjećuje se da se u područjima protona nezasićenih acilnih lanaca, kao i protona linolenskih te linolnih lanaca odnosno protona nezasićenih masnih kiselina dolazi do porasta udjela vodika za suncokretovo ulje u odnosu na maslinova te bučino ulje. Moguće je zaključiti da suncokretovo ulje sadržava veću količinu višestruko nezasićenih masnih kiselina. Dodatno, usporedbom rezultata za binarne smjese maslinovog i bučinog ulja sa suncokretovim uljem moguće je potvrditi ovu činjenicu s obzirom da povećanjem volumena suncokretovog ulja u smjesi dolazi do povećanja udjela vodika u područjima signala koji odgovaraju nezasićenim područjima masnih kiselina (signali D, F te H).

Pomoću tablice 4.1. moguće je izračunati raspodjelu polinezasićenih (PUFA), mononezasićenih (MUFA) te zasićenih masnih kiselina (SFA). Izračun udjela raspodjele kiselina izvodi se prema jednadžbama 7-9, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.5.

$$PUFA = \frac{F}{E} \quad (7)$$

$$MUFA = \frac{D}{2E} - PUFA \quad (8)$$

$$SFA = 1 - \frac{D}{2E} \quad (9)$$

Tablica 4.5. Udio (%) polinezasićenih, mononezasićenih i zasićenih masnih kiselina u uzorcima jestivih ulja te njihovim binarnim smjesama

	PUFA (%)	MUFA (%)	SFA (%)
Uzorak 1	7,59	77,68	14,72
Uzorak 1a	9,75	75,80	14,44
Uzorak 1b	12,76	73,01	14,24
Uzorak 1c	19,13	67,32	13,63
Uzorak 1d	23,29	63,13	13,58
Uzorak 2	7,98	79,79	12,23
Uzorak 2a	10,42	77,51	12,07
Uzorak 2b	11,90	75,94	12,15
Uzorak 2c	17,34	71,34	11,32
Uzorak 2d	22,73	65,63	11,63
Uzorak 3	17,21	71,73	11,06
Uzorak 3a	19,21	69,76	11,03
Uzorak 3b	21,58	67,60	10,82
Uzorak 3c	25,12	64,17	10,70
Uzorak 3d	28,49	60,71	10,80
Uzorak 4	42,36	42,98	14,65
Uzorak 4a	43,32	42,39	14,29
Uzorak 4b	44,15	42,04	13,81
Uzorak 4c	46,15	40,91	12,94
Uzorak 4d	47,09	39,8	13,1
Uzorak 5	57,79	32,39	9,82

Prema podacima iz tablice 4.5 moguće je zaključiti kako suncokretovo ulje ima najveći udio polinezasićenih masnih kiselina (57,8%), bučino ulje sadržava približno jednaku količinu polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina (42%), dok maslinova ulja sadržavaju najveću količinu monozasićenih masnih kiselina (>70%). Usporedbom rezultata za tri maslinova ulja, primjećuje se da maslinovo ulje s područja Dalmacije sadrži veći postotak polinezasićenih masnih kiselina u odnosu na uzorke s područja Istre. Dodatkom suncokretovog

ulja u svim uzorcima smjesa dovodi do povećanja udjela polinezasićenih masnih kiselina te smanjenjem mononezasićenih masnih kiselina kao i zasićenih masnih kiselina.

Pomoću tablice 4.1. moguće je izračunati udio (%) pojedinih masnih kiselina. Izračun udjela masnih kiselina izveden je usporedbom s podacima iz literature³⁴⁻³⁵ prema jednadžbama 10–13, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.6.:

$$\text{linolenska kiselina} = \frac{B}{A + B} \quad (10)$$

$$\text{linolna kiselina} = \frac{3 \times F - 4 \times B}{2 \times (A + B)} \quad (11)$$

$$\text{oleinska kiselina} = \frac{3 \times D}{4 \times (A + B)} - [\text{linolenska kiselina}] - [\text{linolna kiselina}] \quad (12)$$

$$\text{zasićene masne kiseline} = \frac{A}{A+B} - [\text{linolenska kiselina}] - [\text{linolna kiselina}] - [\text{oleinska kiselina}] \quad (13)$$

Tablica 4.6. Udio (%) linolenske, linolne, oleinske te zasićenih masnih kiselina u uzorcima jestivih ulja

	linolenska kiselina	linolna kiselina	oleinska kiselina	zasićene masne kiseline
Uzorak 1	0,83	5,65	75,69	16,99
Uzorak 2	0,78	7,08	76,96	14,39
Uzorak 3	0,98	14,38	69,06	14,60
Uzorak 4	0,52	38,64	40,78	19,54
Uzorak 5	0,37	54,08	31,09	14,09

Prema podacima iz tablice 4.6. najveći udio oleinske kiseline (gotovo 70% i više) nalazi se u uzorcima maslinovog ulja, dok se u uzorcima bučinog i sunockretovog ulja nalazi znatno manji postotak oleinske kiseline. Bučino ulje posjeduje najveći udio zasićenih masnih kiselina. Suncokretovo ulje sadrži najveći udio linolne kiseline (54%) u usporedbi sa maslinovim uljem (raspon od 5% i 14%) i bučnim uljem (38%). Usporedbom rezultata za tri maslinova ulja može se primijetiti da su udjeli linolenske, oleinske i zasićenih masnih kiselina približno jednakih

vrijednosti, no rezultati prikazuju razlike između uzoraka maslinovih ulja s područja Istre u odnosu na uzorak s područja Dalmacije u količini linolne kiseline gdje je zabilježen duplo veći postotak (14%) u odnosu na vrijednosti linolne kiseline izračunate za maslinova ulja s područja Istre. Također, maslinovo ulje s područja Dalmacije sadržava niži postotak oleinske kiseline u odnosu na maslinova ulja s područja Istre, no dobiven rezultat (69,06%) odgovara rezultatima literaturnih izvora.³⁴⁻³⁵

Usporedbom udjela kiselina dobivenih za bučino ulje s rezultatima literaturnih podataka primjećuje se da su udjeli zasićenih masnih kiselina približno jednaki te iznose oko 20%. Uzorak bučinog ulja Guillena i suradnika sadržava znatno manji udio oleinske kiseline (27%) u odnosu na uzorak s područja Zagrebačke županije (40,78%), ali i veći udio linolne kiseline (54%) u odnosu na uzorak s područja Zagrebačke županije (38,64%).³⁵

Integriranjem i izračunom prema jednadžbi (14) izračunat je jodni broj (oznaka: IV) za uzorke maslinovih, bučinog i suncokretovog ulja čiji rezultati su prikazani u tablici 4.7. Jodni broj se računa kao mjera za udio nezasićenih masnih kiselina te se, prema definiciji računa korištenjem signala spektra ¹H NMR ($\delta=5,40$ ppm) koji odgovara signalima protona nezasićenih masnih kiselina.³⁵

$$IV = 7,56 + 13,64 \times \text{oznaka } H(\%) \quad (14)$$

Tablica 4.7. Jodni broj u uzorcima jestivih ulja

uzorak	jodni broj (IV)
uzorak 1	78,07
uzorak 2	79,43
uzorak 3	87,42
uzorak 4	106,95
uzorak 5	125,11

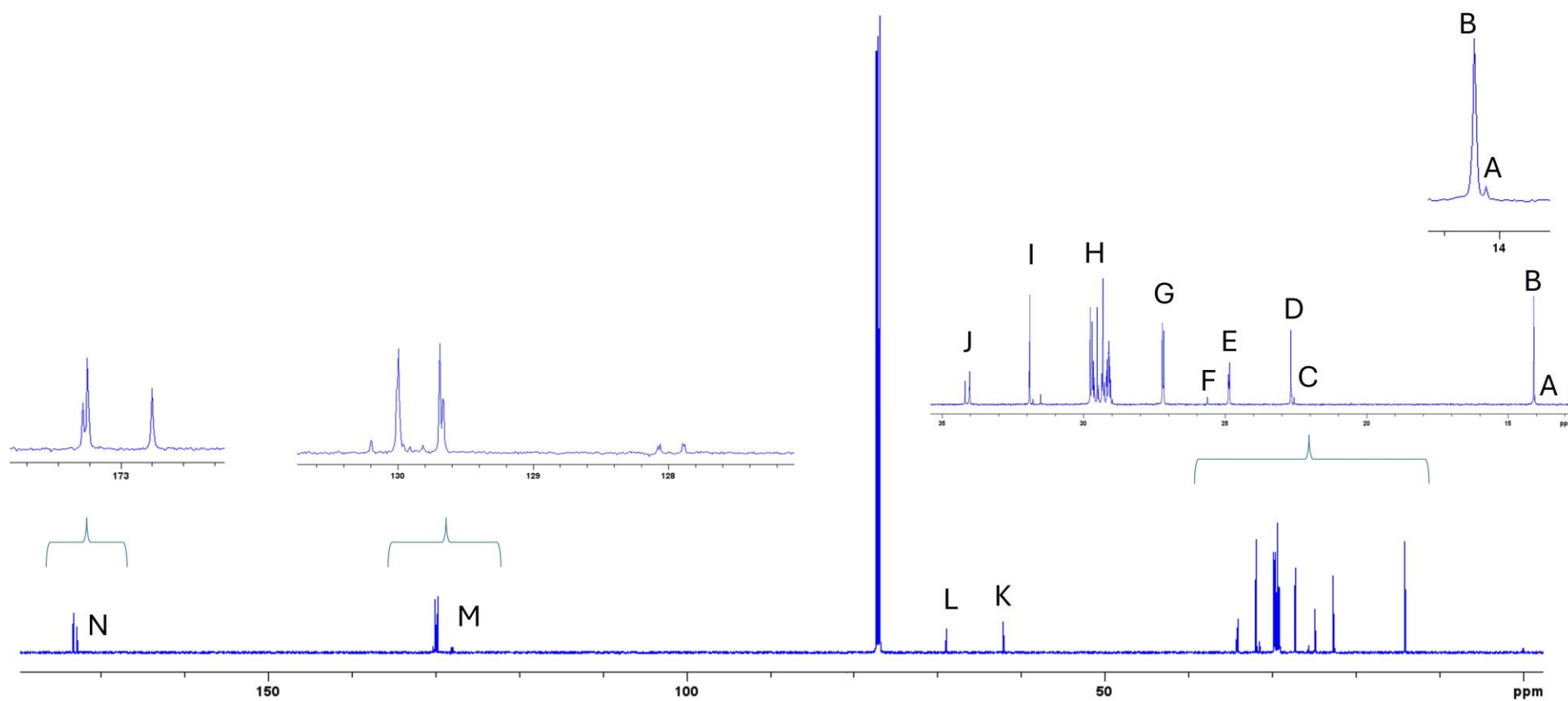
Prema podacima iz tablice 4.7. najveći udio nezasićenih masnih kiselina sadržava suncokretovo ulje (jodni broj oko 125), a najmanje maslinovo ulje (jodni broj između 75 i 90) što je u skladu sa literaturnim podacima.³⁵ Moguće je primijetiti da maslinovo ulje s područja Dalmacije ima veći udio nezasićenosti u odnosu na maslinova ulja s područja Istre. Prema rezultatima iz tablice 4.2, suncokretovo ulje sadrži najveći postotak atoma vodika (preko 8%) u odnosu na druga ulja u području nezasićenih masnih kiselina ($\delta=5,29-5,42$ ppm) što je

posljedica najvećeg postotka dvostruko nezasićene linolne kiseline, stoga su dobiveni rezultati u izračunu jednog broja u skladu sa ostalim dobivenim rezultatima.

2.8. Analiza spektara ^{13}C NMR

Snimljeni su spektri ^{13}C NMR za uzorke maslinovog, bučinog i suncokretovog ulja te za uzorke smjesa maslinovog ulja sa suncokretovim uljem i bučinog ulja sa suncokretovim uljem. Reprezentativni spektar ^{13}C NMR prikazan je na slici 4.2.

Provedena je asignacija i integracija spektara ^{13}C NMR analiziranih uzoraka ulja koristeći podatke dostupne u literaturi.⁴⁰ Iz dobivenih podataka izračunata je raspodjela različitih ugljikovih atoma prisutnih u uzorcima ulja. U tablici 4.8. navedeni su karakteristični kemijski pomaci za signale funkcijskih skupina ugljika prisutnih u uzorcima ugljika. Spektre ulja je moguće podijeliti na 4 veća područja: područje kemijskih pomaka od 0 do 35 ppm pripada području alifatskih ugljika, kemijski pomaci između 62 i 70 ppm pripadaju glicerolnim ugljicima triglicerida, olefinski ugljici se javljaju u području 124 do 134 ppm dok se karbonilni ugljici javljaju u području 172-174 ppm.



Slika 4.2. Reprezentativni spektar ^{13}C NMR uzorka maslinovog ulja 1 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C

Tablica 4.8. Asignacija kemijskih pomaka ^{13}C NMR u uzorcima jestivih ulja prema izvoru 41.

oznaka signala	δ/ppm	ugljik	pripadnost
A	14,08	$-\text{CH}_3$	linolna kiselina
B	14,12	$-\text{CH}_3$	masne kiseline osim linolne
C	22,59	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	linolna kiselina
D	22,70	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	masne kiseline osim linolne
E	24,80-24,95	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	metilenska skupina u β položaju prema karbonilnoj skupini
F	25,65	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{HC}-$	linolna/linolenska kiselina
G	27,15-27,32	$=\text{CH}-\text{CH}_2-$	alilni ugljici u lancima
H	28,98-29,83	$-\text{CH}_2-$	središnji dio lanca masnih kiselina
I	31,55-31,98	$-\text{CH}_2-$	acilni lanac
J	34,05-34,30	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	acilni lanci
K	68,00-69,00	$\text{CH}_2\text{O}-2-$	glicerolni ugljik triglicerida
L	62,00-63,00	$\text{CH}_2\text{O}-1(3)$	glicerolni ugljik triglicerida
M	124,00-134,00	$=\text{CH}-$	olefinski ugljici nezasićenih masnih kiselina
N	172,00-174,00	$-\text{COOH}$	masne kiseline

Asignacijom i integriranjem spektra moguće je izračunati udio različitih ugljikovih atoma u snimljenim uzorcima, dijeljenjem vrijednosti pojedinačnog integrala s ukupnom sumom svih vrijednosti integrala u uzorcima maslinovih, bučinog i suncokretovog ulja te su rezultati prikazani u tablici 4.9.

Tablica 4.9. Udio (%) ugljika u funkcijskim skupinama uzoraka jestivih ulja

oznaka signala	1	2	3	4	5
A	0,42	0,47	1,01	2,15	3,06
B	5,08	5,22	4,54	3,18	2,32
C	0,41	0,49	0,96	2,20	3,23
D	5,30	5,67	5,00	3,01	2,44
E	4,58	4,33	4,75	4,46	4,68
F	0,40	0,44	0,99	2,06	3,12
G	8,69	8,67	8,77	8,52	9,20
H	46,24	45,71	44,00	41,59	36,94
I	6,14	6,51	5,90	5,93	6,15
J	4,47	4,28	4,40	4,73	4,59
K	2,53	2,16	2,51	2,50	2,47
L	1,38	1,23	1,43	1,33	1,37
M	10,27	11,10	11,47	13,86	16,27
N	4,11	3,72	4,27	4,48	4,17

Udio (%) ugljika izračunat je i za uzorke smjese maslinovog i suncokretovog ulja te za smjese bučinog i suncokretovog ulja, a dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 4.10. i 4.11.

Tablica 4.10. Udio (%) ugljika u funkcijskim skupinama uzoraka smjesa maslinovog ulja i suncokretovog ulja

Oznaka signala	1a	1b	1c	1d
A	0,64	0,85	1,14	1,25
B	5,05	4,94	4,72	4,64
C	0,50	0,76	1,09	1,24
D	5,33	5,27	4,84	4,62
E	4,61	4,42	4,41	4,30
F	0,50	0,72	1,07	1,22
G	8,70	8,66	8,91	8,83
H	45,89	45,47	44,23	43,25
I	6,27	6,24	6,45	6,45
J	4,26	4,36	4,28	4,37
K	2,47	2,17	2,14	2,28
L	1,24	1,24	1,21	1,30
M	10,59	10,93	11,75	12,56
N	3,96	3,96	3,75	3,71

Tablica 4.11. Udio (%) ugljika u funkcijskim skupinama uzoraka smjesa bučinog ulja i suncokretovog ulja

Oznaka signala	4a	4b	4c	4d
A	2,27	2,36	2,90	2,40
B	2,90	3,04	3,09	2,85
C	2,41	2,59	2,77	1,56
D	3,16	3,18	3,44	2,90
E	4,71	4,80	4,50	4,70
F	2,25	2,29	2,56	2,58
G	8,41	8,64	8,88	8,80
H	40,65	40,30	39,48	40,15
I	6,25	5,85	6,29	5,86
J	4,80	4,68	4,14	4,66
K	2,34	2,58	2,09	2,27
L	1,30	1,32	1,29	1,33
M	14,37	13,83	15,04	15,59
N	4,16	4,55	3,52	4,34

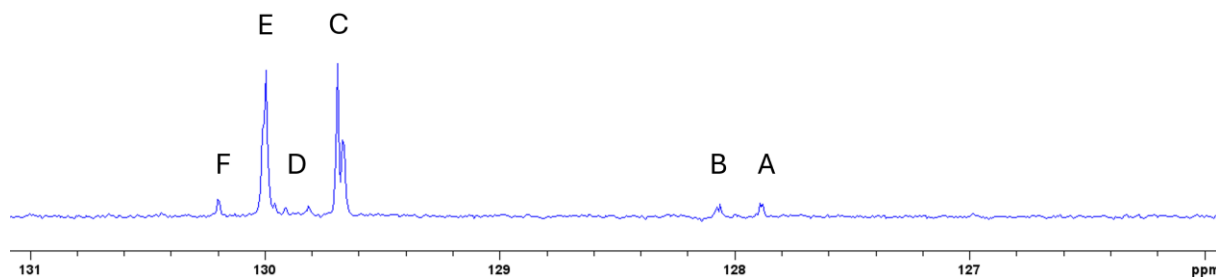
Prema podacima iz tablice 4.9. najveći postotak ugljika u svim analiziranim uzorcima odgovara skupinama -CH₂- središnjeg dijela lanaca masnih kiselina, od 37% u uzorku suncokretovog ulja do 44% u uzorcima maslinovog ulja. Također, u usporedbi maslinovog ulja iz Dalmacije i maslinovih ulja s područja Istre, uzorak s područja Dalmacije sadrži niži postotak ugljika, odnosno skupina -CH₂- smještenih unutar lanaca masnih kiselina te nešto viši postotak u području linolne kiseline što se primjećuje u rezultatima dobivenima za signale A i C. U olefinskom području ugljika raspon je između 10% za maslinova ulja, oko 14% za bučino ulje te 16% za uzorak suncokretovog ulja. Najveći postotak ugljika olefinskog područja očekivan je u suncokretovom ulju zbog najvećeg udjela linolne kiseline. U području glicerola udjeli ugljika su za sve vrste biljnih ulja približno jednakih vrijednosti.

Prema podacima dobivenima za smjese uzoraka maslinovog i suncokretovog ulja, primjećuje se da se s povećanjem volumena suncokretovog ulja povećava udio koji odgovara signalima linolne kiseline, kao i olefinskom području ugljika. Posljedično, smanjuje se udio ugljika koji odgovara svim ostalim masnim kiselinama osim linolne (signali B i D). Također,

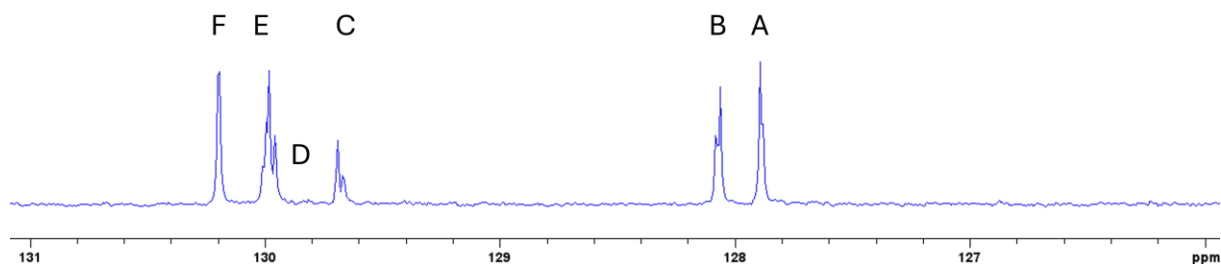
povećanjem volumena suncokretovog ulja smanjuje se udio skupina $-\text{CH}_2-$ smještenih unutar lanaca masnih kiselina s 45% na 43%.

Rezultati dobiveni za uzorke smjesa bučinog ulja sa suncokretovim uljem pokazuju sličan trend kao i preostale smjese maslinovog i suncokretovog ulja što znači da povećanjem volumena suncokretovog ulja dolazi do povećanja udjela ugljika linolne kiseline odnosno olefinskih ugljika (s 14% na 15,5%), dok u područjima ugljika za ostale masne kiseline dolazi do smanjenja udjela.

U svrhu detaljnije karakterizacije smjesa biljnih ulja, što je osobito važno kod analize patvorenih ulja uspoređeno je područje spektra koje pripada olefinskom području od 124 do 134 ppm. U navedenom području javljaju se signali oleinske i linolne masne kiseline. Usporedbom olefinskog područja moguće je zaključiti je li maslinovo ulje miješano s određenim volumenom nekog drugog ulja primjerice suncokretovog ulja, s obzirom da je u maslinovom ulju očekivan veći udio oleinske kiseline u odnosu na linolnu kiselinu. Na ots 4.3. i 4.4. prikazani su spektri koji odgovaraju olefinskim područjima za maslinovo ulje s područja Istre (uzorak 1) te suncokretovo ulje (uzorak 5).



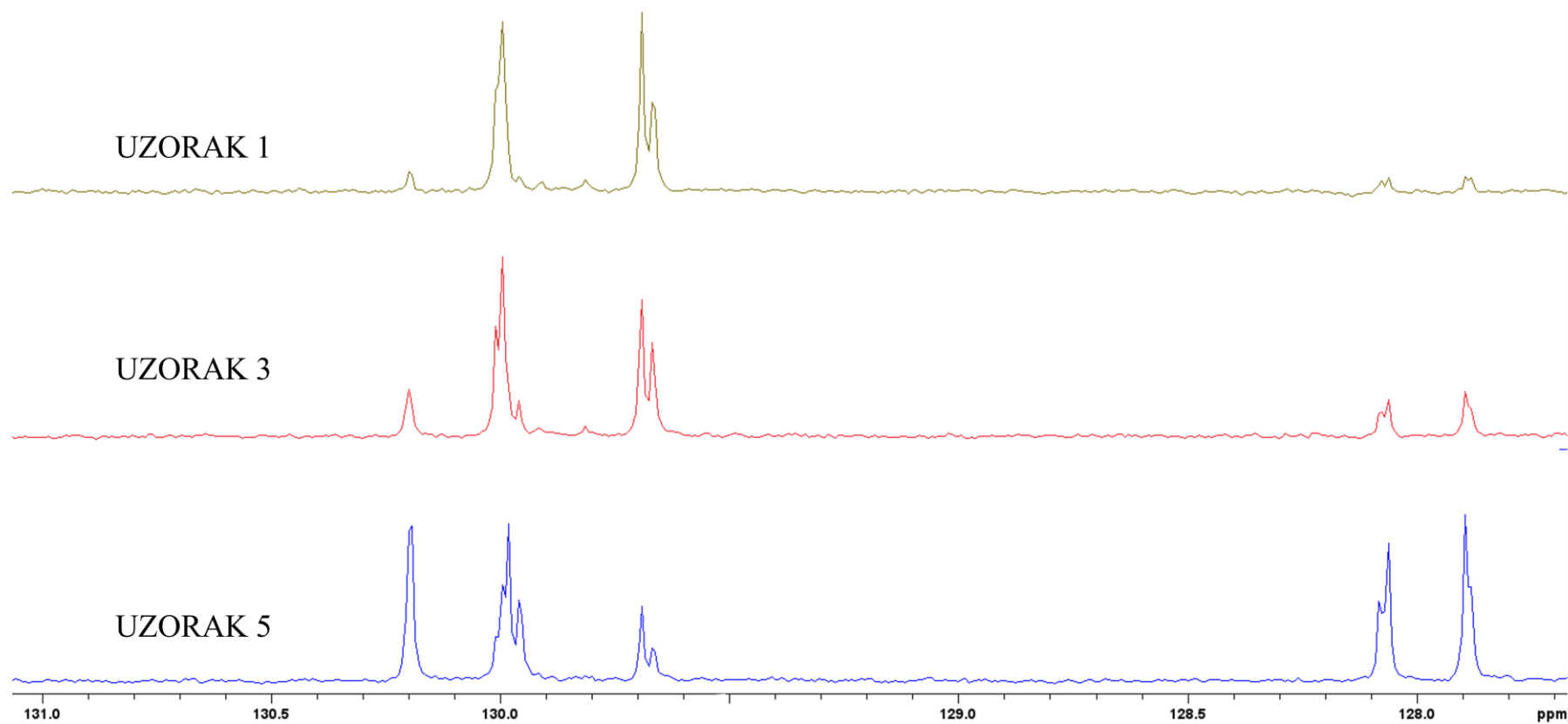
Slika 4.3. Spektar ^{13}C NMR olefinskog područja uzorka 1, snimljen pri 600 MHz i 25°C



Slika 4.4. Spektar ^{13}C NMR olefinskog područja uzorka 5, snimljen pri 600 MHz i 25°C

Usporedbom dobivenih spektara sa spektrima prethodnih istraživanja⁴²⁻⁴³, signali A, B, D te F odgovaraju ugljikima linolne kiseline, dok signali C i E odgovaraju ugljikima oleinske kiseline. Sukladno navedenom, očekivano je da će signali C i E biti jačeg intenziteta u uzorku maslinovog ulja u odnosu na signal u uzorku suncokretovog ulja što je vidljivo sa slika 4.3. i 4.4. Time se može potvrditi kako se radi o maslinovom ulju koje ne sadrži suncokretovo ulje u svom sastavu.

Temeljem prethodnih rezultata u kojima je prikazan veći udio linolne kiseline u uzorku maslinovog ulja s područja Dalmacije (uzorak 3), provedena je usporedba spektara uzoraka 1, 3 i 5 te je navedeni spektar prikazan na slici 4.5.



Slika 4.5. Spektri ^{13}C NMR olefinskog područja uzoraka 1, 3 i 5, snimljeni pri 600 MHz i 25°C

Prema slici 4.5. primjećuje se povećanje intenziteta signala u uzorku 3 za signale koji odgovaraju linolnoj kiselini u odnosu na uzorak 1. Povećanje intenziteta signala, što posljedično rezultira povećanjem udjela ugljika u područjima linolne kiseline može se objasniti dodatkom male količine suncokretovog ulja u sam uzorak maslinovog ulja. U tablici 4.12 izračunati su udjeli pojedinih ugljika koji odgovaraju oleinskoj odnosno linolnoj kiselini.

Tablica 4.12. Udio (%) ugljika u području olefinskih ugljika nezasićenih masnih kiselina

	δ/ppm	uzorak 1	uzorak 3	uzorak 5
A	127,86-127,93	3,39	8,55	19,58
B	128,03-128,11	2,88	7,65	18,35
C	129,62-129,74	40,42	31,21	9,71
D	129,78-129,93	6,53	5,07	2,65
E	129,93-130,05	42,99	39,20	30,16
F	130,18-130,23	3,79	8,32	19,54

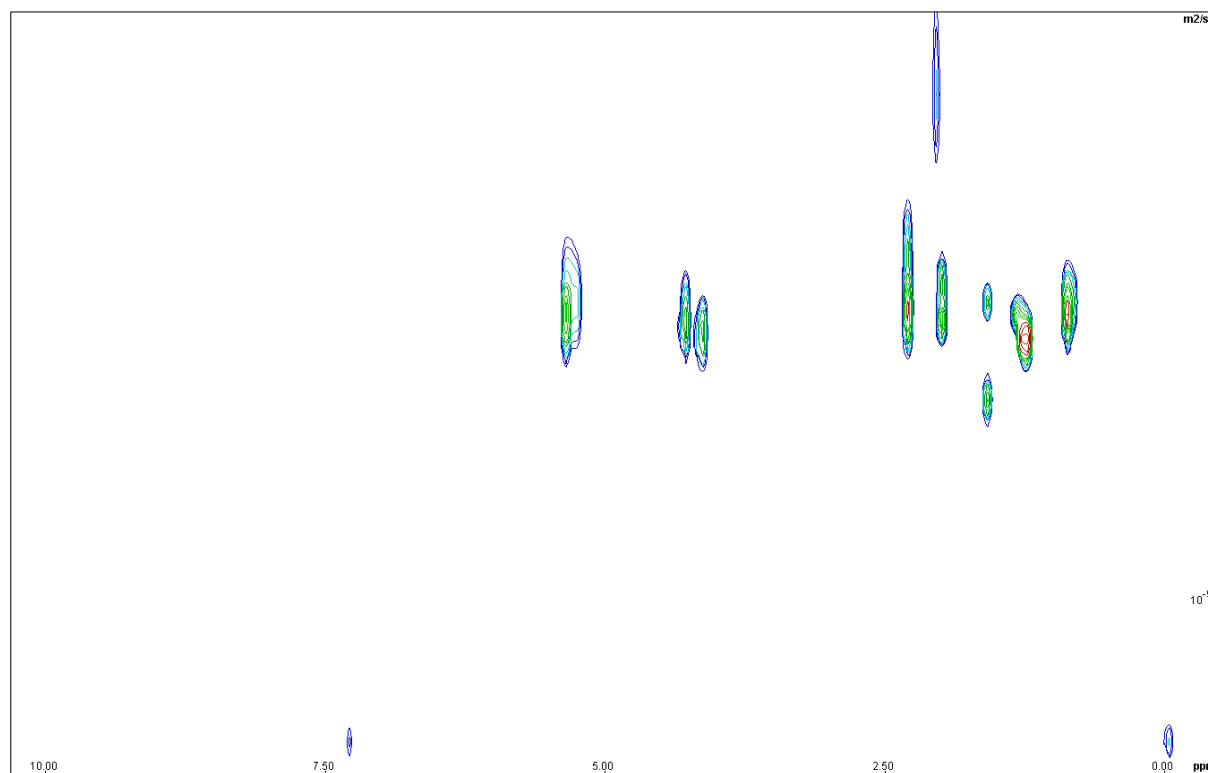
Prema rezultatima dobivenim u tablici 4.12 dodatno je potvrđeno da postoji razlika u sastavu maslinovih ulja s područja Istre i Dalmacije. Signali koji odgovaraju ugljicima linolne kiseline (A, B, F) sadrže veće postotke ugljika u uzorku 5, a sukladno pretpostavkama, u uzorku 3 javlja se veći udio ugljika u odnosu na uzorak 1 od približno 5% u navedenim područjima kemijskog pomaka.

2.9. Analiza spektara DOSY NMR

Snimljeni su spektri DOSY NMR za uzorke maslinovih, bučinog i suncokretovog ulja kao i uzorke binarnih smjesa maslinovog ulja 1 i suncokretovog ulja (uzorci 1a-1d). Reprezentativni spektar prikazan je na slici 4.6.

Analiza spektara DOSY NMR potvrđuje prisutnost različitih kemijskih vrsta s obzirom na dobivene rezultate difuzijskih koeficijenata koji upućuju na prisutnosti većih molekula koje se sporije kreću kroz otapalo (manji difuzijski koeficijenti) odnosno manjih molekula koje se kreću brže (veći difuzijski koeficijenti).

U tablicama 4.13 i 4.14 prikazane su izmjerene vrijednosti difuzijskih koeficijenata te standardna odstupanja izmjerenih difuzijskih koeficijenata pri $\vartheta=25^{\circ}\text{C}$



Slika 4.6. Reprezentativni spektar DOSY NMR uzorka maslinovog ulja 1 snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i $\vartheta=25^{\circ}$

Tablica 4.13. Srednje vrijednosti difuzijskih koeficijenata uzoraka biljnih ulja (1-5) te binarnih smjesa maslinovog i suncokretovog ulja (1a-1d)

	δ/ppm	Uzorak (1)	Uzorak (1a)	Uzorak (1b)	Uzorak (1c)	Uzorak (1d)	Uzorak (2)	Uzorak (3)	Uzorak (4)	Uzorak (5)
$D / 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	0,87	3,23	3,17	3,08	3,11	3,21	2,57	3,25	2,86	3,13
	1,25	3,69	3,55	3,57	3,57	3,53	3,05	3,77	3,41	3,64
	1,60	4,66	3,06	2,98	3,12	3,02	2,19	3,89	2,76	4,00
	2,01	3,39	3,21	3,16	3,18	3,11	2,61	3,51	2,70	3,31
	2,30	3,33	3,22	3,21	3,23	3,16	2,25	3,44	2,84	3,31
	2,76	2,76	2,87	3,03	3,16	3,28	3,44	3,42	3,24	3,50
	4,14	3,44	3,35	3,31	3,35	3,29	2,91	3,49	3,12	3,40
	4,28	3,52	3,31	3,34	3,29	3,55	2,98	3,52	3,28	3,48
	5,25	3,22	2,97	2,89	3,04	2,85	1,39	3,38	1,99	3,35
	5,33	3,35	3,19	3,16	3,22	3,15	2,48	3,44	2,79	3,41

Tablica 4.14. Standardna odstupanja (σ) izmjerenih difuzijskih koeficijenata uzoraka biljnih ulja (1-5) te binarnih smjesa maslinovog i suncokretovog ulja (1a-1d)

	δ/ppm	Uzorak (1)	Uzorak (1a)	Uzorak (1b)	Uzorak (1c)	Uzorak (1d)	Uzorak (2)	Uzorak (3)	Uzorak (4)	Uzorak (5)
$\sigma / 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	0,87	2,71	2,93	3,10	3,36	3,08	3,06	3,70	4,03	4,05
	1,25	2,16	2,36	2,02	2,10	2,58	2,06	2,76	2,46	2,35
	1,60	2,92	1,92	2,02	1,94	2,02	2,48	1,96	2,12	2,42
	2,01	1,33	1,51	1,47	1,67	1,67	1,72	1,97	1,64	1,51
	2,30	3,23	3,20	3,05	3,00	3,74	5,28	3,51	4,14	3,76
	2,76	2,10	2,35	2,29	2,69	3,01	3,91	2,85	2,77	2,64
	4,14	3,00	2,86	3,06	3,16	3,49	3,74	3,86	3,31	4,42
	4,28	3,17	4,54	4,36	4,24	3,36	3,00	4,31	3,61	3,85
	5,25	4,59	5,13	5,28	5,47	5,37	5,05	5,57	4,88	4,76
	5,33	3,61	4,09	3,97	3,48	4,05	6,43	3,95	4,22	2,78

Prema rezultatima prikazanima u tablici 4.13. može se zaključiti da dobivene vrijednosti difuzijskih koeficijenata približno iznose $3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

Najniža vrijednost difuzijskog koeficijenta je $1,39 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ u uzorku maslinovog ulja 2 pri kemijskom pomaku 5,25 ppm što podrazumijeva prisutnost najvećih molekula, a najveća vrijednost difuzijskog koeficijenta je $4,66 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ u uzorku maslinovog ulja 1 pri kemijskom pomaku 1,60 ppm te se stoga tu javljaju veličinom najmanje molekule prisutne u ulju. Među uzorcima maslinovih ulja, uzorak 2 ima najniže vrijednosti difuzijskih koeficijenata, a uzorak 3 najviše vrijednosti difuzijskih koeficijenata. Vrijednosti difuzijskih koeficijenata za uzorak bučinog ulja su u rasponu $1,99 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ do $3,41 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, te se može zaključiti da se u uzorku bučinog ulja nalaze veće molekule u odnosu na maslinova i suncokretovo ulje. Vrijednosti difuzijskih koeficijenata za uzorak suncokretovog ulja su u rasponu od $3,13 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ do $4,00 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

Iz dobivenih vrijednosti difuzijskih koeficijenata moguće je daljnje računanje hidrodinamičkih radijusa (R_H) prema Stokes-Einsteinovoj jednadžbi za molekule sfernog oblika (5), prema literaturnim podacima. Pomoću modela predloženog od Evansa i suradnika (5) i (6) moguće je izračunati molekulske mase različitih molekula unutar jestivih ulja.

§ 5. ZAKLJUČAK

Istraživanja u sklopu ovog diplomskog rada su potvrdila da je spektroskopija NMR pogodna metoda za analizu kompleksnih smjesa poput jestivih ulja. Analizirana su tri maslinova, bučino i suncokretovo ulje te binarne smjese u različitim volumnim uljima maslinovog i bučinog sa suncokretovim uljem tehnikama ^1H , ^{13}C te DOSY NMR.

Tehnikom ^1H NMR izračunati su udjeli vodika pojedinih funkcijskih skupina prisutnih u uljima koji su poslužili u daljnjem računanju udjela masnih kiselina. Signali najvećeg intenziteta se u spektrima javljaju u području kemijskih pomaka od 1,20 do 1,40 ppm. Navedeno područje spektra pripada protonima nezasićenih acilnih lanaca čiji je udio u svim analiziranim uzorcima iznosio iznad 50 %. Suncokretovo ulje sadržava veću količinu višestruko nezasićenih masnih kiselina što se i pokazalo u dobivenim rezultatima za binarne smjese maslinovog i bučinog sa suncokretovim uljem gdje dolazi do porasta udjela vodika u područjima koja odgovaraju višestruko nezasićenim lancima.

Integriranjem signala u spektrima ^1H NMR izračunati su udjeli polinezasićenih, mononezasićenih i zasićenih masnih kiselina. Rezultati su pokazali da uzorci maslinovih ulja sadrže najveći udio mononezasićenih masnih kiselina u postotku većem od 70%, dok suncokretovo ulje sadrži najveći udio polinezasićenih masnih kiselina u postotku od oko 57%. Izračunati su udjeli linolenske, linolne, oleinske te zasićenih masnih kiselina u kojima je potvrđeno da maslinovo ulje u najvećoj količini sadrži mononezasićenu oleinsku masnu kiselinu (>70%), a suncokretovo ulje najveći udio polinezasićene linolne masne kiseline (>54%). Od analiziranih maslinovih ulja, maslinovo ulje s područja Dalmacije sadrži veću količinu linolne kiseline (14%) te manju količinu oleinske kiseline (~ 69%) u odnosu na maslinova ulja s područja Istre. Izračunom jednog broja potvrđen je najveći stupanj nezasićenosti u uzorku suncokretovog ulja (IV=125,11) nakon čega slijedi bučino ulje (IV=106,95), a zatim ulje s područja Dalmacije (IV=87,42).

Integriranjem spektara ^{13}C NMR izračunati su udjeli ugljika pojedinih funkcijskih skupina. Najveći postotak ugljika u svim uzorcima ugljika odgovara središnjem lancu masnih kiselina. Rezultati dobiveni tehnikama ^1H i ^{13}C za udjele vodika i ugljika međusobno su usklađeni, odnosno najveći postotci odgovaraju istim funkcijskim skupinama, a to su acilni lanci.

Međusobnom usporedbom uzoraka maslinovih ulja zabilježen je veći udio ugljika linolne kiseline i olefinskih ugljika za maslinovo ulje s područja Dalmacije. U analizi binarnih smjesa, postotak ugljika za navedena područja raste porastom volumena suncokretovog ulja.

U svrhu određivanja patvorenja, u uzorku maslinovog ulja s područja Dalmacije uočeni su veći udjeli ugljika za područja koja odgovaraju linolnoj kiselini te odgovarajući porast intenziteta signala što može uputiti na sumnju dodatka određenog volumena suncokretovog ulja u uzorak maslinovog ulja.

Analizom spektara DOSY NMR određeni su difuzijski koeficijenti svih uzoraka ulja, kao i uzoraka binarnih smjesa uzorka maslinovog ulja Istra 1 sa suncokretovim uljem. Dobiveni rezultati upućuju da se u uzorku bučinog ulja nalaze veće molekule s obzirom na dobivene najniže vrijednosti difuzijskih koeficijenata. Prosječno, vrijednosti difuzijskih koeficijenata u uljima iznose približno $3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

APT	<i>J</i> -modulirana spinska jeka engl. <i>attached proton test</i>
CDCl ₃	deuterirani kloroform engl. <i>deuterated chloroform</i>
COSY	korelacijska spektroskopija engl. <i>corelation spectroscopy</i>
DEPT	tehnika povećanja intenziteta signala zbog prijenosa polarizacije engl. <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DOSY	spektroskopija NMR s poredanom difuzijom engl. <i>diffusion ordered spectroscopy</i>
GC FID	engl. <i>gas chromatography with flame ionization detection</i>
HMBC	tehnika korelacije među različitim jezgrama kroz više veza engl. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	tehnika korelacije među različitim izravno vezanim jezgrama engl. <i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HPLC	tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>
HSQC	tehnika korelacije među različitim izravno vezanim jezgrama engl. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
INEPT	višepulsna tehnika za pojačanje intenziteta signala ¹³ C engl. <i>insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer</i>
IV	jodni broj engl. <i>iodine value</i>
MUFA	mononezasićene masne kiseline engl. <i>monounsaturated fatty acids</i>

NMR	nuklearna magnetska rezonancija engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	nuklearni Overhauserov efekt engl. <i>nuclear Overhauser effect</i>
PGDSTE	engl. <i>pulsedfield-gradient double stimulated echo</i>
PGDSTE-BPP	engl. <i>pulse gradient double stimulated echo with bipolar pulse pair</i>
PGSTE	engl. <i>pulse gradient stimulated echo</i>
ppm	mjerna jedinica kemijskog pomaka engl. <i>parts per million</i>
PUFA	polinezasićene masne kiseline engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>
SFA	zasićene masne kiseline engl. <i>saturated fatty acids</i>
TMS	tetrametilsilan

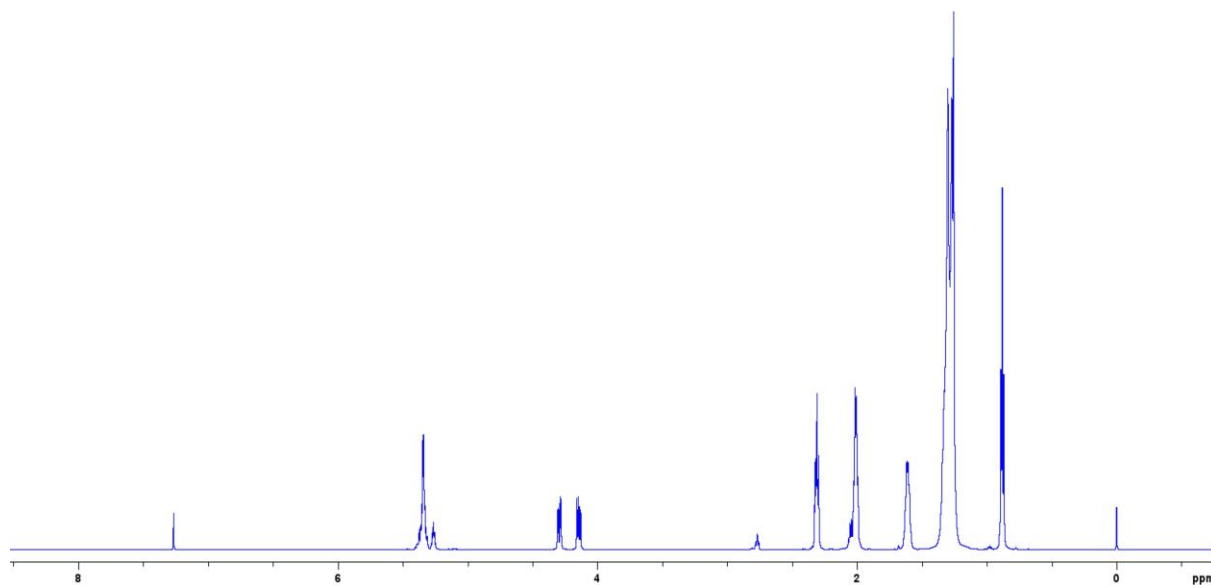
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. I. Un, S. Ok, *J Food Sci Technol* **55** (2018) 2476–2487.
2. F. Lia, B. Vella, M. Z. Mangion, C. Farrugia *Foods* **9** (2020) 689
3. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_01_11_229.html (datum pristupa 19. ožujka 2024.)
4. D. J. Machate, E. S. P. Melo, L. C. S. de Oliveira, D. Bogo, F. S. Michels, A. Pott, L. F. Cavalheiro, R. C. A. Guimraes, K. C. Freitas, P. A. Hiane, A. R. L. Caires, M. L. B. Vilela, R. J. Olivera, V. A. Nascimento, *Front. Nutr* **9** (2022) 977813
5. J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 619
6. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/maslina> (datum pristupa 19. ožujka 2024.)
7. J. Pejović, M. Barbarić, C. Jakobušić Brala, Maslinovo ulje sastav i biološka aktivnost fenolnih spojeva, *Farmaceutski glasnik* **70**, 2014
8. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_01_7_173.html (datum pristupa 13. ožujka 2024.)
9. D. Ancora, J. Milavec, A. Gradišek, M. Cifelli, A. Sepe, T. Apih, B. Zalar, V. Domenici, *J. Agric. Food Chem* **69** (41) (2021) 12081–12088.
10. M. Križanić, *UV-Vis i NMR analiza polifenolnih sastavnica maslinovih ulja*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021, str. 1–4
11. M. Gorzynik-Debicka, P. Przychodzen, F. Cappello, A. Kuban-Jankowska, A. Marino Gammazza, N. Knap, M. Wozniak, M. Gorska-Ponikowska *Int. J. Mol. Sci.* **19**(3) (2018) 686.
12. M. Moslavac, *Utjecaj kultivara i geografskog porijekla na udjel i sastav sterola u bučinom ulju*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021, str. 2–5
13. G. Procida, B. Stanicher, F. Cateni, M. Zacchigna, *J. Sci. Food Agric*, **93**(5) (2013) 1035–1041.
14. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/58775#:~:text=U%20ljudskoj%20prehrani%20suncokretovo%20ulje%20jedno%20je%20od> (datum pristupa 13. ožujka 2024)
15. V. Bathini, S. K. Kalakandan, M. Pakkirisamy, K. Ravichandran *Pharmacogn. J.* **10**(4) (2018) 753–757

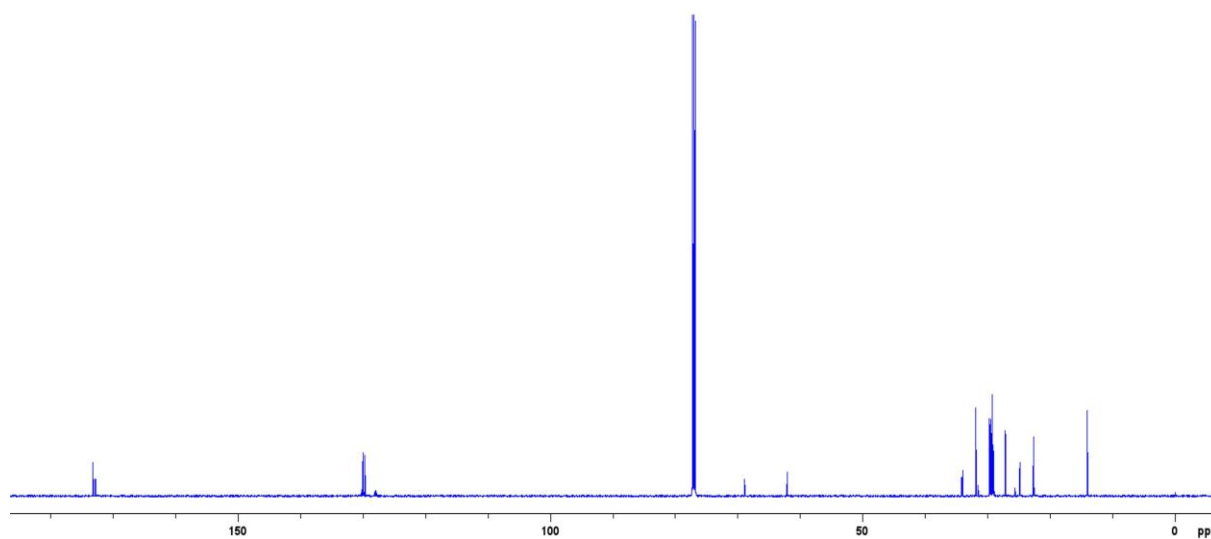
16. S. Khan, S. Choudhary, A. Pandey, M. K. Khan, G. Thomas, *Emergent Life Sci. Res.* **1(1)** (2015) 1–3
17. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013
18. T. Gašparac, *Analiza uzoraka nafte različitih API gustoća jedno i dvosimenzijskom spektroskopijom NMR*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020.
19. E. Durand, M. Clemancey, A. A. Quoineaud, J. Verstrete, D. Espinat, J. M. Lancelin, *Energy Fuels* **22** (2008) 2604–2610.
20. D. Raljević, *Utjecaj aromatičnosti na oksidacijsku stabilnost nafte*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2023.
21. M. Djetelić Ibrahimpašić, *Istraživanje utjecaja metal na agregaciju asfaltena iz nafte i naftnih frakcija pomoću spektroskopije NMR*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020.
22. P. Tepeš, P. Novak, *Kem. Id.* **57** (2008) 165–173.
23. C. S. Johnson, *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp* **34** (1999) 203–256.
24. T. Parella, *Pulse Program Catalogue, NMRGuide – Topspin 3.0*, Bruker BioSpin GmbH, 2010., str. 399
25. E. Durand, M. Clemancey, J. Lancelin, J. Verstraete, D. Espinat, A. Quoineaud, *Energy Fuels* **24** (2010) 1051–1062.
26. R. Evans, Z. Deng, A. K. Rogerson, A. S. McLachlan, J. J. Richards, M. Nillson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52** (2013) 3199–3202.
27. C. R. Girelli, F. Calo, F. Angile, L. Mazzi, D. Barbini, F. P. Fanizzi *Foods* **9** (2020) 1797
28. B. Nieva-Echevarría, E. Goicoechea, M. J. Manzanos, M. D. Guillen, *Food Res. Int.* **66** (2014) 379–387.
29. A. Gradišek, M. Cifelli, D. Ancora, A. Sepe, B. Zalar, T. Apih, V. Domenici, *J. Agric. Food Chem.* **69** (2021) 12073–12080.
30. V. Maestrello, P. Solovyev, L. Bontempo, L. Mannina, F. Camin, *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **21** (2022) 4056–4075.
31. L. Mannina, A. P. Sobolev, A. Segre, *Spectrosc. Eur.* **15(3)** (2003) 6–14.

32. N. P. Vidal, J. Rahimi, B. Kroetsch, M. M. Martinez, *LWT--Food Sci. Technol.*, **173** (2023) 114409
33. F. Calo, C. R. Girelli, S. C. Wang, F. P. Fanizzi *Foods* **11** (2022) 113
34. G. Vigli, A. Philippidis, A. Spyros, P. Dais, *J. Agric Food Chem* **51** (2003) 5715–5722.
35. M. D. Guillén, A. Ruiz *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105** (2003) 688–696.
36. E. Truzzi, L. Marchetti, S. Benevenuti, A. Ferroni, M. C. Rossi, D. Bertelli, *J. Agric. Food Chem.* **69** (2021) 8276–8286.
37. V. J. P. Boerkamp, D. W. H. Merks, J. Wang, J. P. Vincken, M. Hennebelle, J. P. M. van Duynhoven, *Food Chem.* **390** (2022) 133145
38. L. Triyasmono, U. Holzgrabe *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1** (2023) 100010
39. F. Lia, B. Vella, M. Zammit Mangion, C. Farrugia *Foods* **9** (2020) 689
40. E. Alexandri, R. Ahmed, H. Siddiqui, M. I. Choudhary, C. G. Tsiafoulis, I. P. Gerothanassis *Molecules* **22**(10) (2017) 1663
41. R. Garcia, A. Pires, N. Martins, T. Carvalho, A. J. Burke, M. J. Cabrita, *Eur. Food Res. Technol.* **245** (2019) 2479–2488.
42. T. Mavromoustakos, M. Zervou, G. Bonas, A. Kolocouris, P. Petrakis, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**(4) (2000) 405–411.
43. J. M. McKenzie, K. R. Koch, *S. Afr. J. Sci.* **100** (2004) 349–345.

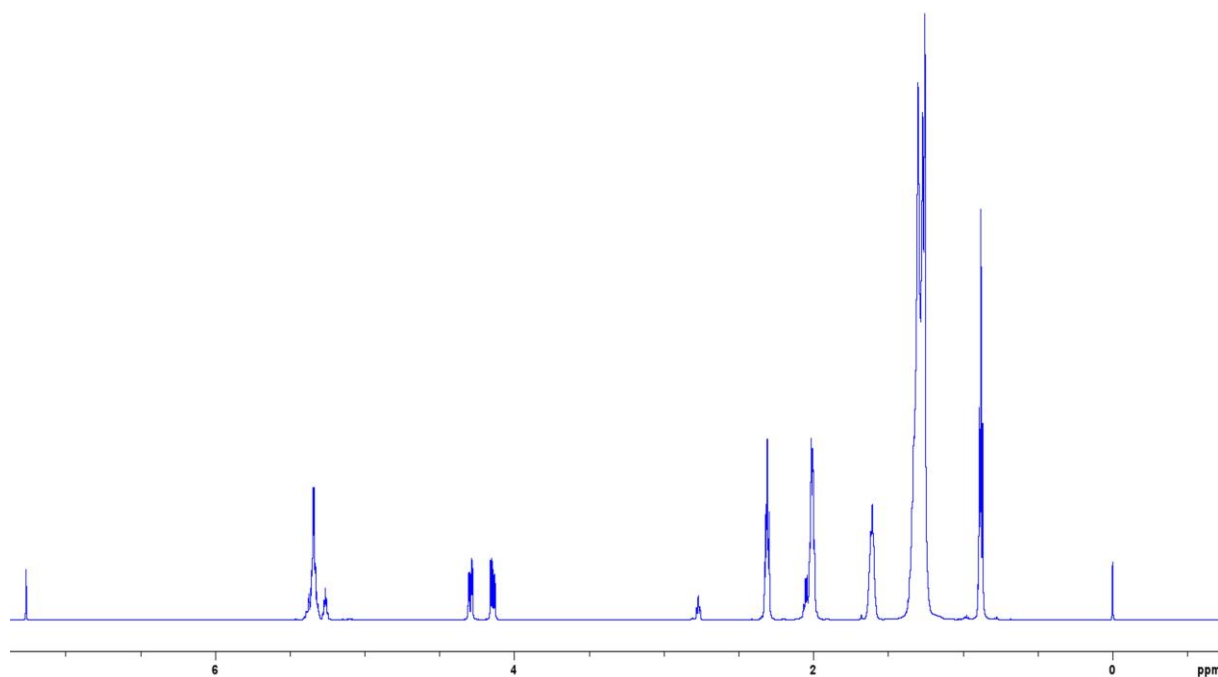
§ 8. DODATAK



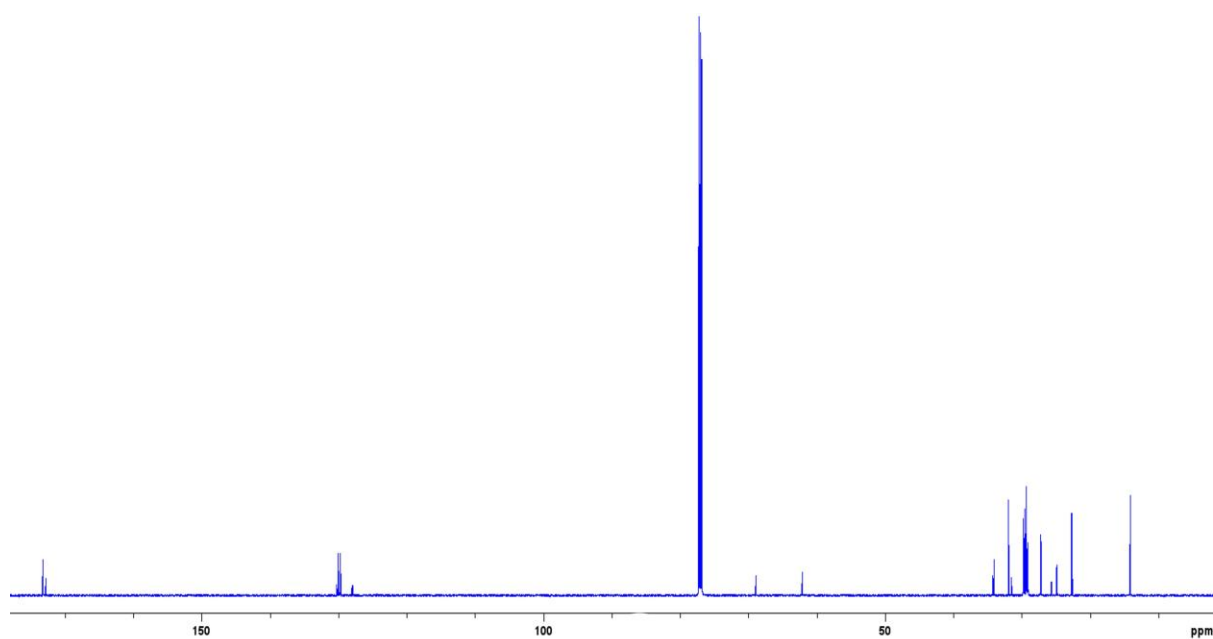
Slika D1. Spektar ^1H NMR uzorka 1a snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



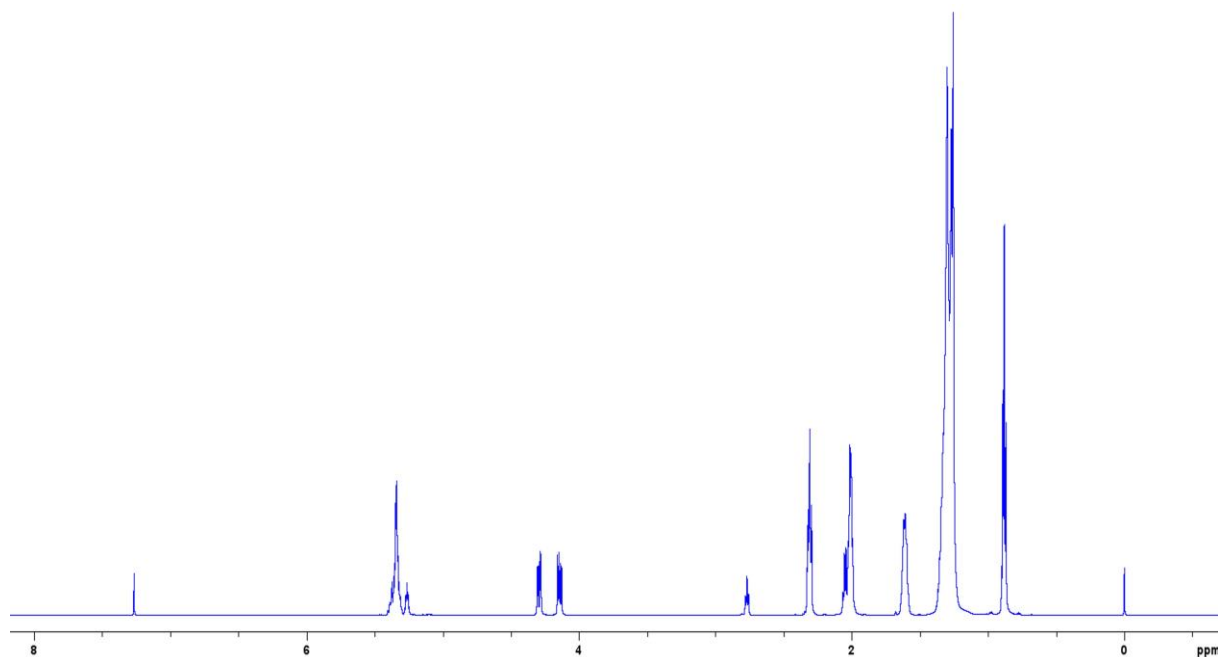
Slika D2. Spektar ^{13}C NMR uzorka 1a snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



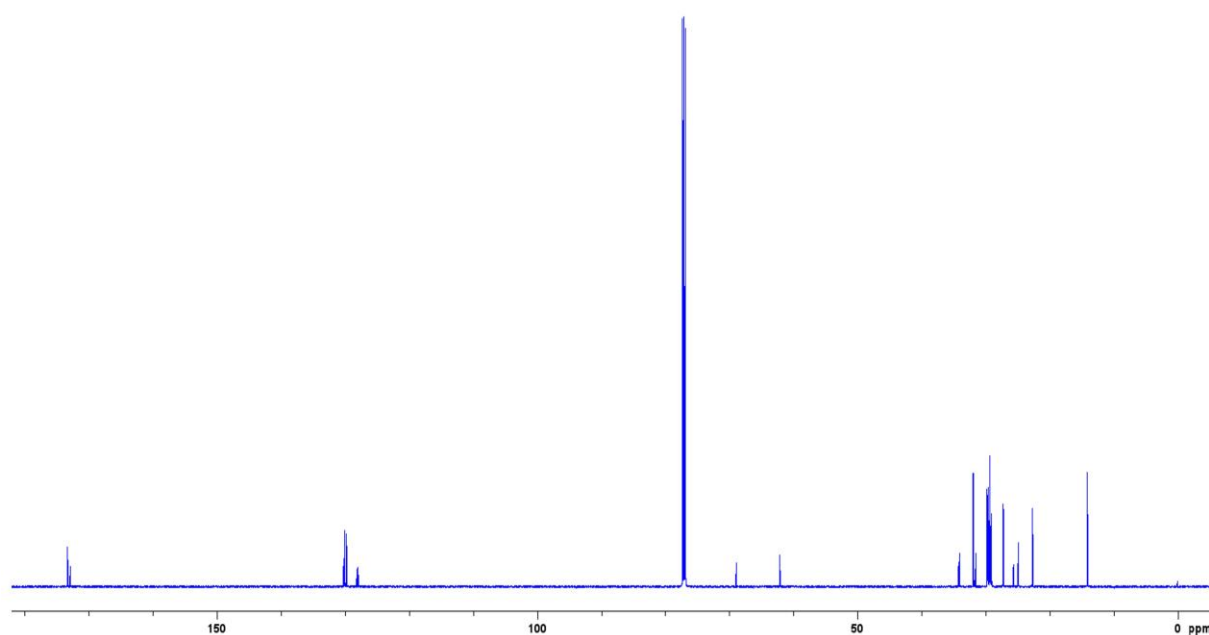
Slika D3. Spektar ^1H NMR uzorka 1b snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



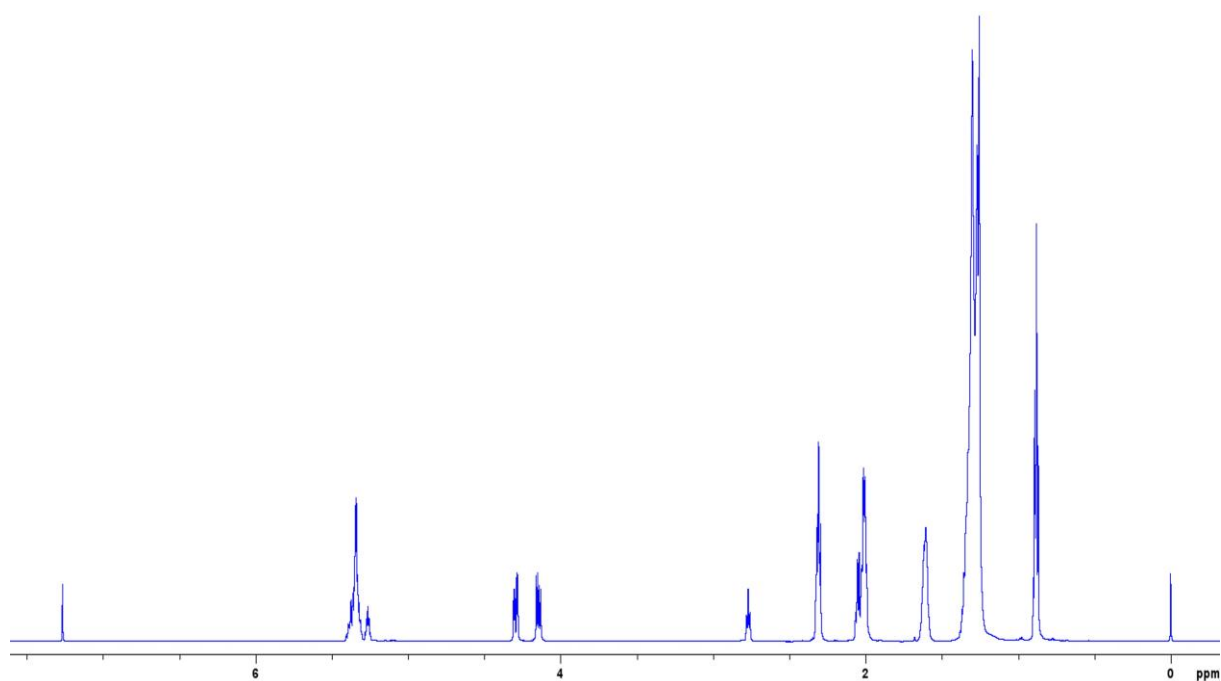
Slika D4. Spektar ^{13}C NMR uzorka 1b snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



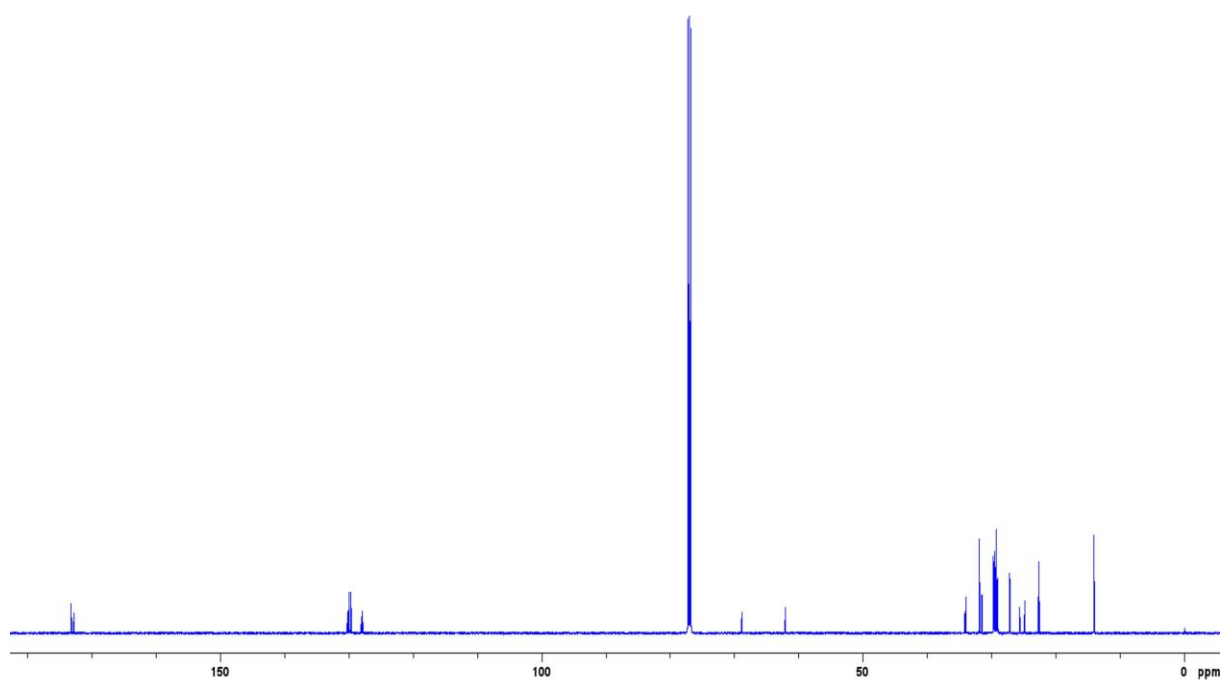
Slika D5. Spektar ^1H NMR uzorka 1c snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



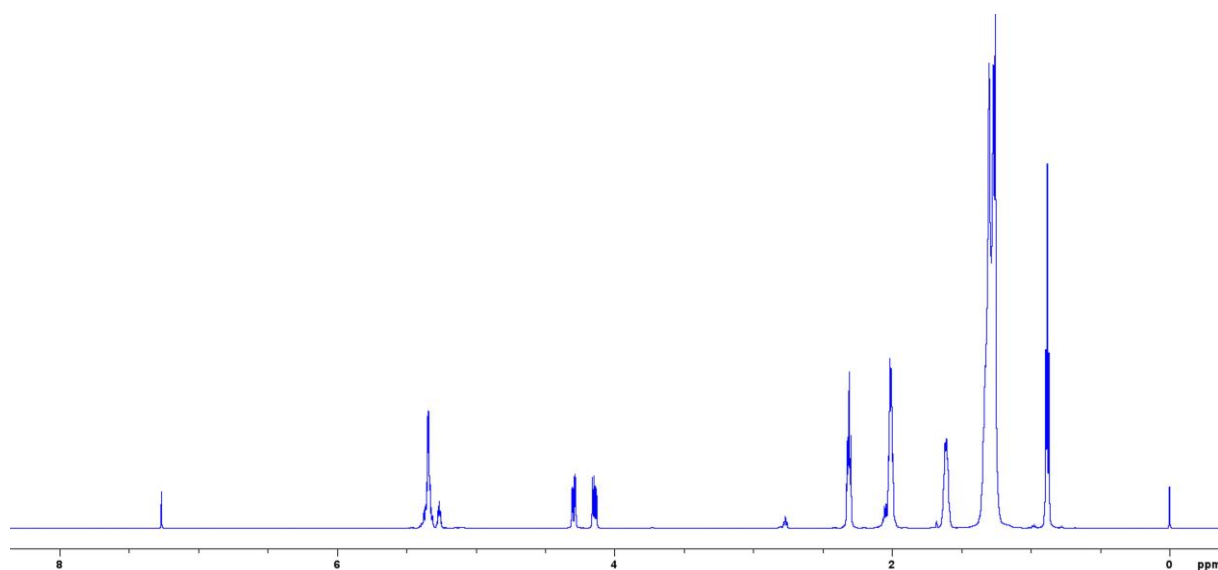
Slika D6. Spektar ^{13}C NMR uzorka 1c snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



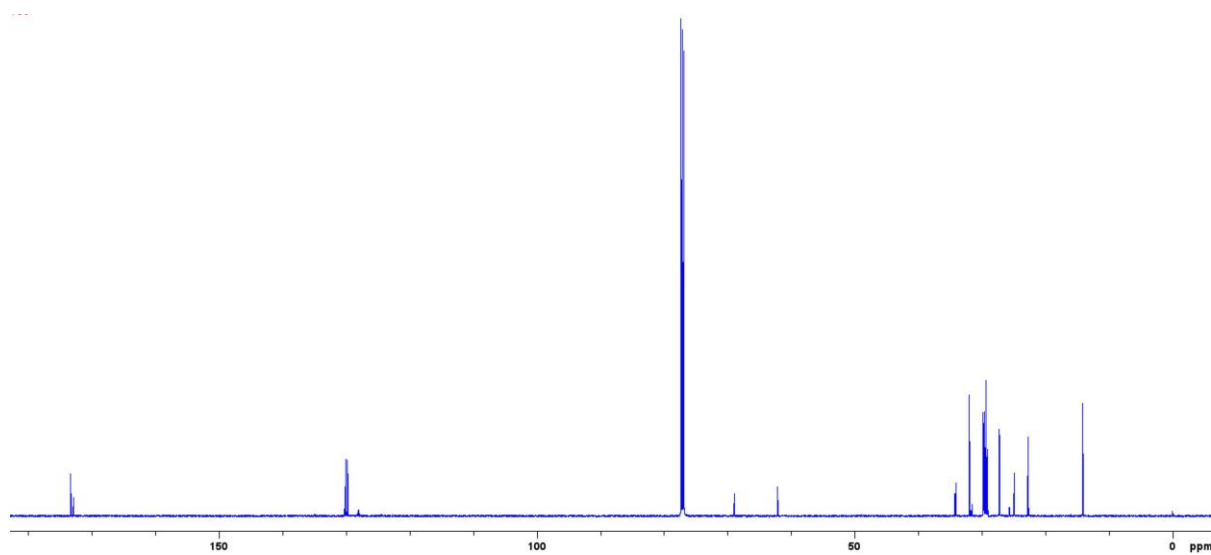
Slika D7. Spektar ^1H NMR uzorka 1d snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



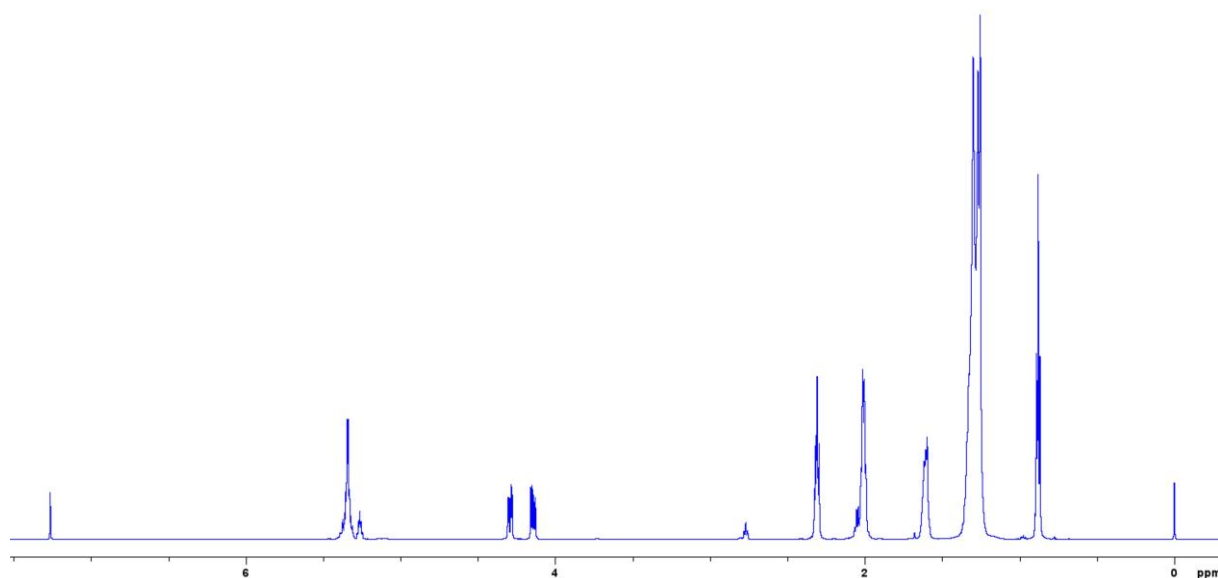
Slika D8. Spektar ^{13}C NMR uzorka 1d snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



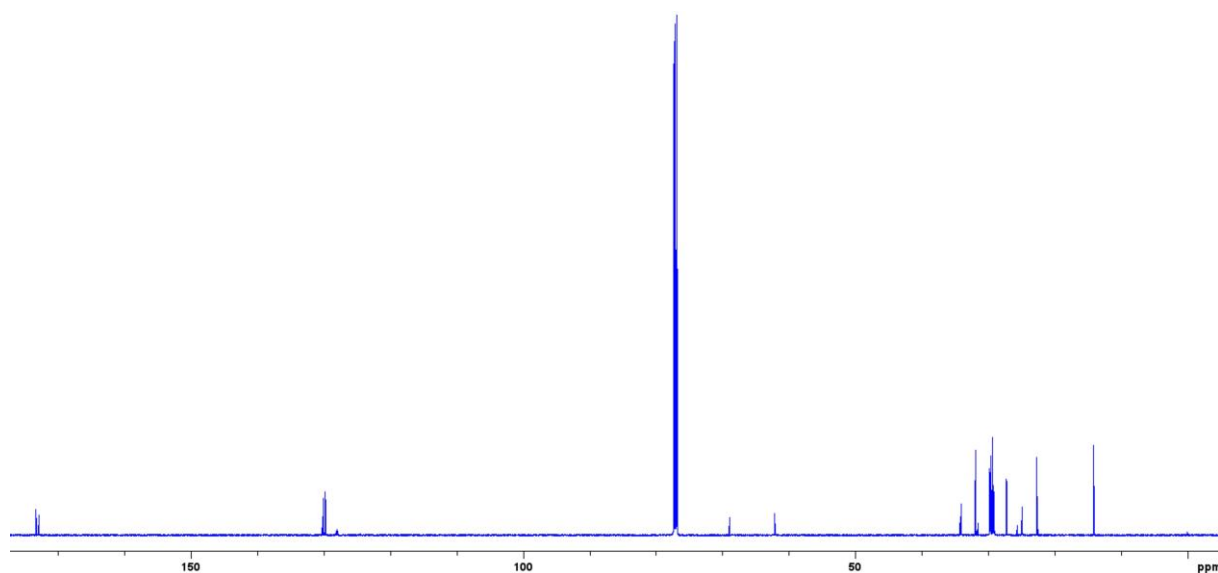
Slika D9. Spektar ^1H NMR uzorka 2 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



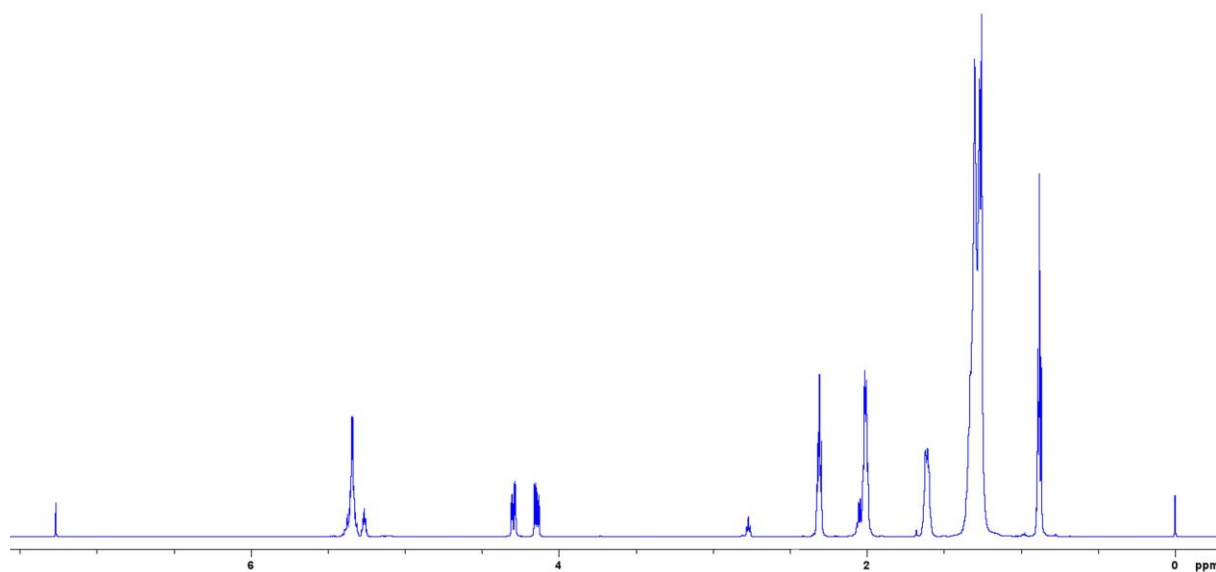
Slika D10. Spektar ^{13}C NMR uzorka 2 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



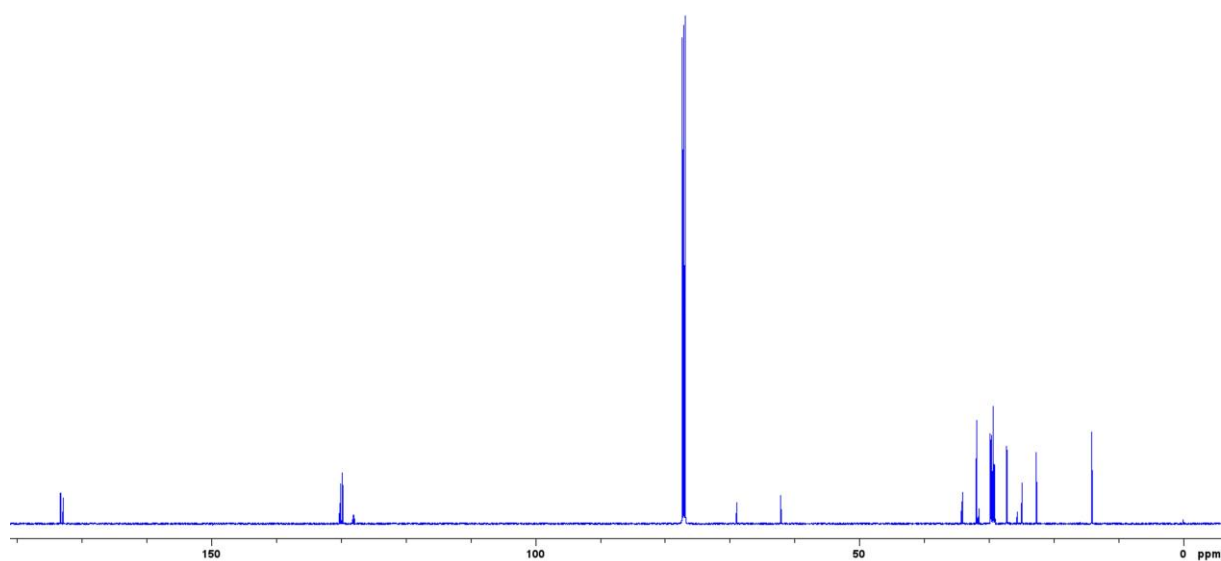
Slika D11. Spektar ^1H NMR uzorka 2a snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



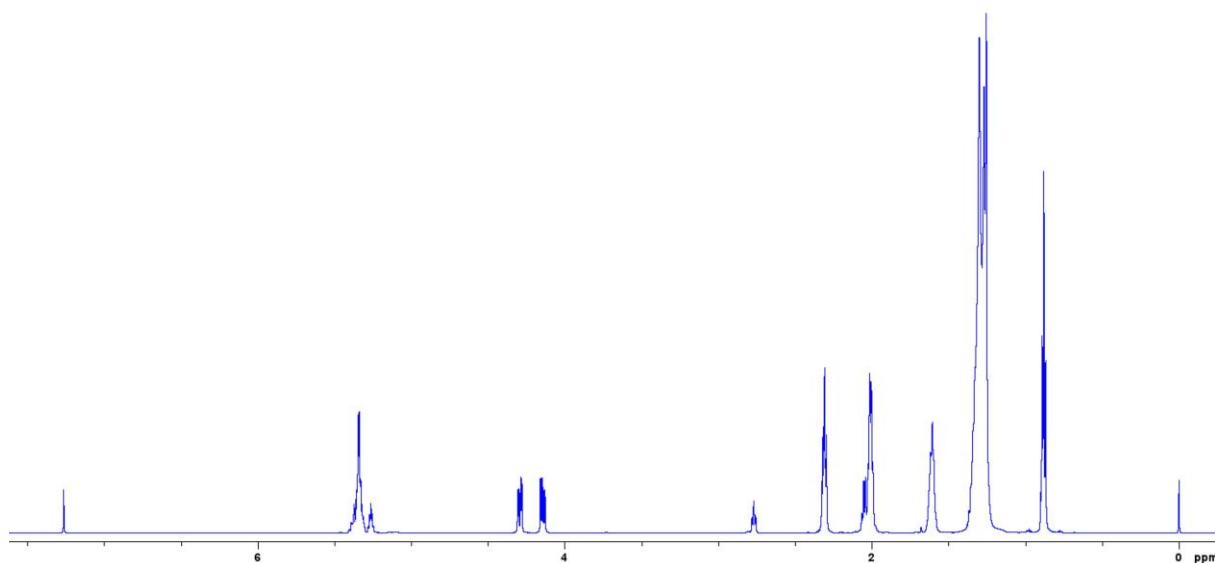
Slika D12. Spektar ^{13}C NMR uzorka 2a snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



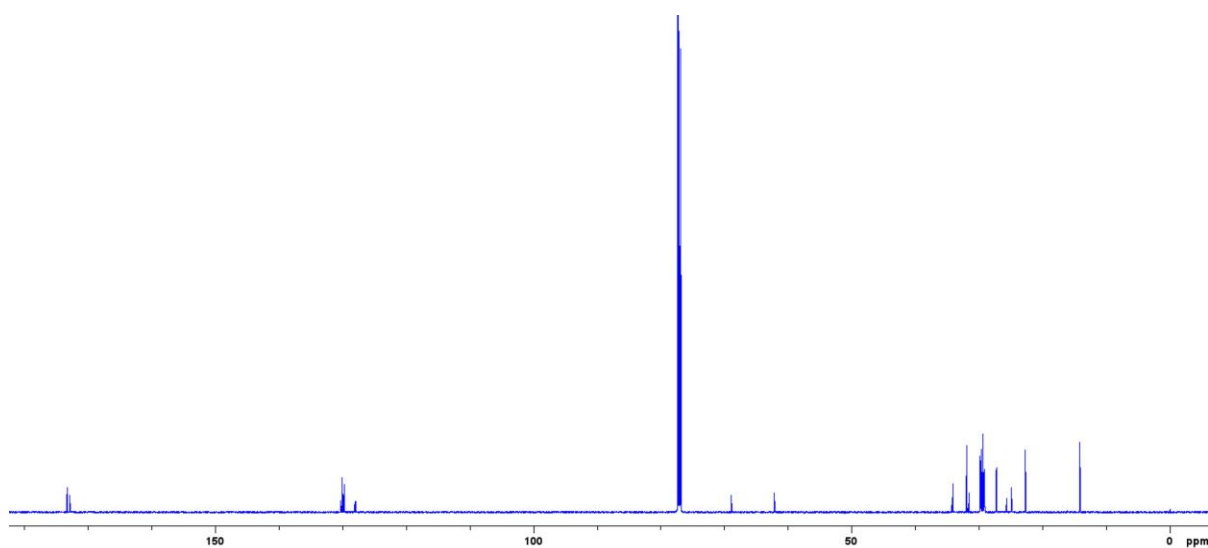
Slika D13. Spektar ^1H NMR uzorka 2b snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



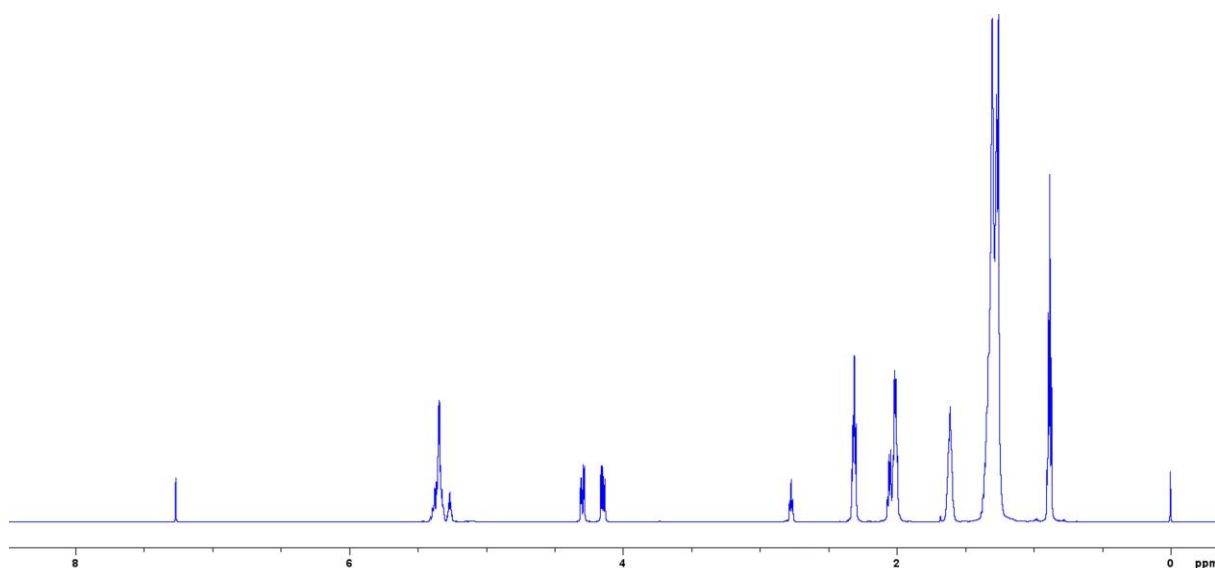
Slika D14. Spektar ^{13}C NMR uzorka 2b snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



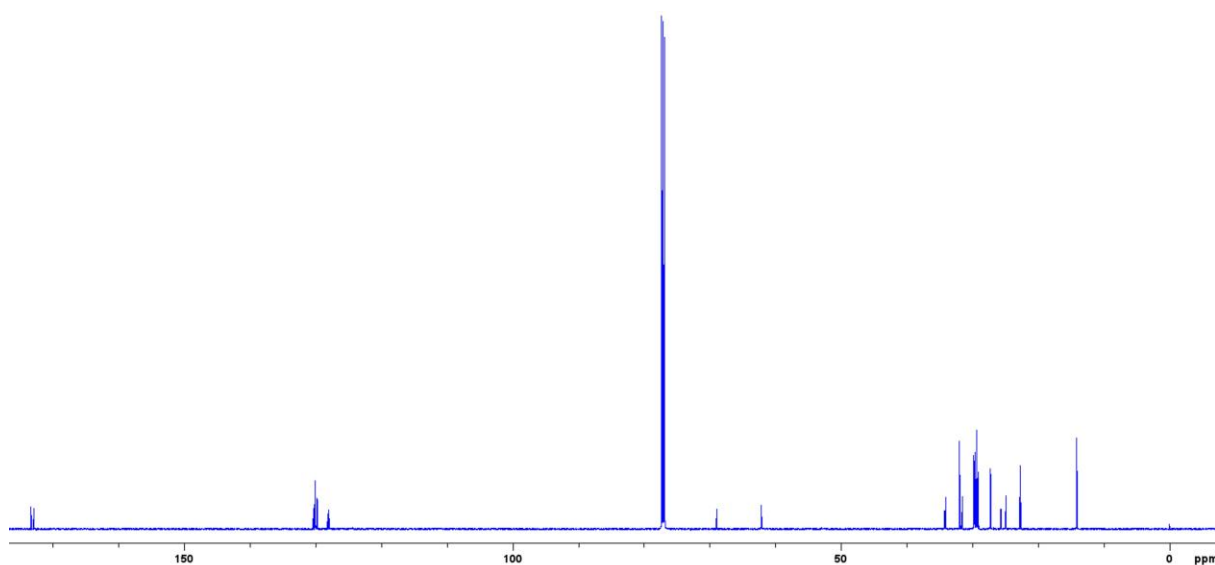
Slika D15. Spektar ^1H NMR uzorka 2c snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



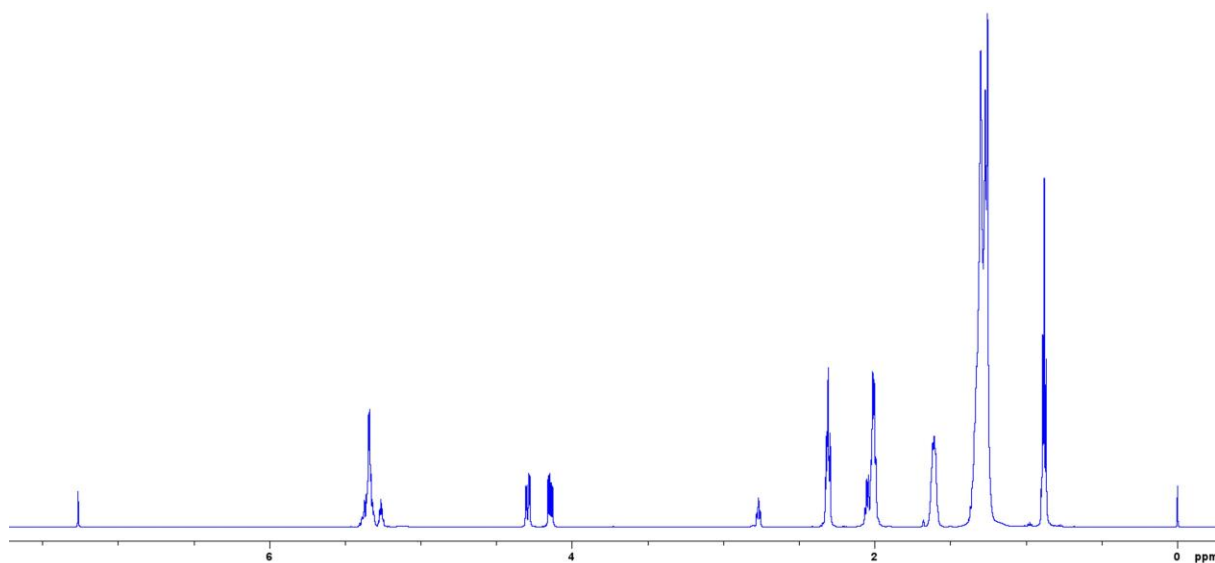
Slika D16. Spektar ^{13}C NMR uzorka 2c snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



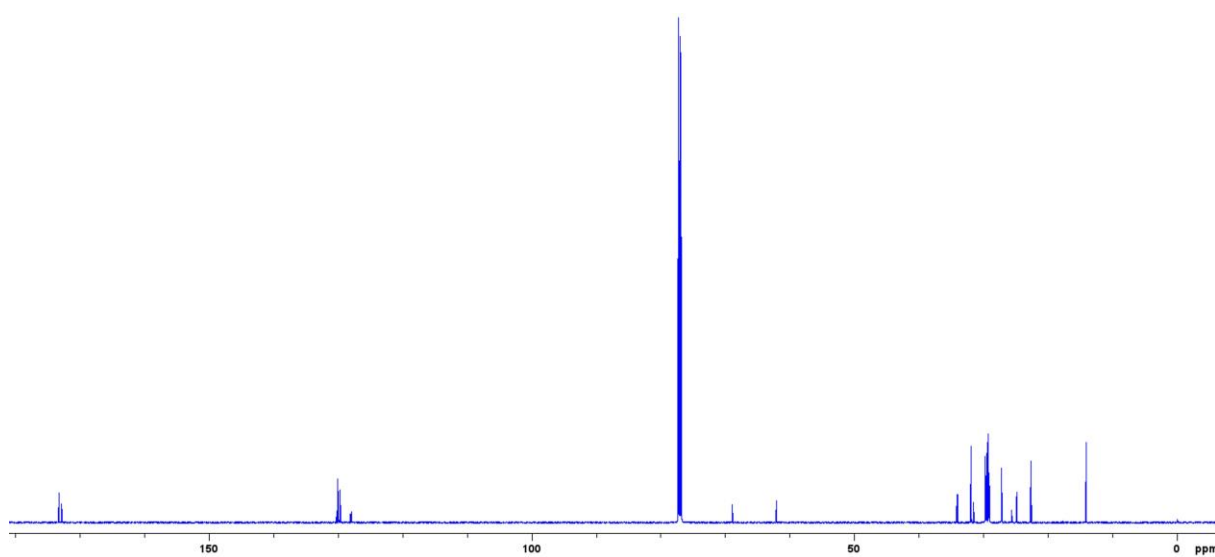
Slika D17. Spektar ^1H NMR uzorka 2d snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



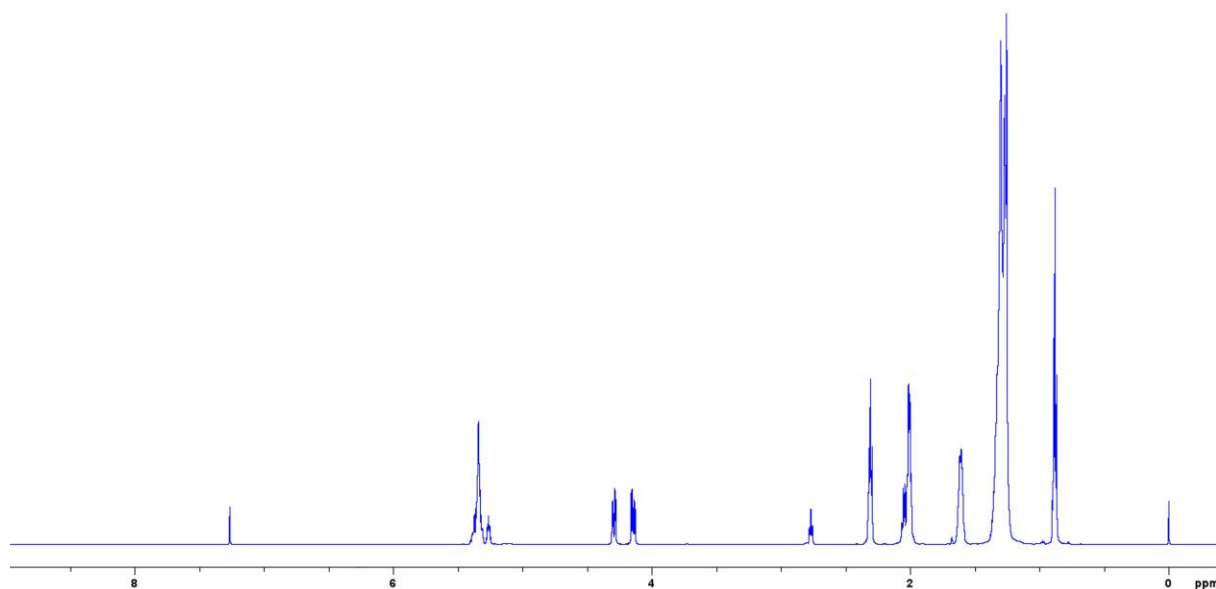
Slika D18. Spektar ^{13}C NMR uzorka 2d snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



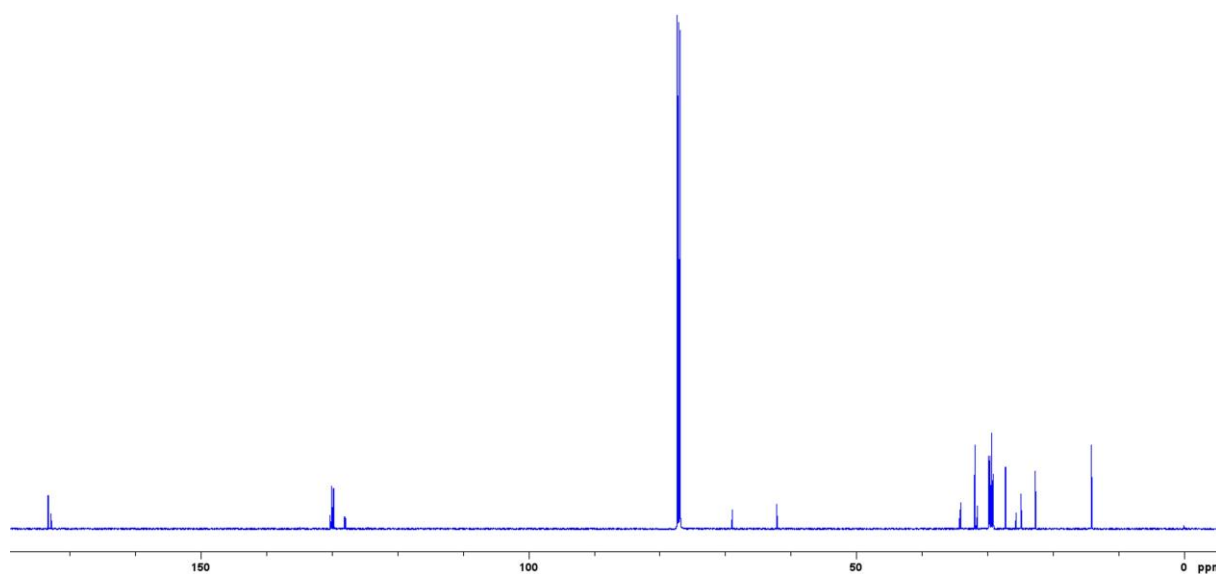
Slika D19. Spektar ^1H NMR uzorka 3 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



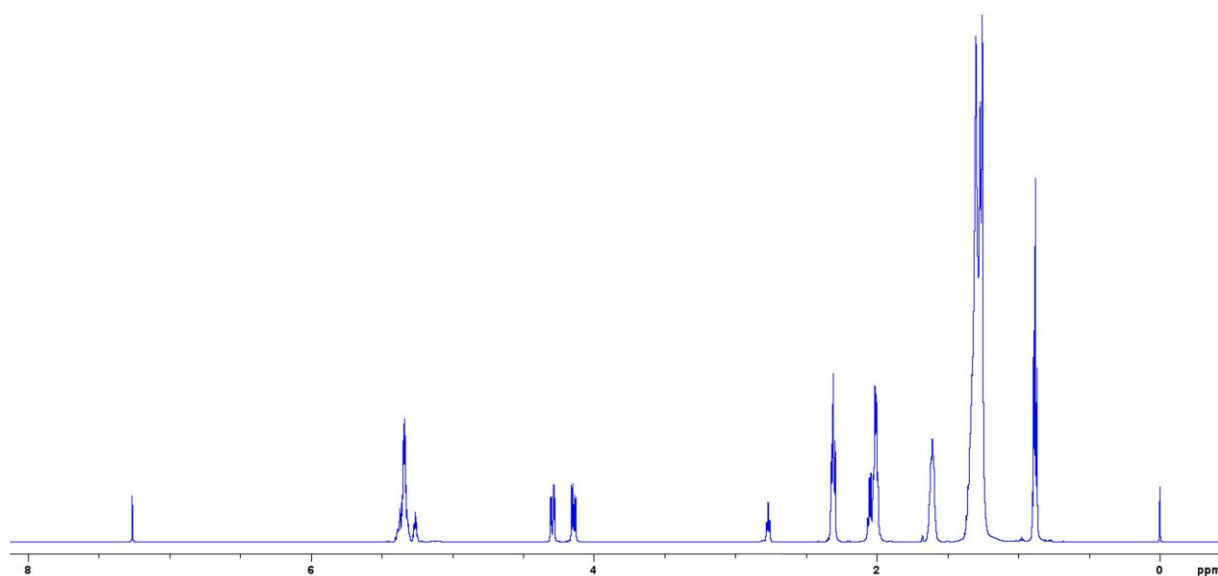
Slika D20. Spektar ^{13}C NMR uzorka 3 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



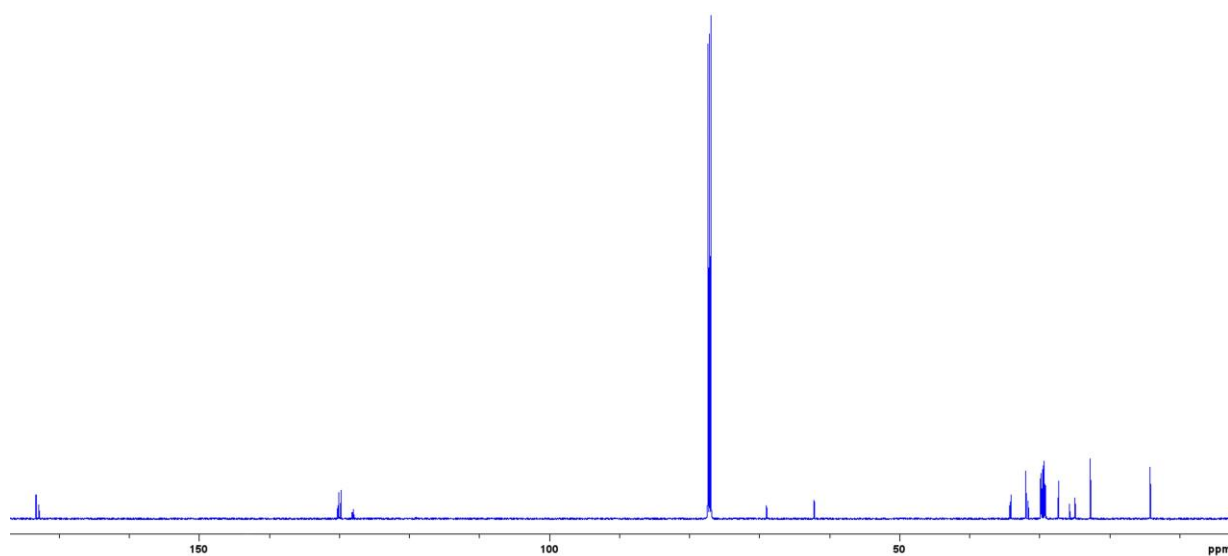
Slika D21. Spektar ^1H NMR uzorka 3a snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



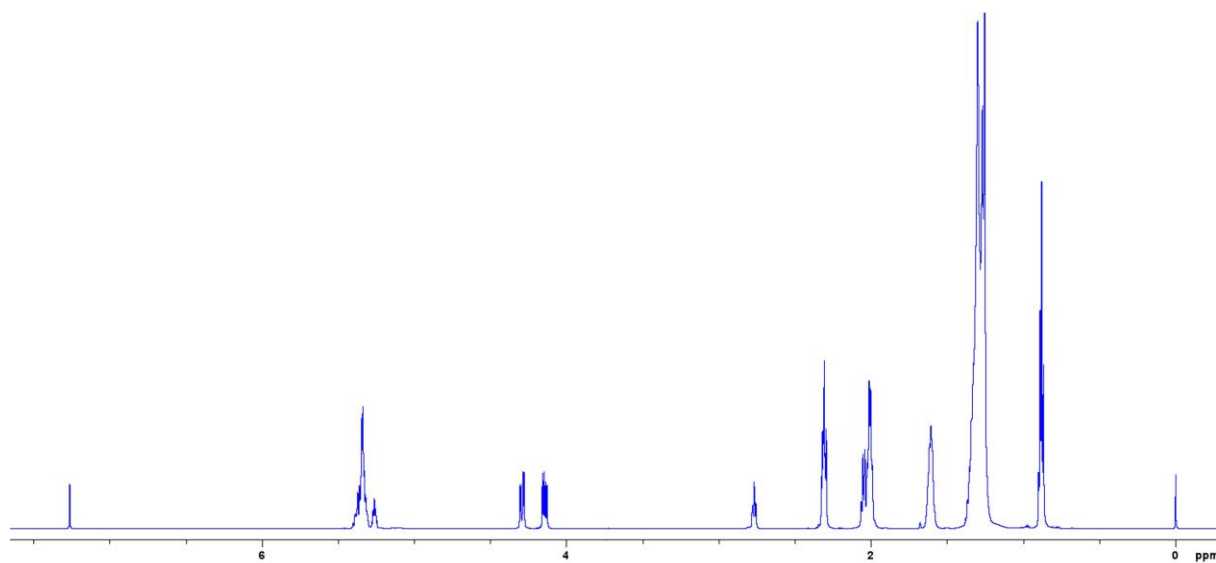
Slika D22. Spektar ^{13}C NMR uzorka 3a snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



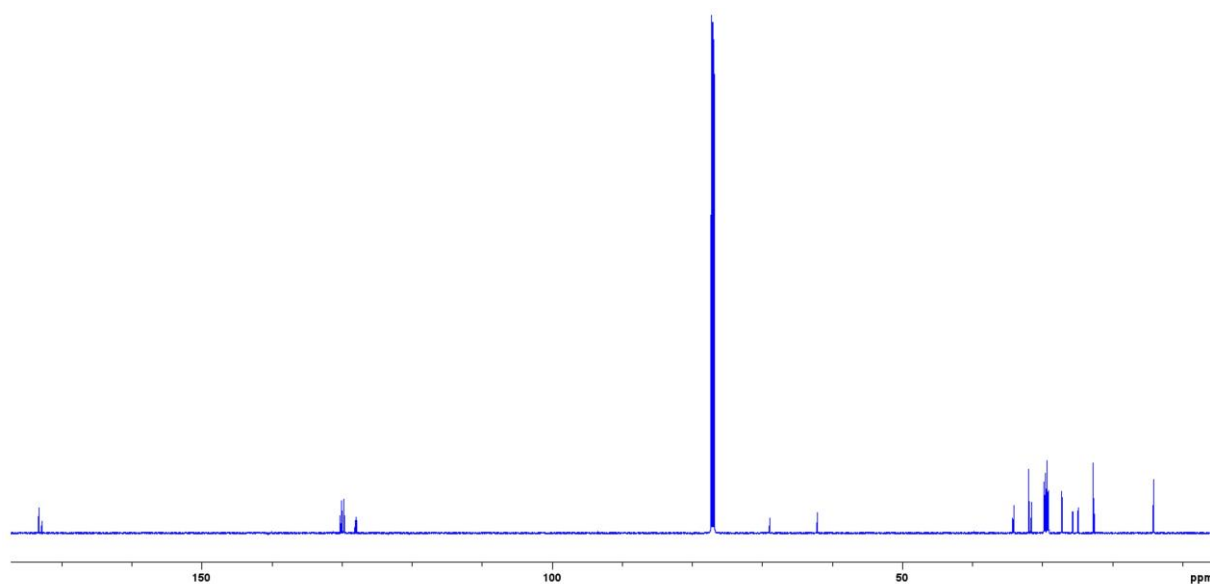
Slika D23. Spektar ^1H NMR uzorka 3b snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



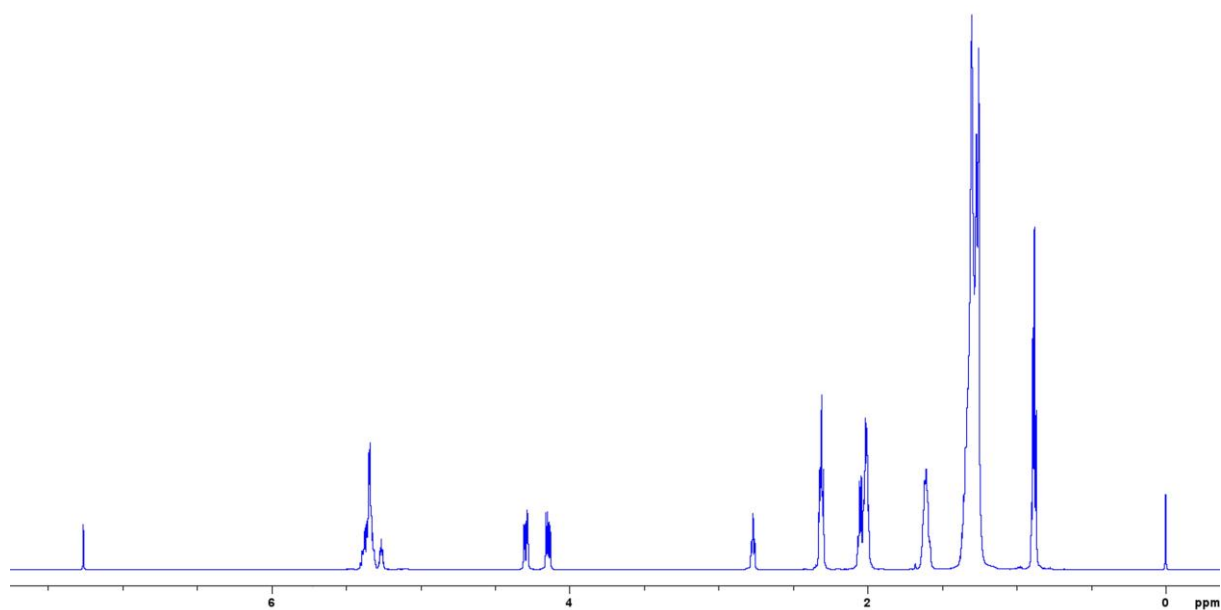
Slika D24. Spektar ^{13}C NMR uzorka 3b snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



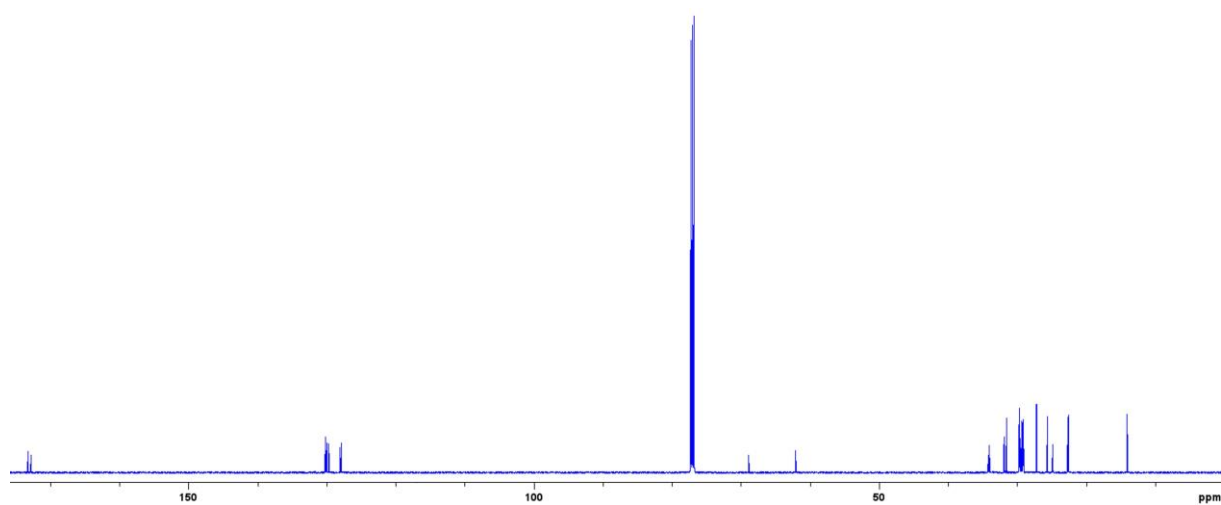
Slika D25. Spektar ^1H NMR uzorka 3c snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



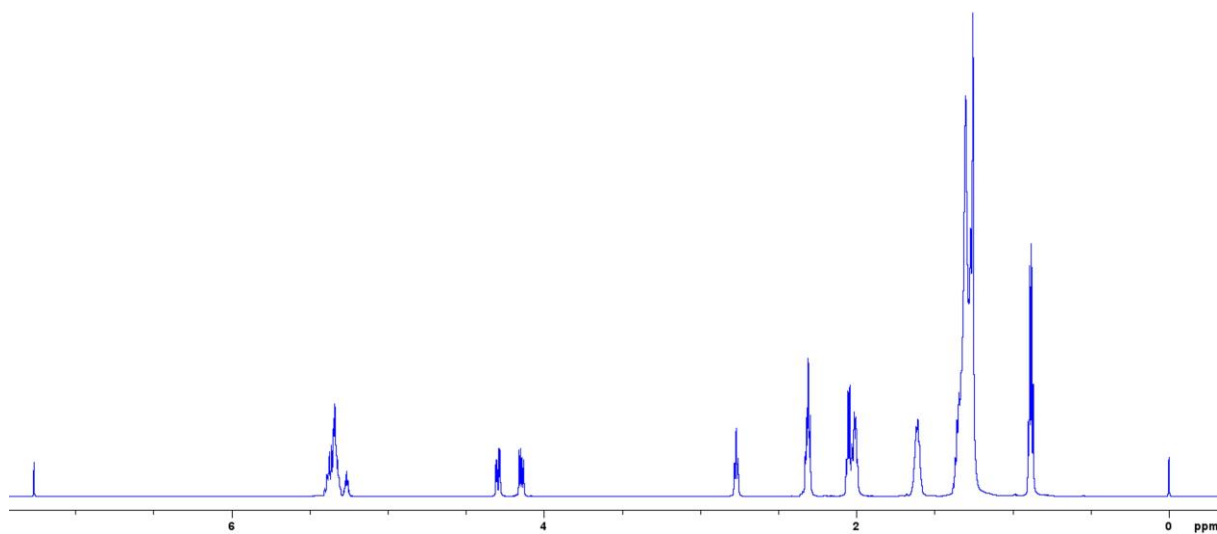
Slika D26. Spektar ^{13}C NMR uzorka 3c snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



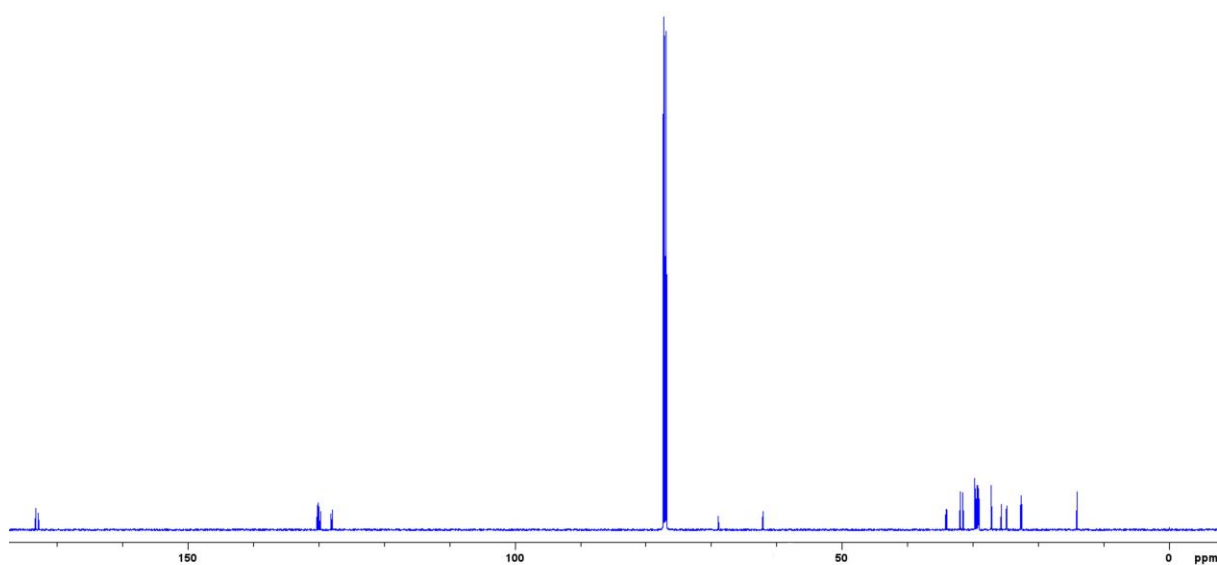
Slika D27. Spektar ^1H NMR uzorka 3d snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



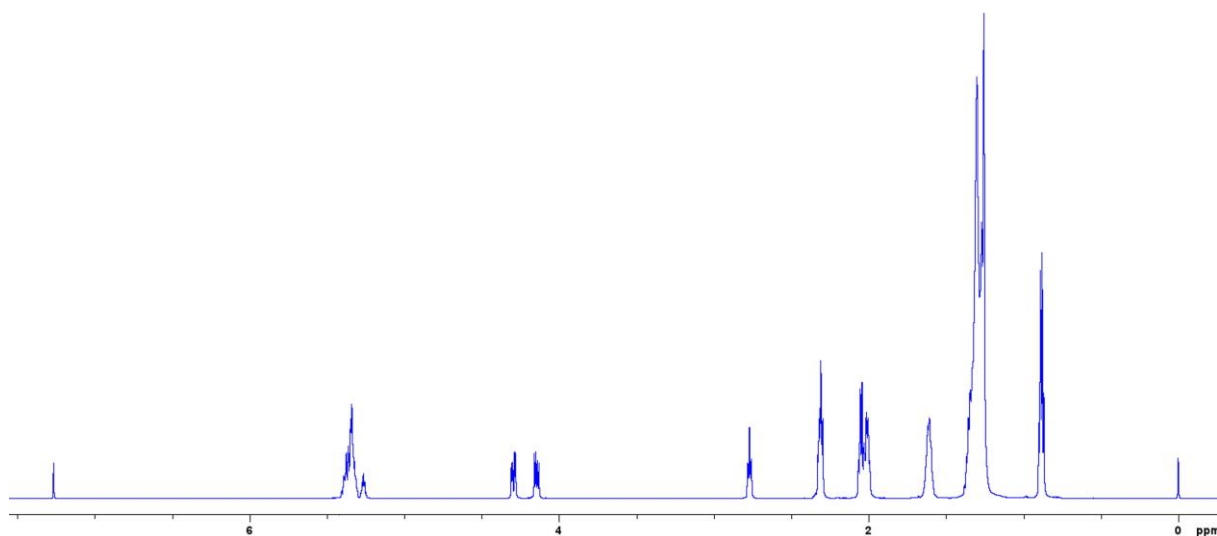
Slika D28. Spektar ^{13}C NMR uzorka 3d snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



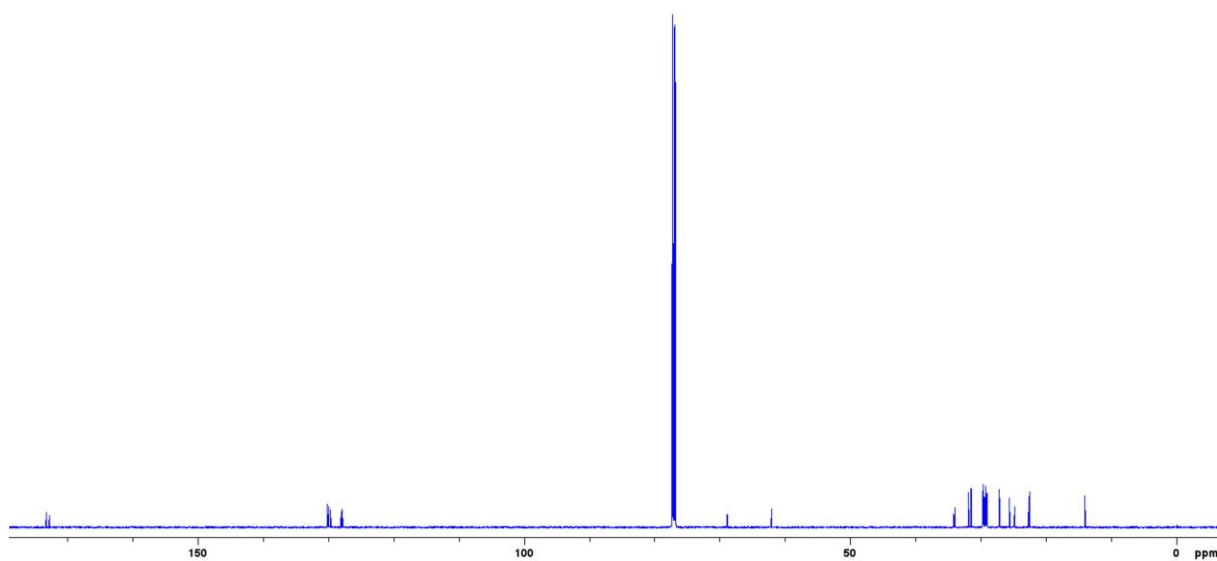
Slika D29. Spektar ^1H NMR uzorka 4 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



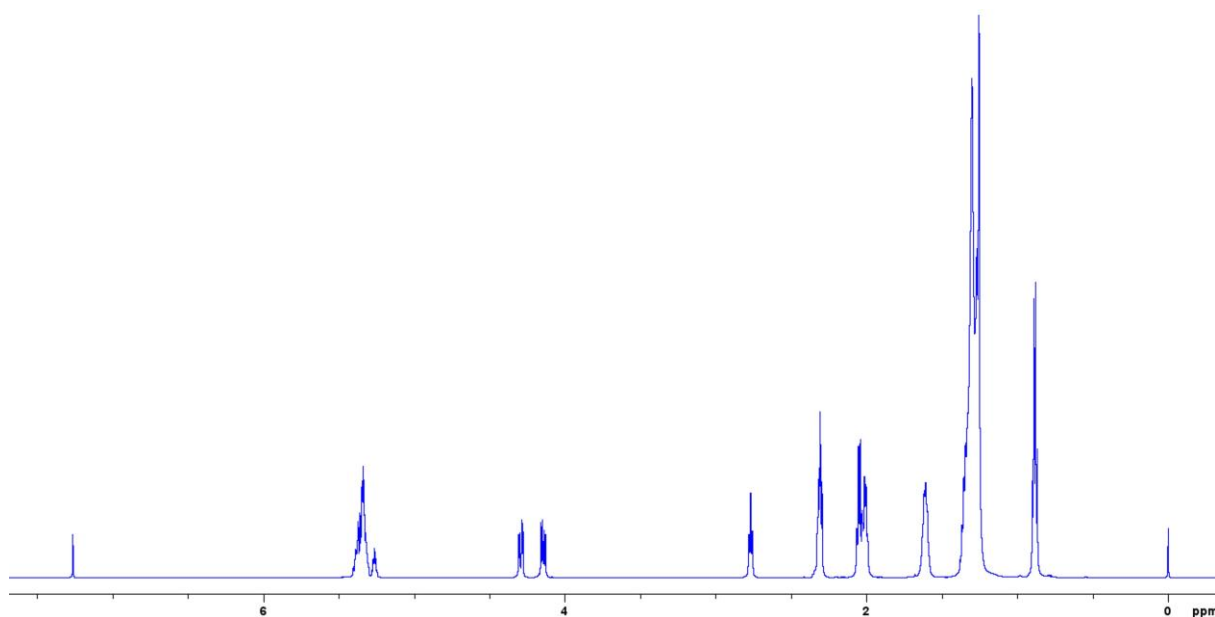
Slika D30. Spektar ^{13}C NMR uzorka 4 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



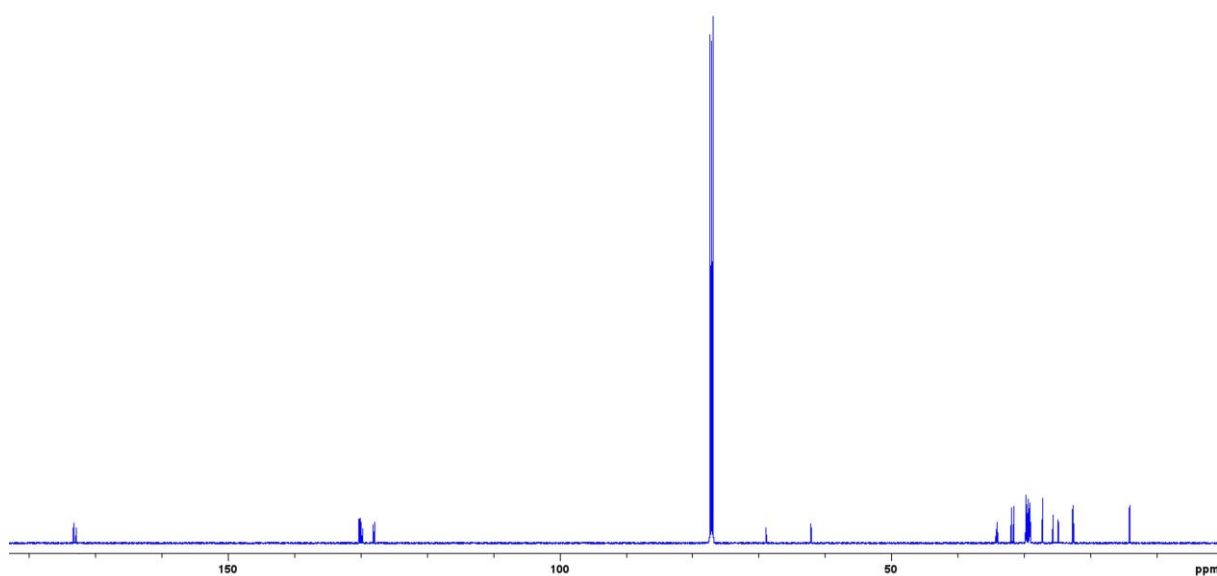
Slika D31. Spektar ^1H NMR uzorka 4a snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



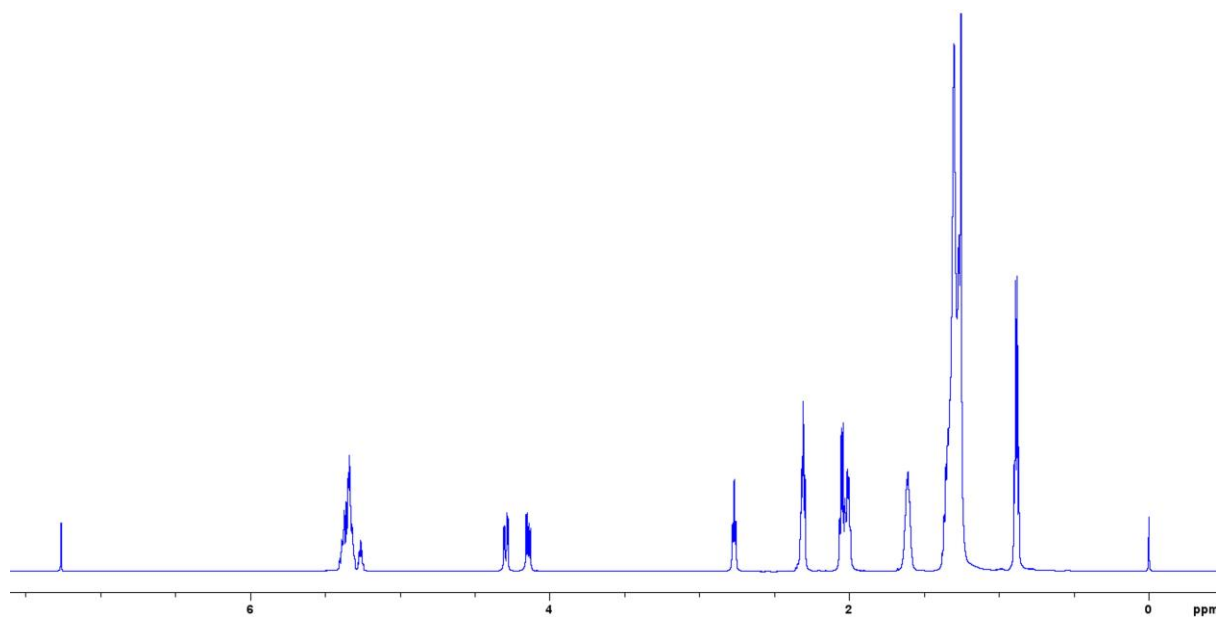
Slika D32. Spektar ^{13}C NMR uzorka 4a snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



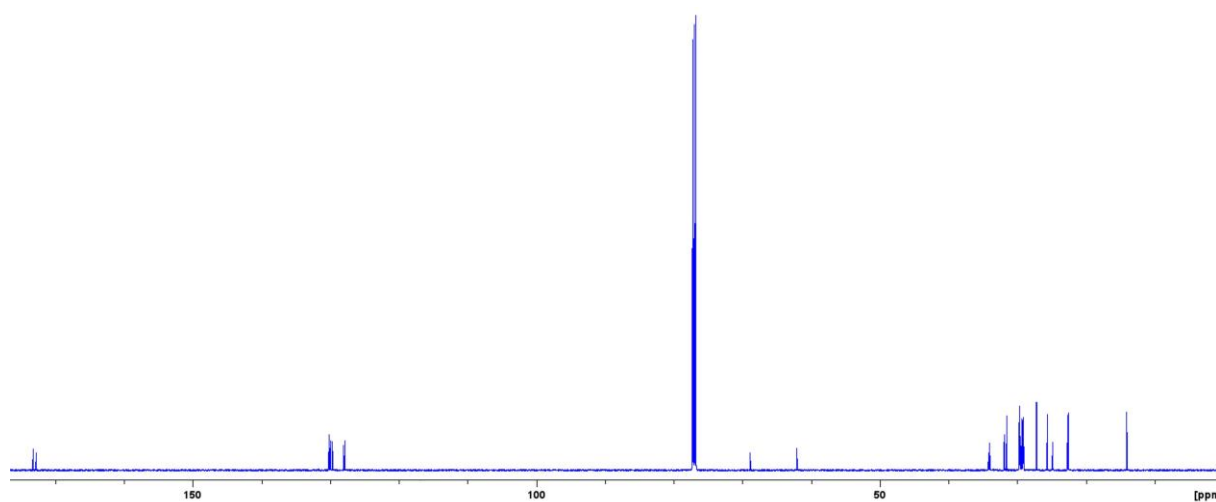
Slika D33. Spektar ^1H NMR uzorka 4b snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



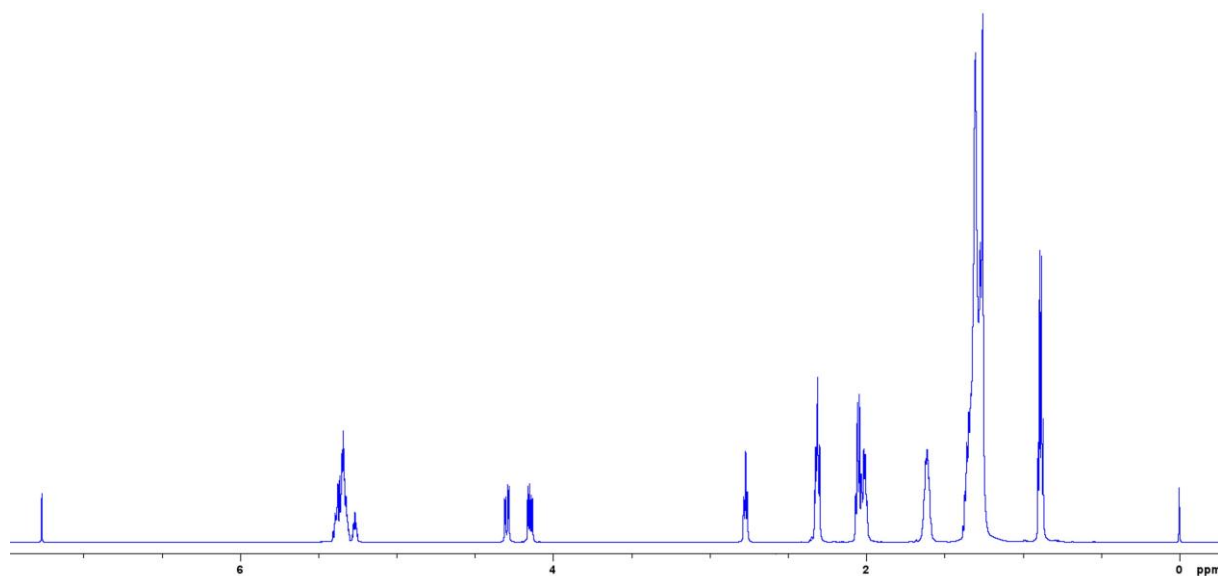
Slika D34. Spektar ^{13}C NMR uzorka 4b snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



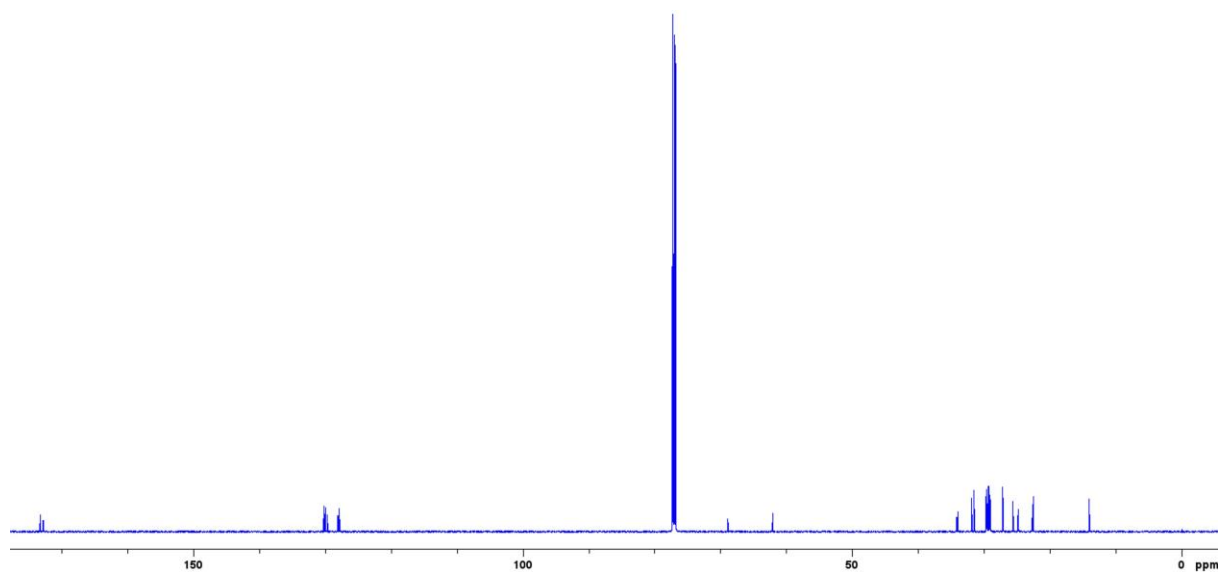
Slika D35. Spektar ^1H NMR uzorka 4c snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



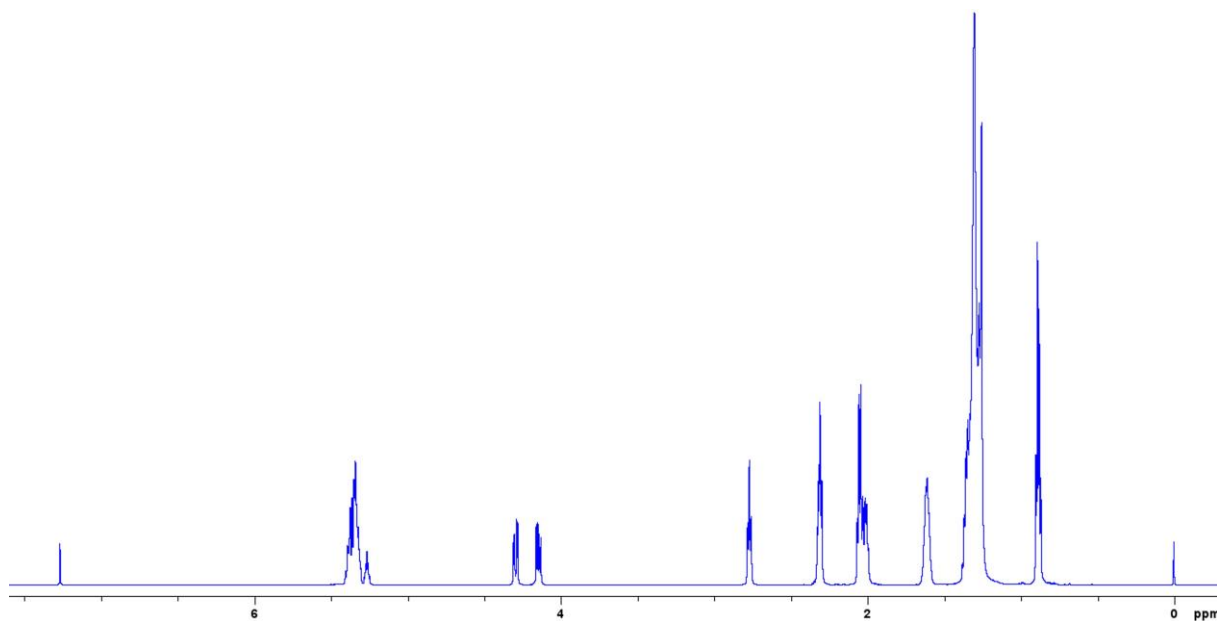
Slika D36. Spektar ^{13}C NMR uzorka 4c snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



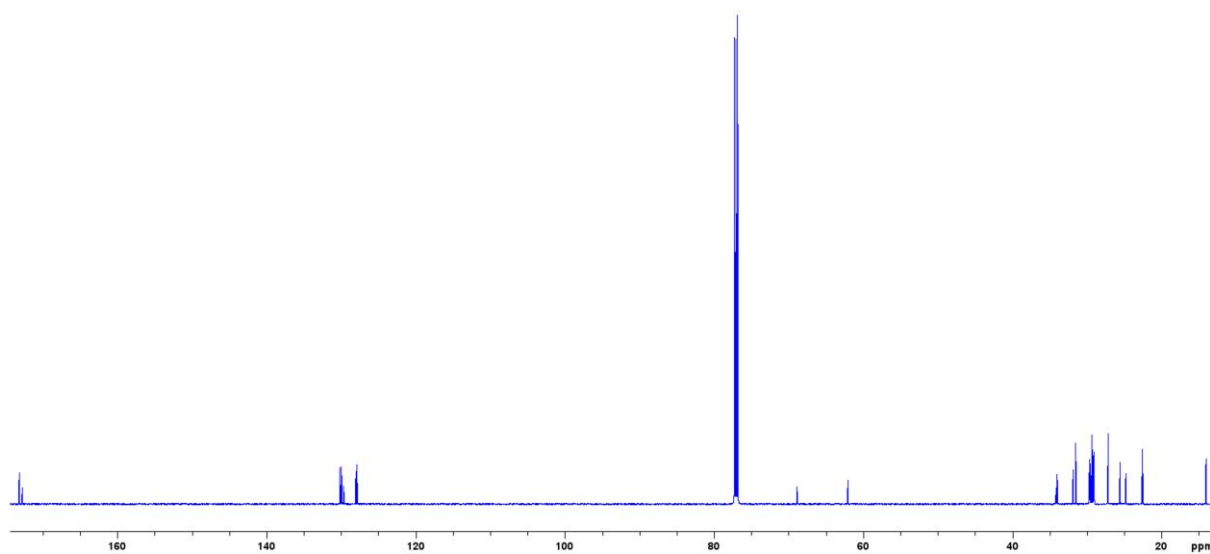
Slika D37. Spektar ^1H NMR uzorka 4d snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



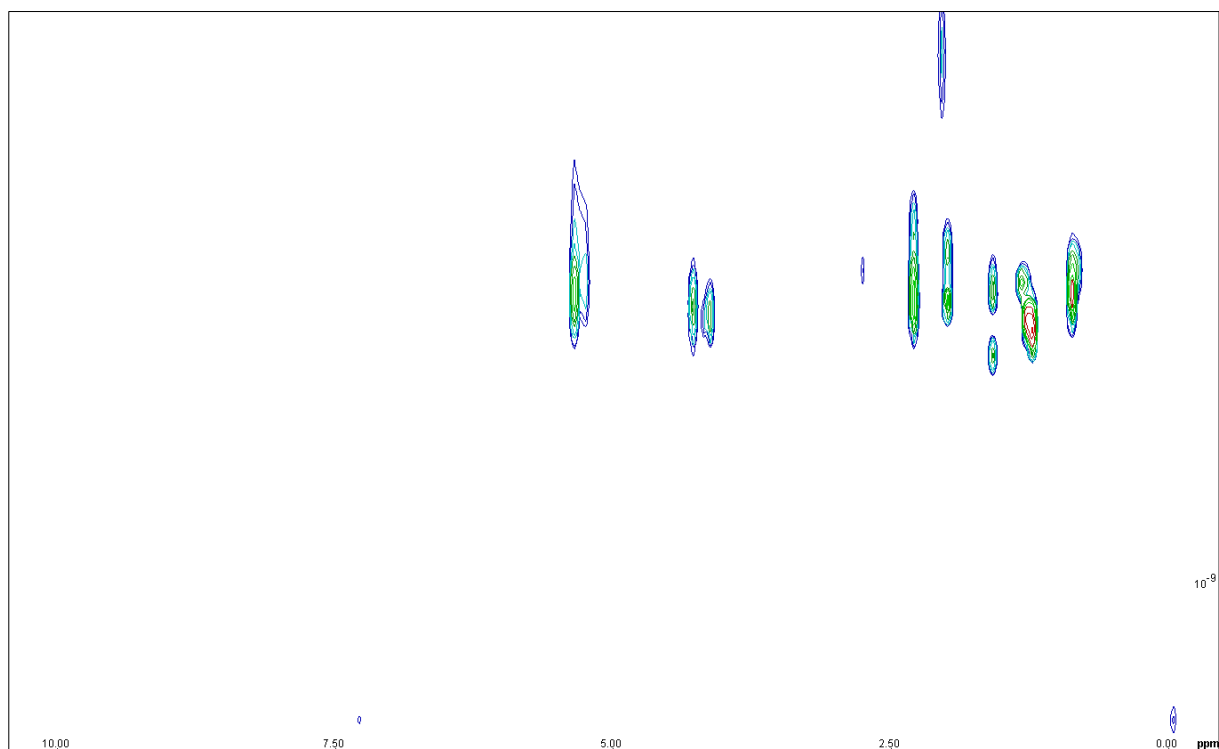
Slika D38. Spektar ^{13}C NMR uzorka 4d snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



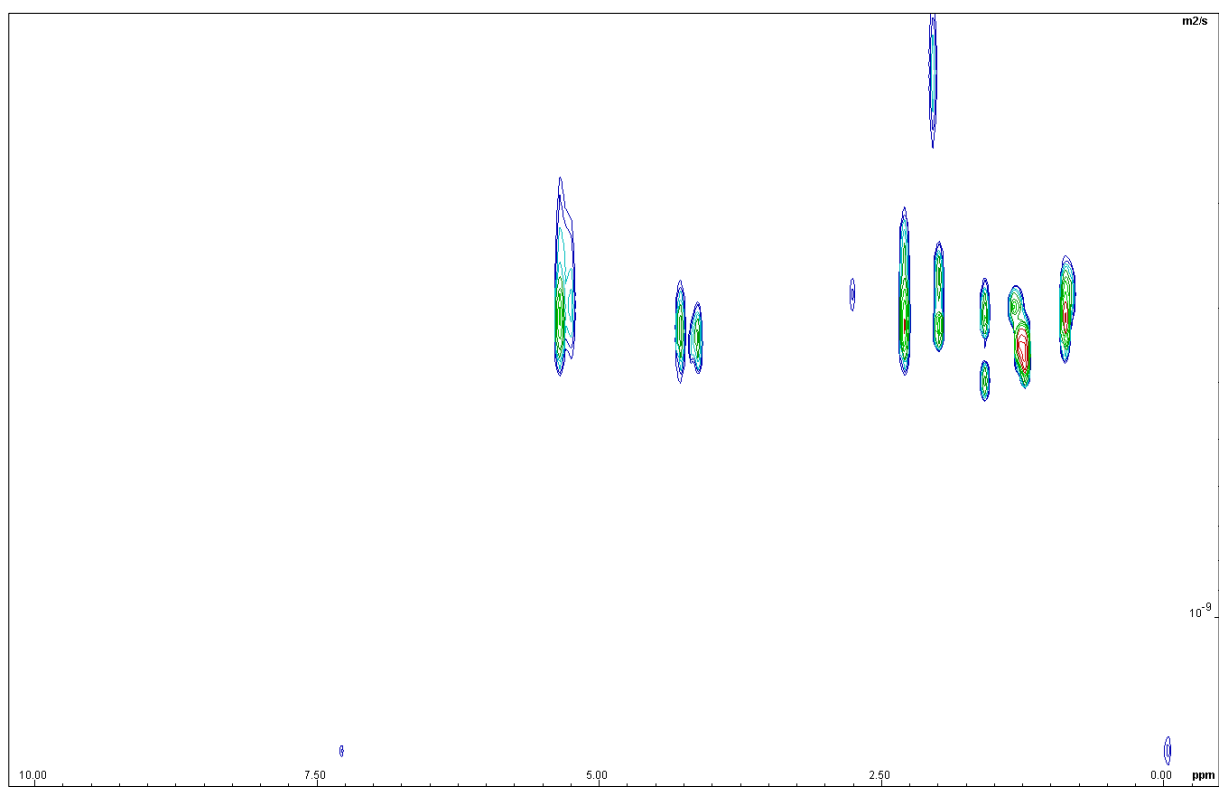
Slika D39. Spektar ^1H NMR uzorka 5 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



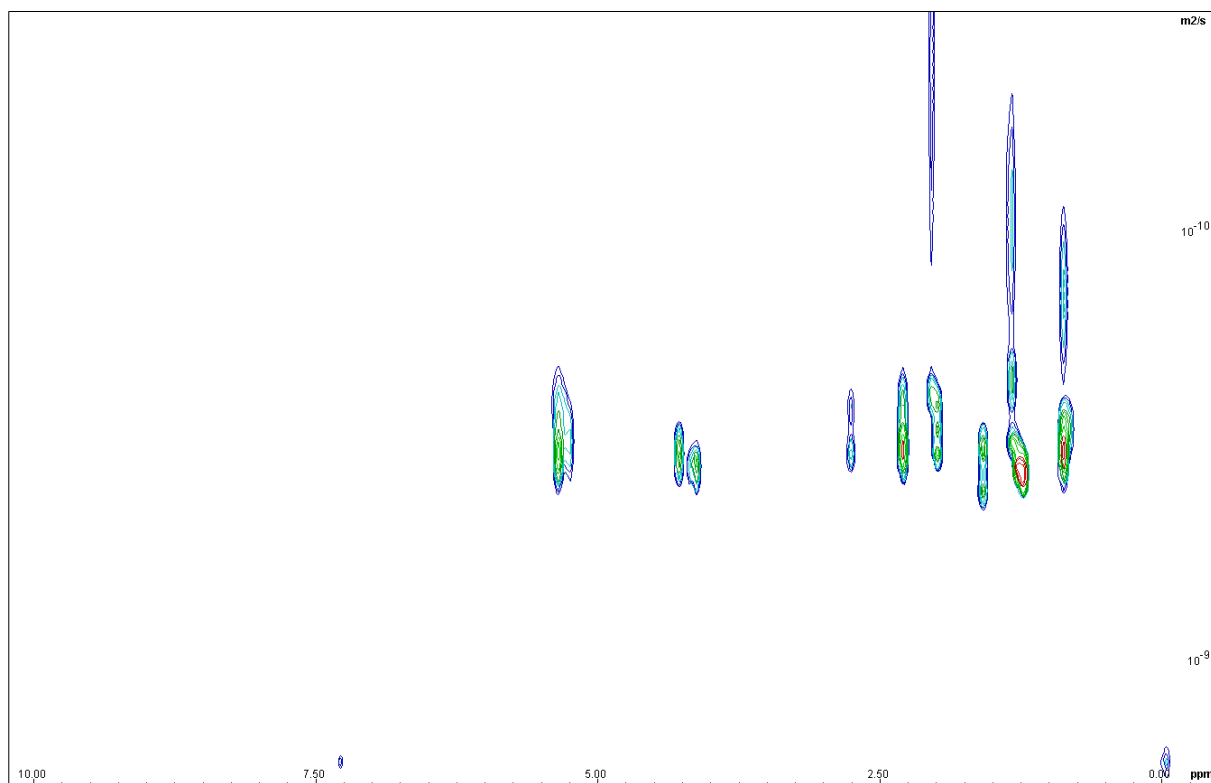
Slika D40. Spektar ^{13}C NMR uzorka 5 snimljen u deuteriranom kloroformu CDCl_3 , pri 600 MHz i 25°C



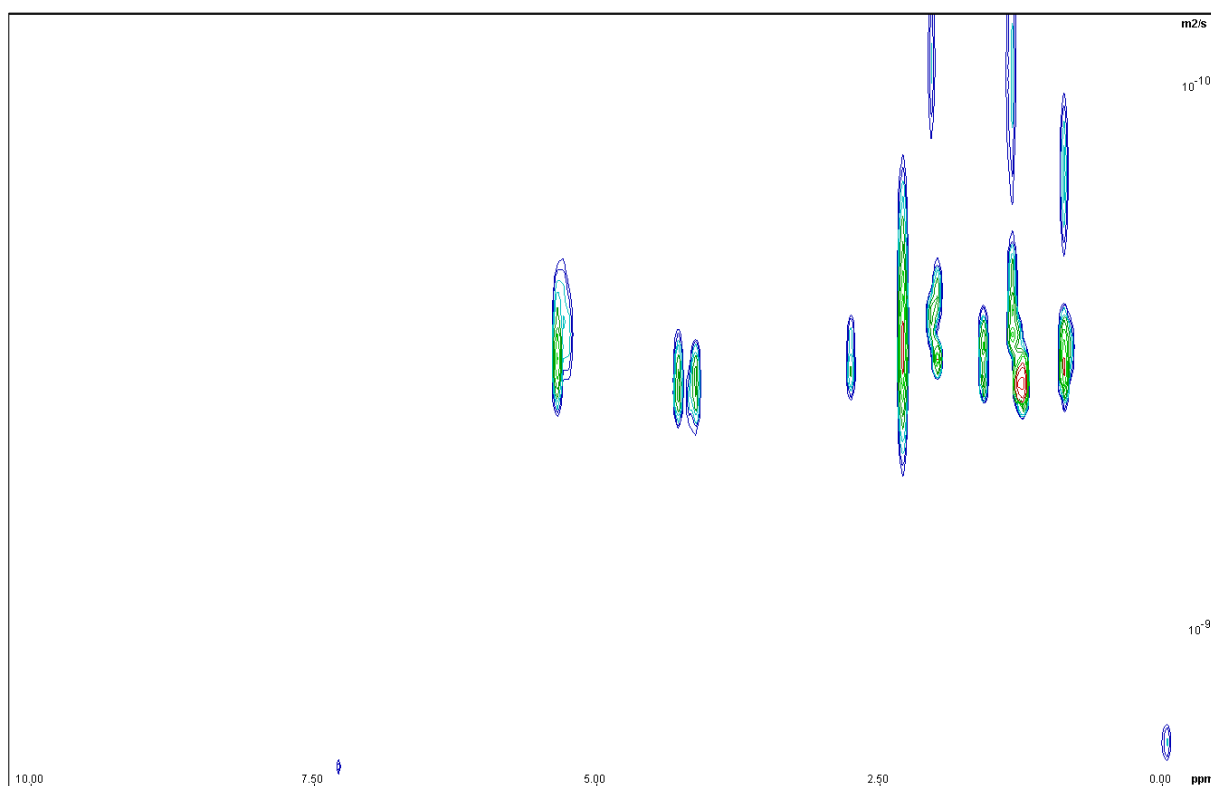
Slika D41. Spektar DOSY NMR uzorka 1a snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i 25°C



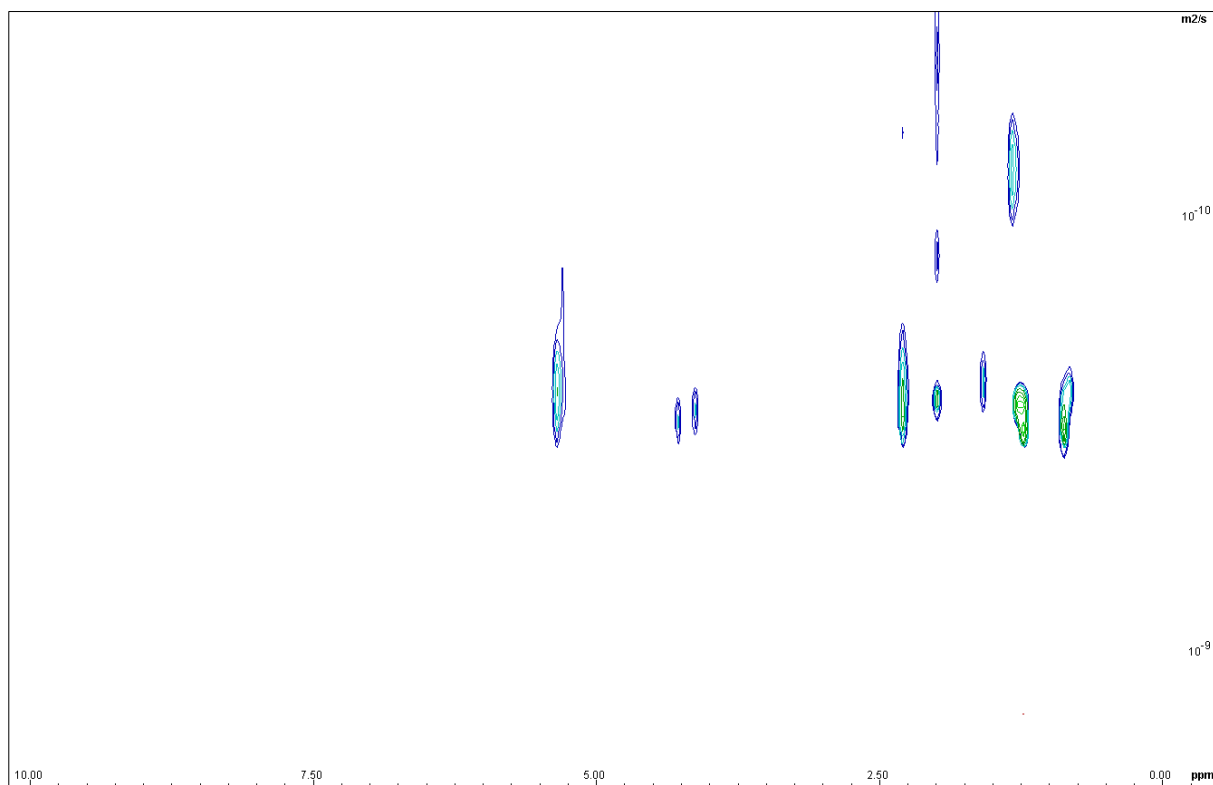
Slika D42. Spektar DOSY NMR uzorka 1b snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i 25°C



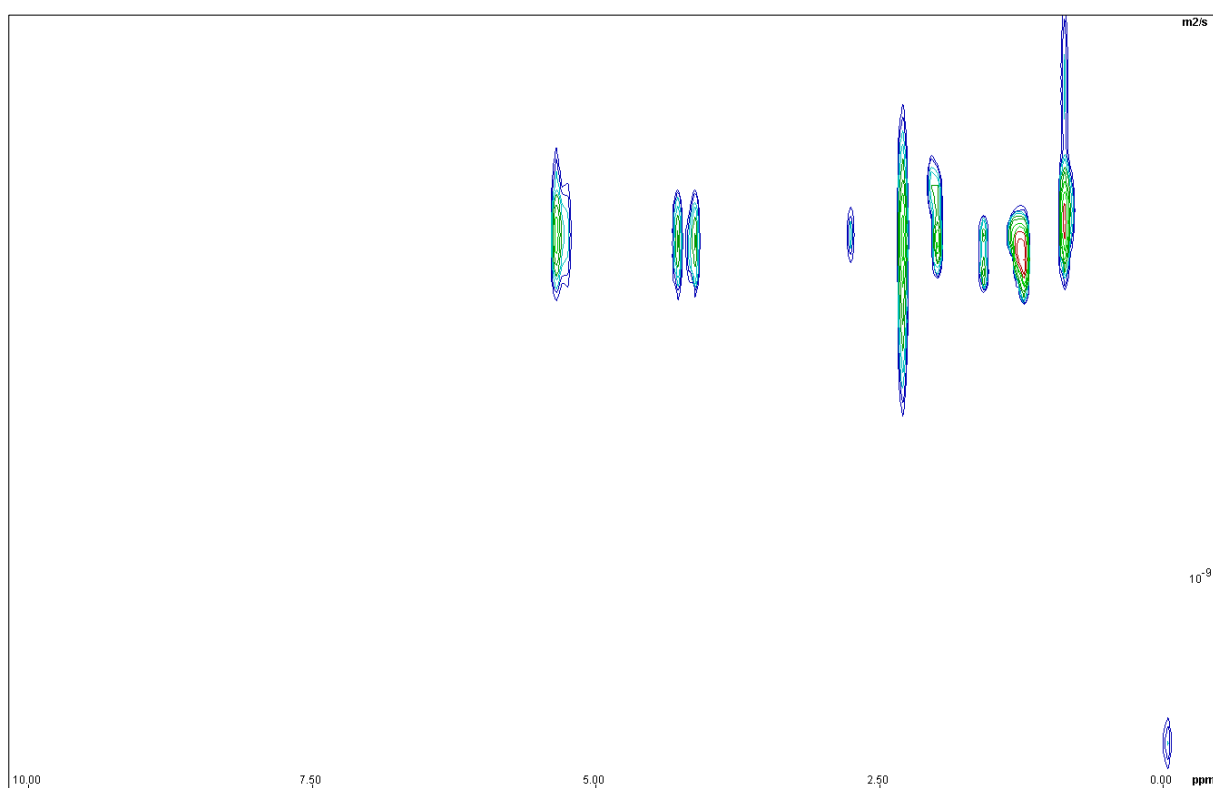
Slika D43. Spektar DOSY NMR uzorka 1c snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i 25°C



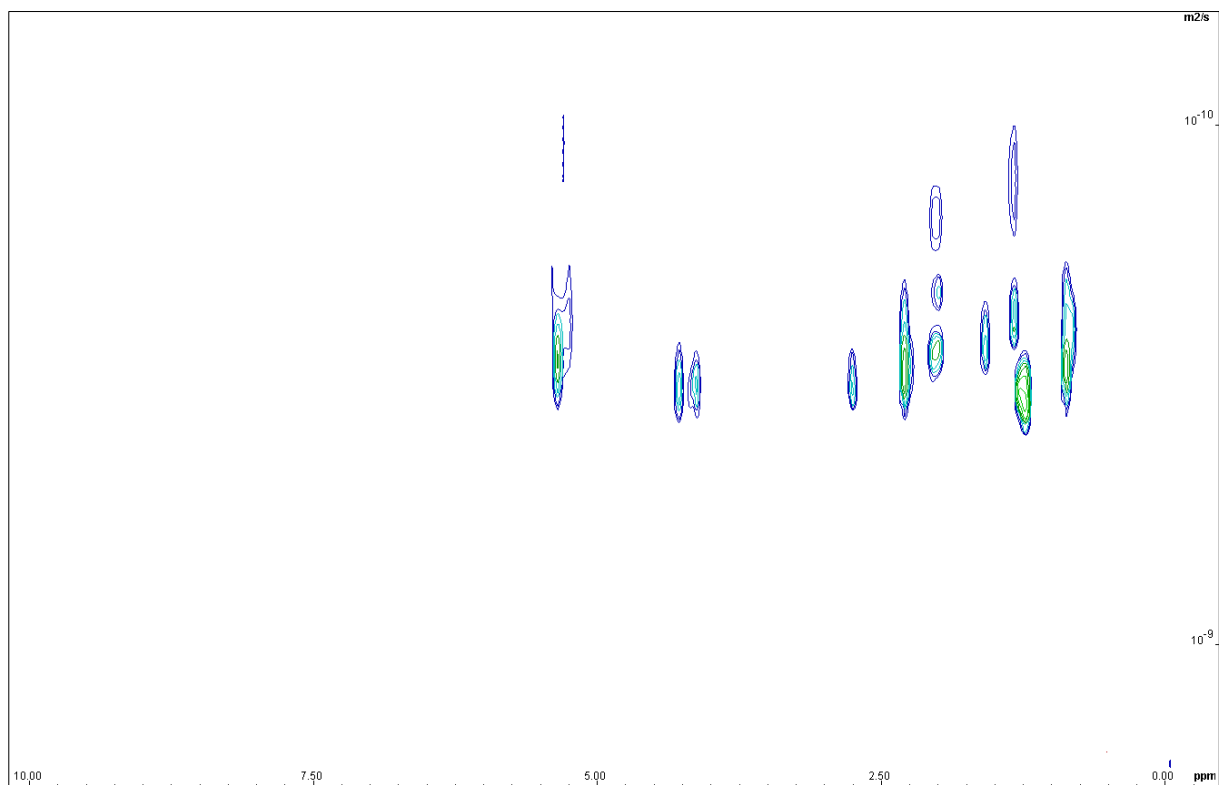
Slika D44. Spektar DOSY NMR uzorka 1d snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i 25°C



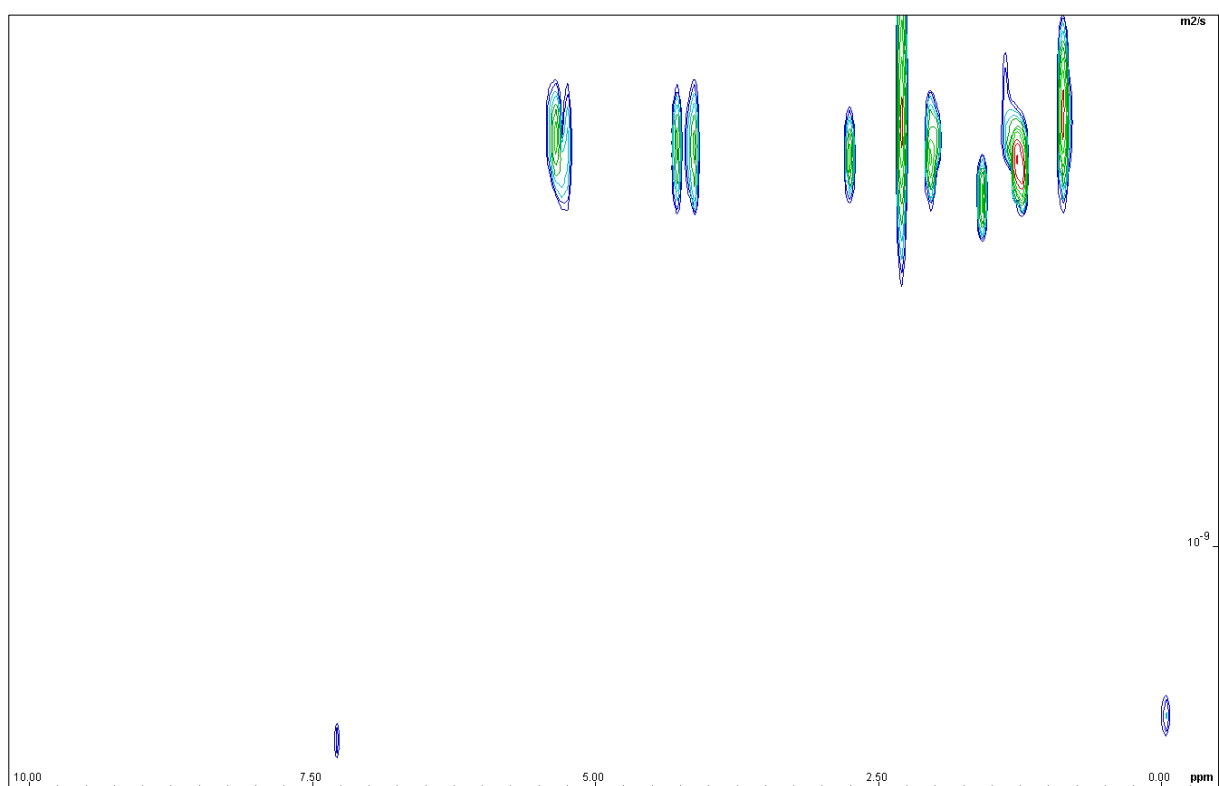
Slika D45. Spektar DOSY NMR uzorka 2 snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i 25°C



Slika D46. Spektar DOSY NMR uzorka 3 snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i 25°C



Slika D47. Spektar DOSY NMR uzorka 4 snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i 25°C



Slika D48. Spektar DOSY NMR uzorka 5 snimljenog u deuteriranom kloroformu pri 600 MHz i 25°C

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Alma Vuran

Datum rođenja: 17. listopada 1999.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2006.–2014. Osnovna škola Sveta Klara, Zagreb

2014.–2018. Zdravstveno učilište; smjer: farmaceutski tehničar, Zagreb

2018.–2022. Sveučilišni prijediplomski studij kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2022.–2024. Sveučilišni diplomski studij kemija; smjer: istraživački; smjer analitička i anorganska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2021. Rektorova nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici-Prirodne znanosti, „Online Znanstvene čarolije“

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019., 2022.–2024. Dan i noć na PMF-u (Otvoreni dan kemije)

2022.–2024. Voditelj volonterskog projekta „Znanstvene čarolije“

2021.–2024. Volonter projekta „Znanstvene čarolije“

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Alma Vuran, Jelena Parlov Vuković, Predrag Novak, *Characterization of Croatian olive oils by NMR spectroscopy*, Central European NMR Symposium & Bruker Users' Meeting, Rijeka, 2024., knjiga sažetaka: str. 60
2. Alma Vuran, Jelena Parlov Vuković, Predrag Novak, *Application of NMR spectroscopy for edible oil characterization*, 9th Symposium of Chemistry Students, Zagreb, 2024., knjiga sažetaka: str. 65