

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Iva Trtanj, Dunja Velagić

**Procjena autentičnosti bučinog ulja  
primjenom plinske kromatografije s  
masenom spektrometrijom, kolorimetrije i  
spektroskopije u bliskom infracrvenom  
području**

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je u Kabinetu za tehnološko projektiranje Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Sandre Balbino i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014/2015.

## SADRŽAJ RADA

1.	UVOD .....	1
1.1.	BUČA.....	1
1.2.	BUČINO ULJE.....	3
1.2.1.	Steroli u bučinom ulju.....	5
1.3.	ZAHTEVI KAKVOĆE BUČINOG ULJA.....	6
1.4.	PATVORENJE ULJA.....	6
2.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	9
3.	MATERIJAL I METODE .....	10
3.1.	MATERIJAL .....	10
3.1.1.	Bučino i suncokretovo ulje.....	10
3.1.2.	Reagensi .....	10
3.1.3.	Aparati.....	11
3.2.	METODE RADA.....	11
3.2.1.	Određivanje sterola, tokoferola i skvalena .....	11
3.2.1.1.	<i>Priprema neosapunjive frakcije</i> .....	12
3.2.1.2.	<i>Priprema kolone</i> .....	12
3.2.1.3.	<i>Ekstrakcija neosapunjivog dijela ulja</i> .....	13
3.2.1.4.	<i>Analiza neosapunjive frakcije plinskom kromatografijom</i> .....	14
3.2.1.5.	<i>Identifikacija i kvantifikacija pikova</i> .....	15
3.2.2.	Kolorimetrija .....	16
3.2.3.	Spektroskopija u bliskom infracrvenom području.....	17
3.2.4.	Statistička obrada podataka .....	18
3.2.4.1.	<i>Modeli bazirani na kolorimetriji</i> .....	19
3.2.4.2.	<i>Modeli bazirani na NIR spektroskopiji</i> .....	20
4.	REZULTATI.....	21
5.	RASPRAVA .....	34
5.1.	GC-MS ANALIZA STEROLA, TOKOFEROLA I SKVALENA.....	35
5.2.	ANALIZA OSNOVNIH KOMPONENTI I ANALIZA VARIJANCE .....	38
5.3.	KOLORIMETRIJSKA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA U BLISKOM INFRACRVENOM PODRUČJU .....	40
6.	ZAKLJUČCI.....	45
7.	ZAHVALE.....	46
8.	LITERATURA.....	47
9.	SAŽETAK .....	51
10.	SUMMARY .....	52
11.	ŽIVOTOPISI.....	53

## **1. UVOD**

Zbog svojih dobrih gastronomskih i nutritivnih karakteristika bučino ulje je na hrvatskom tržištu izuzetno cijenjeno, a sve se više poljoprivrednika i poduzetnika odlučuje za uzgoj uljne buče i proizvodnju bučinog ulja. Dobar imidž među potrošačima bučino ulje može zahvaliti sadržaju različitih esencijalnih spojeva, spojeva s vitaminskim i antioksidativnim djelovanjem, te spojevima koji djeluju na ublažavanje različitih tegoba. Zbog malog prinosa buče po hektaru, niskog iskorištenja sirovine te velike energetske potrebe i broja radnih sati koje iziskuje proizvodnja bučinog ulja ono ima visoku tržišnu cijenu. Stoga je, kao kod sličnih proizvoda s visokom dodanom vrijednošću poput maslinovog ulja, meda i vina, kod bučinog ulja moguća pojava patvorenja u procesu proizvodnje koja najčešće uključuje miješanje s jeftinijim rafiniranim uljima, radi veće zarade na finalnom proizvodu.

Bučino ulje proizvodi se prženjem te prešanjem tijesta samljevenih bučinih koštica, vode i soli. Usprkos jasnoj regulativi određenoj Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 41/12) (Pravilnik, 2012), koja definira bučino ulje kao ulje dobiveno iz bučinih koštica (*Cucurbita pepo* L.), dio proizvođača bučinog ulja prilikom pripreme tijesta bučinih koštica u samljevene koštice umjesto vode dodaje određenu količinu rafiniranog ulja. Pri tome se, prema neslužbenim navodima, dodaje do 1 L suncokretovog ulja na 3 kg bučinih koštica, a dodatak se uobičajeno opravdava obiteljskim i tradicionalnim načinom proizvodnje te tehnološkim razlozima odnosno olakšanim prženjem tijesta bučinih koštica kojem je dodano rafinirano ulje. Bez obzira na razloge dodatka rafiniranog ulja svaka mješavina bučinog ulja i rafiniranog ulja ukoliko nije jasno označena na deklaraciji predstavlja patvorenje.

Patvorenje bučinog ulja je protuzakonito, oštećuje ostale proizvođače, te šteti općem imidžu ovog proizvoda, a osim toga dovodi i do obmanjivanja potrošača, koji u tom slučaju konzumiraju ulje umanjene nutritivne vrijednosti i senzorskih svojstava, ali i skraćene održivosti.

## **1.1. BUČA**

Bundeva, buča ili tikva (Slika 1) je jednogodišnja, zeljasta biljka iz porodice *Cucurbitaceae*, roda *Curcubita*. U botaničkom smislu plod uljne buče je tikva (lat. *pépo*), ali se u svakodnevnom jeziku naziva buča. Plod je mesnat, obično okrugao i ispunjen je s oko 400-500 sjemenki, spljoštenog, eliptičnog oblika (Pospišil, 2013).



Slika 1. Buča (*Cucurbita pepo* L.) (Anonymous 1, 2015)

U plodu buče nalazi se neznatna količina mineralnih soli među kojima prevladavaju kalij, fosfor, kalcij, željezo i mangan. Plodovi sadrže karotenoide, vitamine grupe B (B1, B2, B3 i B6), vitamin C i folnu kiselinu. Svaka vrsta buče sadrži različite karotenoide u različitim udjelima, vrste s visokim sadržajem karotena su narančasto obojene, a vrste s visokim sadržajem luteina, a niskim sadržajem karotena imaju žutu boju (Murkovic i sur., 2001).

Plod buče nema veliku hranjivu vrijednost, za razliku od sjemenki tj. koštica buče koje su pravi izvor visokovrijednih hranjivih sastojaka. Koštice čine oko 10% težine ploda, a energetska vrijednost im je dvadesetak puta veća od energetske vrijednosti mesnatog dijela buče. Koštice golicе (bez vanjske celulozne ljuske) sadrže oko 42-54% ulja, a sastav masnih kiselina ovisi o nizu faktora (mjestu gdje je biljka rasla, klimi, vrsti sjemena), a kao dominantne su se pokazale palmitinska ( $C_{16:0}$ ), stearinska ( $C_{18:0}$ ), oleinska ( $C_{18:1}$ ) i linolna kiselina ( $C_{18:2}$ ) koje čine 98% masnih kiselina u košticama buče. Koštice sadrže i veliki udio vitamina E i to  $\alpha$ - i  $\gamma$ -izomera, a u njima se od ostalih bioaktivnih spojeva nalaze steroli, skvalen te nešto polifenola i lignana (Neđeral i sur., 2012; Murkovic i sur., 2004).

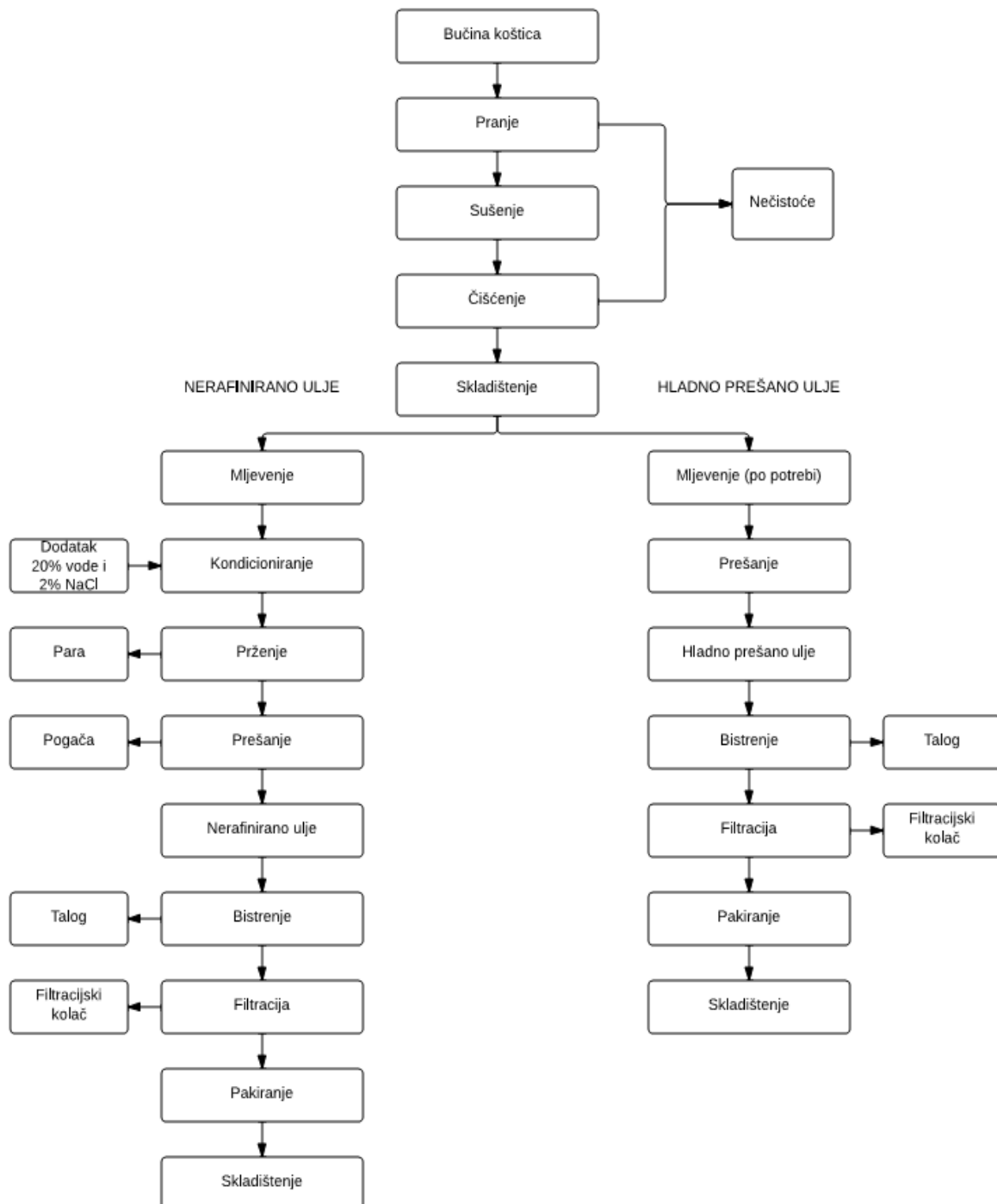
## 1.2. BUČINO ULJE

Proizvodnja nerafiniranog bučinog ulja uključuje prženje tijesta bučinih koštica, uz dodatak vode i soli u cilju povećanja iskorištenja procesa, a slijedi prešanje na hidrauličkim prešama, prilikom čega se dobiva tamno crveno-zeleno gusto ulje, okusa i mirisa po prženom i orašastim plodovima.

Sastav masnih kiselina bučinog ulja ovisi o više čimbenika (npr. vrsti buče, klimatskim uvjetima), a dominantne kiseline su palmitinska, stearinska, oleinska i linolna kiselina (Neđeral Nakić i sur., 2006). Od izomera tokoferola (vitamina E) u bučinom ulju ima više  $\gamma$ -tokoferola koji pokazuje snažno antioksidacijsko djelovanje, dok  $\alpha$ -tokoferola, koji pokazuje jače vitaminsko djelovanje ima manje. U ulju se otprilike nalazi oko 27,1-75,1  $\mu\text{g g}^{-1}$   $\alpha$ -tokoferola, 74,9-492,8  $\mu\text{g g}^{-1}$   $\gamma$ -tokoferola, od 35,3-1109,7  $\mu\text{g g}^{-1}$   $\delta$ -tokoferola (Stevenson i sur., 2007).

Prženjem koštica prije prešanja ulja događaju se promjene u sastavu masnih kiselina i mikronutrijenata (Neđeral i sur., 2012). Osjetljiva na oksidaciju, linolenska kiselina blago se smanjuje od 54,6% do 54,2%, dok koncentracija izomera vitamina E pokazuje pad tijekom prvih 40 minuta prženja na oko 30%, nakon čega slijedi povećanje tijekom posljednjih 20 minuta do oko početne razine kao na početku procesa prženja. Također se tijekom procesa prženja početna koncentracija ukupnih sterola od 1710  $\mu\text{g g}^{-1}$  povećava do 1930  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Murkovic i sur., 2004). Hladno prešano bučino ulje dobiva se prešanjem na pužnim prešama, tako da temperatura procesa ne prelazi 50 °C (zbog čega je manje iskorištenje procesa), te se dobiva ulje crvenkaste, svjetlije boje, okusa i mirisa po sirovim bučnim košticama, sa većim udjelom tokoferola, sterola i skvalena (12-20% više nego kod nerafiniranih) (Neđeral i sur., 2012). Proces proizvodnje nerafiniranog i hladno prešanog bučinog ulja prikazan je na slici 2.

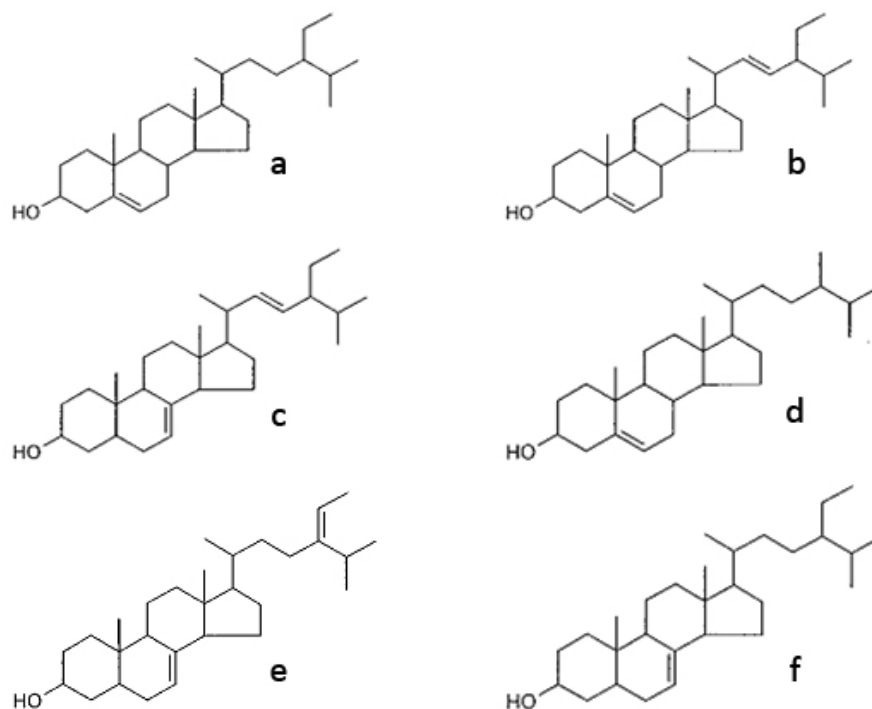
Slika 2. Tehnološki proces proizvodnje nerafiniranog i hladno prešanog bučinog ulja (vlastita shema)





### 1.2.1. Steroli u bučinom ulju

Biljni steroli ili fitosteroli su bitna komponenta membrane svih eukariotskih organizama te uključuju više od 250 različitih sterola i srodnih spojeva u različitim biljnim vrstama. U najčešće biljne sterole koji se unose hranom ubrajamo sitosterol, stigmasterol i kampesterol koje uglavnom u organizam unosimo putem biljnih ulja. Prehrambeni interes za sterole proizlazi iz činjenice da imaju sličnu strukturu kao kolesterol, a time i sposobnost smanjenja razine kolesterola u krvi. Većina biljnih sterola, npr. kampesterol i sitosterol, imaju  $\Delta^5$ -vezu, odnosno dvostruku vezu na 5C atomu u B prstenu (Piironen i sur., 2000). Koštice buče i bučino ulje bogati su biljnim sterolima koji su od posebnog interesa zbog svog karakterističnog sastava. Općenito, distribucija sterola u obitelji buče predstavlja jedan od najsloženijih uzoraka poznatih u biljnom carstvu. Neki od njihovih sterola su karakteristika organizama mnogo nižih na evolucijskoj ljestvici. Koštice buče uglavnom sadrže različite  $\Delta^7$ -sterole (Slika 3) s dvostrukom vezom na 7C atomu u B prstenu, koje rijetko nalazimo u drugim biljnim košticama (Murkovic i sur., 2004).



Slika 3. Strukturne formule sterola u bučinom ulju (a:  $\beta$ -sitosterol; b: stigmasterol; c:  $\alpha$ -spinasterol; d: kampesterol; e:  $\Delta^7$ -avenasterol; f:  $\Delta^7$ -stigmastenol) (Kamm i sur., 2001)

### **1.3. ZAHTJEVI KAKVOĆE BUČINOGL ULJA**

Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 41/12) (Pravilnik, 2012) ulja se ovisno o postupku koji se primjenjuje u proizvodnji dijele na rafinirana ulja, hladno prešana ulja i nerafinirana ulja. Hladno prešana ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, prešanjem na temperaturi do 50 °C pri čemu se može provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem. Nerafinirana ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, mehaničkim postupcima, primjerice prešanjem, uz upotrebu topline. Može se provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem.

Ulja iz bučinih koštica stavljaju se na tržište pod nazivom „bučino ulje“, a uz naziv je obvezno navođenje izraza „hladno prešano“ ili „nerafinirano“. Mješavine rafiniranih ulja, hladno prešanih ulja i nerafiniranih ulja stavljaju se na tržište pod nazivom koji uključuje nazive ulja od kojih je mješavina sastavljena (Pravilnik 2012). Svako jestivo ulje osim osnovnih zahtjeva kvalitete mora zadovoljavati i određene identifikacijske zahtjeve kao što su gustoća, indeks refrakcije, jodni broj, broj osapunjenja, sastav masnih kiselina te udjel i sastav sterola.

### **1.4. PATVORENJE ULJA**

Temeljni problem u procjeni autentičnosti ulja je definiranje jednog ili više parametara za provjeru identiteta i čistoće specifičnog jestivog ulja. Općenito za identifikaciju se koriste kemijske komponente koje bi trebale biti odsutne u originalnom, a prisutne u patvorenom ulju. Međutim, često te tvari koji služe kao markeri nisu u autentičnom ulju odsutne, nego su samo prisutne u različitim koncentracijama u odnosu na patvoreno ulje. Zato se profili ulja koja se ispituju moraju usporediti s profilima autentičnih ulja. Analitički parametri koji se koriste za provjeru autentičnosti biljnih ulja su sastav masnih kiselina i triglicerida, sastav sterola, distribucija tokoferola i tokotrienola, dok su kod hladno prešanih ulja to sastav masnih kiselina, sterola i skvalena. Za procjenu autentičnosti proizvoda osnovno je znati primijenjenu tehnologiju i kemijski sastav autentičnih i potencijalno dodanih ulja. Međutim, određivanje autentičnosti za jestiva ulja je dugotrajan i mukotrpan proces koji najčešće uključuje korištenje kromatografskih metoda kojima se određuju bioaktivni spojevi poput sterola, skvalena i tokoferola (Kamm i sur., 2001).

Steroli u ulju služe kao „otisak prsta“, jer su sastav i količina sterola specifični za pojedinu vrstu ulja. U današnje vrijeme kromatografska metoda određivanja sterola može

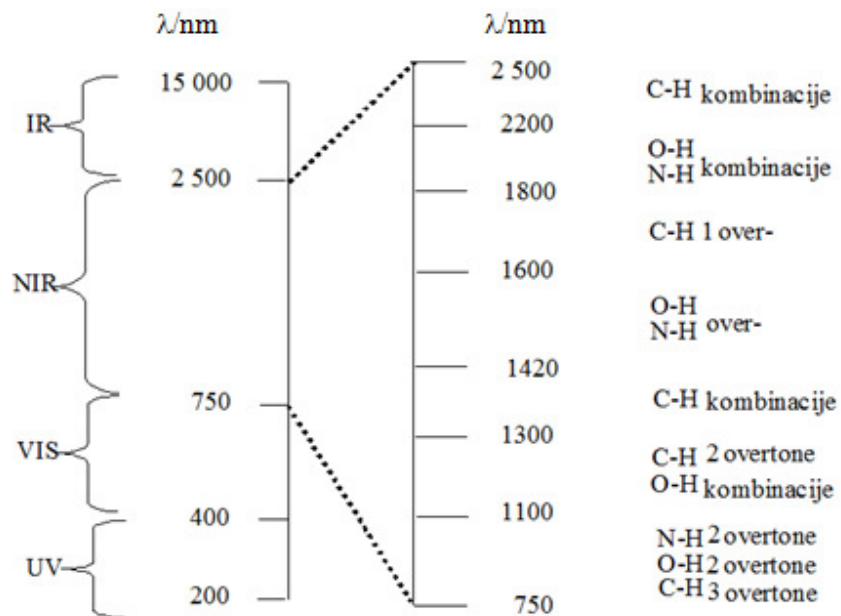
ukazati na dodatak nekog drugog ulja i u niskim koncentracijama, a smatra se najpotpunijom metodom za određivanje patvorenja. Specifična ulja i masti kao arganovo ulje, shea maslac i bučino ulje sadrže veće količine  $\Delta 7$ -sterola (37-69%), dok suncokretovo ulje, ulje sjemena crnog ribiza, palmino ulje i ulje boražine sadrže znatno manji udio navedenih sterola (18-37%). Činjenica da su  $\Delta 7$ -steroli gotovo odsutni u palminim košticama, orahu, uljanoj repice i ulju gorušice vrlo je značajan podatak za procjenu patvorenosti tih specifičnih ulja. Povećani udjel, primjerice, kampesterola i  $\beta$ -sitosterola u bučinom ulju ukazuje na patvorenje, kao i prisutnost fitosterola, poput brakasterola (iz ulja repice) ili  $\Delta 5$ -stigmasterola, koji se inače prirodno ne nalaze u bučinom ulju (Mandl i sur., 1999). Kolesterol se u biljnim uljima pojavljuje u vrlo malim količinama, dok je u životinjskoj masti dominantni sterol zbog čega se patvorenje životinjskih masti biljnim uljima može lako detektirati (Kamm i sur., 2001).

Kvantitativno određivanje tokoferola upotrebom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (eng. high performance liquid chromatography - HPLC) predloženo je kao metoda za određivanje autentičnosti maslinovog ulja s jeftinijim sojinim, lješnjakovim ili uljem sjemenki pamuka, no najkorisnije je kada se koristi uz druge metode poput određivanja sterola i esterificiranih sterola. Sojino ulje može se otkriti u suncokretovom ulju i ulju od kikirikija zbog visokog udjela  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola. Sadržaj tokoferola u ulju ovisi ne samo o njihovoj koncentraciji u sirovini već i o drugim faktorima poput skladištenja i proizvodnje. Tokoferoli se mogu dodati i u rafinirana ulja radi povećanja stabilnosti protiv oksidacije, da bi se produžio rok trajanja finalnog proizvoda (Kamm i sur., 2001).

Skvalen je intermedijarni spoj u biosintezi biljnih sterola te u maslinovom ulju predstavlja oko 0,1-0,7% ulja (sačinjava do 70% neosapunjive frakcije) (Dessi i sur., 2002). Tijekom rafinacije ulja, odnosno postupka bijeljenja nastaju velike količine izomera skvalena, dok se tijekom deodorizacije oko 70% skvalena izgubi. Stoga procjena sadržaja skvalena, uključujući i njegove izomere se može koristiti u otkrivanju prisutnosti rafiniranog maslinovog ulja u djevičanskom maslinovom ulju (Kamm i sur., 2001).

Navedene kromatografske tehnike detekcije patvorenja iako prilično pouzdane često su komplicirane, troše puno kemikalija i zahtijevaju korištenje vrlo skupe opreme. Zbog toga se često koriste u kombinaciji s kemometrijskim metodama. Ove metode uključuju vibracijsku spektroskopiju odnosno infracrvene (npr. NIR - blisko infracrveno područje i FT-IR - Fourierove transformacije srednjeg infracrvenog područja) i Raman tehnike. Navedene analitičke metode služe za provjeru autentičnosti jestivih ulja, a zbog svoje jednostavnosti, brzine i jednostavnosti pripreme uzorka sve su više u upotrebi (Yang i sur., 2005). Jedna od pogodnosti NIR tehnologije je u tome da omogućava istovremeno mjerenje nekoliko sastavnih

tvori putem mjerenja apsorpcijskih pojaseva povezanih s vibracijama molekula. Osim toga, za svaku temeljnu vibraciju postoji odgovarajući niz „overtona“ i kombinacija veza te je za svaku sljedeću vezu „overton“ manjeg intenziteta od prethodnog (Nicolaï i sur., 2007).



Slika 4. NIR „overtoni“ i kombinacije veza (TechRentals, 2015)

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Budući se zbog dobrog imidža i visoke tržišne cijene bučinog ulja javlja mogućnost njegovog patvorenja jeftinijim rafiniranim uljima, cilj ovog rada je u uzorcima bučinog ulja prikupljenim s hrvatskog tržišta odrediti specifične kemijske spojeve, markere patvorenja, te prema njihovom udjelu procijeniti radi li se o čistom bučinom ulju ili onom proizvedenom uz dodatak jeftinijeg, rafiniranog ulja.

U tu svrhu koristit će se metoda izolacije i analize negliceridne frakcije bučinog ulja pomoću plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (eng. gas chromatography with mass spectrometry - GC-MS). Primjenom ove metode moguća je identifikacija i kvantifikacija fitosterola koji općenito služe kao svojevrsan „otisak prsta“ pojedinog ulja, a moguće je odrediti i udjel tokoferola i skvalena, bioaktivnih spojeva također karakterističnih za bučino ulje. Iste kemijske analize provest će se i na laboratorijski proizvedenom bučinom ulju te rafiniranom suncokretovom ulju radi njihove karakterizacije odnosno bolje procjene svojstava čistog bučinog ulja i eventualnih mješavina.

Nadalje, budući je kromatografska analiza određivanja udjela i sastava sterola plinskom kromatografijom izrazito dugotrajna i skupa, određivanjem kolorimetrijskih parametara u CIE-L\*a\*b\* sustavu te mjerenjem spektara u bliskom infracrvenom području (eng. near infrared - NIR) pokušati će se naći brza metoda s dobrom korelacijom prema kemijskim parametrima pomoću koje će biti moguće detektirati patvorenje bučinog ulja.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1. Bučino i suncokretovo ulje

Za provođenje ovog istraživanja korišteno je 25 uzoraka nerafiniranog bučinog ulja prikupljenih s hrvatskog tržišta u travnju 2014. godine. Ulja su bila označena kao „bučino ulje“ ili „nerafinirano bučino ulje“ odnosno niti na jednom nije bilo navedeno da se radi o mješavini sa suncokretovim ili drugim rafiniranim uljem. Ulja su u laboratoriju dobila oznaku redosljedom kojim su nabavljena odnosno od BU-1 do BU-25 te su obilježena čuvana do analize u bočicama od 20 mL pri -18 °C. Osim navedenih bućinih ulja s tržišta kao kontrola je korišten laboratorijski proizveden uzorak bućinog ulja označen kao BU-LAB. Uzorak je pripremljen iz bućinih koštica golica koje su samljevene te im je dodano 15% tople vode i 1,5% soli. Pripremljeno tijesto zagrijavano je u laboratorijskom uređaju za kondicioniranje te prženo 30 minuta nakon što je postiglo temperaturu od 120 °C. Prženo tijesto prešano je na laboratorijskoj pužnoj preši „Komet“, tvrtke „Monforts & Reiners“, Rheydt, model CA/53, a dobiveno ulje nakon bistrenja taloženjem čuvano je pri istim uvjetima kao i ostala analizirana ulja. Radi bolje karakterizacije svojstava i procjene eventualnog patvorenja bućinih ulja s tržišta analizirano je i rafinirano suncokretovo ulje kupljeno u slobodnoj prodaji (SU-K).

#### 3.1.2. Reagensi

Svi reagensi i otapala koji su se koristili u ovom radu bili su najmanje *p.a.* stupnja čistoće. Standardi koji su se koristili bili su *pro chromatography* stupnja čistoće.

- $\alpha$ -kolestanol (Fluka)
- stigmasterol (Sigma Aldrich)
- kampesterol (Fluka)
- $\beta$ -sitosterol (Fluka)
- $\alpha$ -tokoferol (Fluka)
- $\gamma$ -tokoferol (Fluka)
- skvalen (Fluka)
- reagens za sililiranje (mješavina piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana) (Sigma Aldrich)
- aluminijev oksid (Merck)
- kalijev hidroksid (Merck)



- etanol (Carlo Erba)
- dietileter (Carlo Erba)

### 3.1.3. Aparati

Za provođenje kromatografskih, kolorimetrijskih i NIR spektroskopskih analiza korišteni su slijedeći uređaji:

- laboratorijska vaga
- laboratorijski kondicioner
- laboratorijska pužna preša „Komet“, tvrtke „Monforts & Reiners“, Rheydt, model CA/53
- rotavapor
- plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD)
- maseni detektor tipa Agilent Technologies 5973 inet Mass Selective Detector
- kolorimetar Minolta CR-400 (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka Japan)
- NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 $\mu$ m, sa instaliranim Control Development softverom Spec32

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Određivanje sterola, tokoferola i skvalena

Steroli, tokoferol i skvalen određivani su modifikacijom metode HR EN ISO 12228 (2004). Princip metode temelji se na tome da se ulje kojem je dodan  $\alpha$ -kolestanol kao unutarnji standard podvrgava saponifikaciji etanolnom otopinom KOH ( $c = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Neosapunjivi dio ekstrahira se dietileterom na koloni ispunjenoj aluminijevim oksidom. Aluminijev oksid služi da bi zadržao anione masnih kiselina, a propustio negliceridne spojeve. Metoda potom obuhvaća izolaciju sterola pomoću tankoslojne kromatografije, ali u ovom istraživanju je kromatografskoj analizi podvrgnut cijeli neosapunjivi dio kako bi osim sterola odredili i tokoferoli i skvalen. Spojevi u neosapunjivom dijelu analiziranih uzoraka prevedeni su u trimetilsilil estere, a analiza je provedena na plinskom kromatografu sa masenim detektorom.

### 3.2.1.1. Priprema neosapunjive frakcije

U okruglu tikvicu sa ravnim dnom od 100 mL pomoću pipete doda se  $0,25 \pm 0,001$  g uzorka. U tikvicu sa izvaganim uzorkom doda se 1 mL otopine  $\alpha$ -kolestanola ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i 5 mL KOH ( $c = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Dodaju se i dvije do tri kuglice za vrenje.

Interni standard ( $\alpha$ -kolestanol) otopi se u acetonu u koncentraciji  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  u odmjernoj tikvici od 50 – 100 mL (prema potrebi).

Tikvica se spoji na povratno zračno hladilo i zagrijava na plameniku preko azbestne mrežice (Slika 5). Kada sadržaj tikvice zavrije, plamen na plameniku se smanji na najmanji mogući i ostavi da kuha 15 minuta. Nakon 15 min tikvica se odvoji od zračnog hladila te se pomoću pipete doda 5 mL etanola. Nakon što se sadržaj tikvice ohladi slijedi kromatografija na stupcu.



Slika 5. Osapunjenje uzorka ulja (vlastita fotografija)

### 3.2.1.2. Priprema kolone

Kolona za kromatografiju dugačka 25 cm sa sinterom na dnu kolone, unutarnjeg promjera 1,5 cm pričvrsti se za metalni stalak. Na dno kolone stavi se vata do sintera i doda se malo etanola kako bi vata što bolje prionula. Važno je da zrak ne zaostane u vati.

Odvaže se 10 g aluminijevog oksida. U čašu sa aluminijevim oksidom postepeno se doda 20 mL etanola kako bi se sav sadržaj kvantitativno prenio u kolonu za kromatografiju. Punjenje kolone potrebno je provesti pažljivo kako bi se izbjegle moguće pukotine u stupcu aluminijevog oksida. Višak etanola ispusti se iz kolone tako da nivo etanola bude u nivou vrha stupca Al-oksida.

### 3.2.1.3. Ekstrakcija neosapunjivog dijela ulja

Ekstrakcija neosapunjivog dijela (Slika 6) počinje nakon što se uzorak ohladi. Pomoću pipete cijeli uzorak se prebaci iz tikvice u kolonu. Eluat se skuplja u tikvicu od 100 mL okruglog dna. Eluiranje traje dok otopina ne dosegne sam vrh sloja aluminijevog oksida. Nakon toga se tikvica u kojoj se prethodno nalazio uzorak ispere sa 5 mL etanola koji se prenese u kolonu za kromatografiju i nastavi se proces eluiranja. Nakon što etanol dosegne sam vrh sloja aluminijevog oksida, u kolonu se u tri obroka dodaje po 10 mL dietil etera kojim se i završava proces eluiranja. Protok otapala tijekom procesa eluiranja je oko  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Kolona s aluminijevim oksidom je esencijalna za ovaj postupak i ne može se zamijeniti. Dobiveni eluat se otpari do suhog na rotavaporu (Slika 7).



Slika 6. Ekstrakcija neosapunjivog dijela na koloni (vlastita fotografija)



Slika 7. Otparavanje otapala (vlastita fotografija)

### 3.2.1.4. Analiza neosapunjive frakcije plinskom kromatografijom

Nakon uklanjanja otapala na rotavaporu u suhi eluat doda se oko 2 mL dietil etera. Dietil eterom se dobro ispere tikvica kako bi se otopio sav neosapunjivi dio. Sadržaj tikvice se kvantitativno prenese u prethodno izvaganu epruvetu, a dietil eter se iz epruvete otpari dušikom. Preostali sadržaj u epruveti se izvaže. Doda se reagens za sililiranje koji predstavlja mješavinu piridina, heksametildisilazana i trimetilklorsilana u omjeru 5:2:1 u količini 50  $\mu\text{L}$  po svakom miligramu neosapunjive frakcije. Uzorak pomiješan sa reagensom za sililiranje stavi se u sušionik na temperaturu od 105  $^{\circ}\text{C}$  na 15 min. Sadržaj se zatim hladi pa centrifugira 20 minuta na 3000  $\text{min}^{-1}$ . Pomoću propipete odvoji se bistri supernatant te se prebaci u vijalice od 2 mL koje u sebi imaju inserte od 100  $\mu\text{L}$ . Kod prenošenja supernatanta važno je da se ne pokupi talog. Pripremljeni uzorak analiziran je na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljenom sa masenim detektorom tipa Agilent Technologies 5973 inet Mass Selective Detector koji su preko kanala spojeni na računalo. U kompjuterskom sustavu zadani su uvjeti analize koji su postavljeni nakon preliminarnih ispitivanja po kojima su odabrani optimalni uvjeti, a to su temperatura kolone, detektora, injektora i GC/MS sučelja, protok plina i količina uzorka (Tablica 1).

Tablica 1. Uvjeti rada plinskog kromatografa

Kolona	kapilarna TR-50MS (Thermo) 30mx0,32mm, debljina filma 0,25 $\mu\text{m}$
Stacionarna faza	50% fenilpolisilfenilen siloksan
Temperaturni program kolone	180 $^{\circ}\text{C}$ do 270 $^{\circ}\text{C}$ uz 6 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ 270 $^{\circ}\text{C}$ 30 min
Trajanje analize	45 min
Plin nosioc	helij
Protok plina nosioca	1,5 $\text{mL min}^{-1}$
Temperatura injektora	290 $^{\circ}\text{C}$
Split	13,3:1
Temperatura GC/MS sučelja	280 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura detektora	250 $^{\circ}\text{C}$
Količina injektiranog uzorka	1 $\mu\text{L}$

### 3.2.1.5. Identifikacija i kvantifikacija pikova

Pikovi su identificirani korištenjem interne knjižice koja je izrađena prije početka analiza injektiranjem standarda (skvalen,  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferol, kampesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol) i unošenjem njihovih spektara masa u knjižicu, te korištenjem već postojećih knjižica koje su dostupne s programom kojeg je isporučio dobavljač zajedno s aparatom.

Udjel ukupnih sterola izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  i izračunat po formuli [1]:

$$\text{Ukupni steroli} = \frac{\sum A_s * 1000}{A_\alpha * m} \quad [1]$$

gdje je:

$A_s$  = površina svakog pojedinačnog pika fitosterola

$A_\alpha$  = površina ispod pika  $\alpha$ - kolestanola

$m$  = masa uzorka

Udjel pojedinačnih sterola izražen je kao % od ukupnih sterola te je izračunat po formuli [2] :

$$\% \text{ od ukupnih sterola} = \frac{A * 100 \%}{\sum A_i} \quad [2]$$

gdje je :

$A$  = površina ispod pika određenog fitosterola ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

$A_i$  = površina ispod pika svakog pojedinačnog sterola

Udjel  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferola te skvalena izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  i izračunat po formuli [3]:

$$\text{Tokoferoli/skvalen} = \frac{A * 1000}{A_\alpha * m} \quad [3]$$

gdje je:

$A$  = površina pika pojedinačnog tokoferola ili skvalena

$A_\alpha$  = površina ispod pika  $\alpha$ - kolestanola

$m$  = masa uzorka

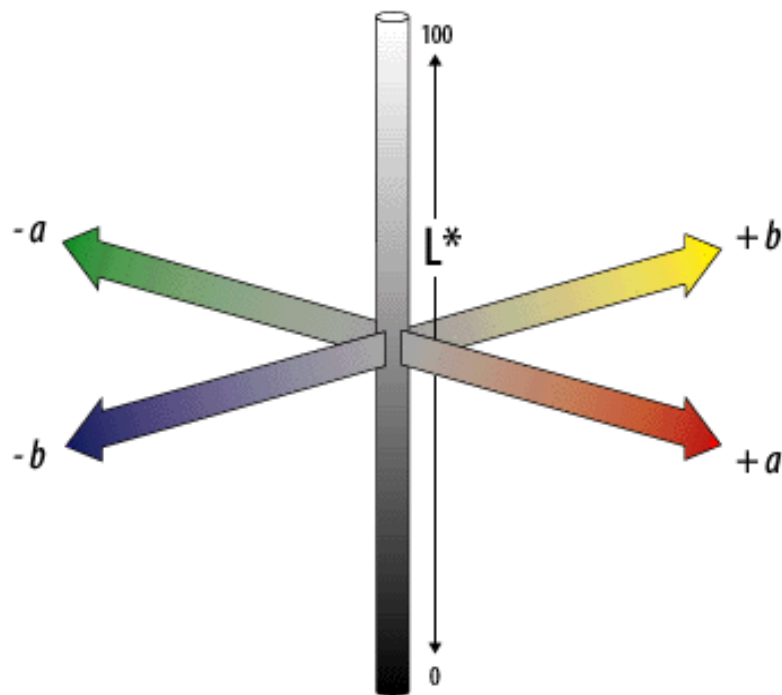
Udjel ukupnih tokoferola izračunat je kao suma  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferola u pojedinom uzorku.

### 3.2.2. Kolorimetrija

Za provođenje analize koristio se kolorimetar Minolta CR-400 (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka Japan). Prije svake serije mjerenja kolorimetar je kalibriran na bijelu pločicu. Boja uzoraka ulja mjerena je u staklenoj kiveti volumena 5 mL i širine 5 mm.

Mjerenjem su dobiveni podaci tristimulus sustava za vizualno podudaranje boja pod standardiziranim uvjetima odnosno putem CIE-L\*a\*b\* vrijednosti prema metodi HRN EN ISO 11664-4 (2012).

Pomoću L\* vrijednosti određuje se je li neki predmet taman ili svijetao. Ako je L\* = 0 tada je predmet crne boje, a ako je L\* = 100 predmet je bijel. a\* vrijednost određuje je li neki predmet crvene ili zelene boje. Ako je a\* pozitivan predmet je crvene boje, a ako je a\* negativan predmet je zelen. b\* vrijednost određuje je li neki predmet žute ili plave boje. Ako je b\* pozitivan predmet je žute boje, a ako je b\* negativan predmet je plav. Vizualni prikaz očitavanja boje u CIE-L\*a\*b\* sustavu nalazi se na slici 8.



Slika 8. Prikaz načina očitavanja boje u CIE-L\*a\*b\* sustavu (Anonymous 2, 2012)

Udaljenost između dvije točke u koordinatnom sustavu boje izražava se kao  $\Delta E_{ab}$ . Veza između izračunate promjene boje,  $\Delta E_{ab}$  i ljudske percepcije boje dana je u tablici 2.

Tablica 2. Veza između izračunate promjene boje,  $\Delta E_{ab}$  i ljudske percepcije boje

$\Delta E_{ab}$	Vidljivost razlike ljudskim okom
< 0,2	Nije vidljiva razlika
0,2 – 1	Vrlo mala vidljivost razlike
1 – 3	Mala vidljivost razlike
3 – 6	Prosječna vidljivost razlike
> 6	Velika vidljivost razlike

Na temelju dobivenih vrijednosti izračunata je promjena boje  $\Delta E_{ab}$ ,

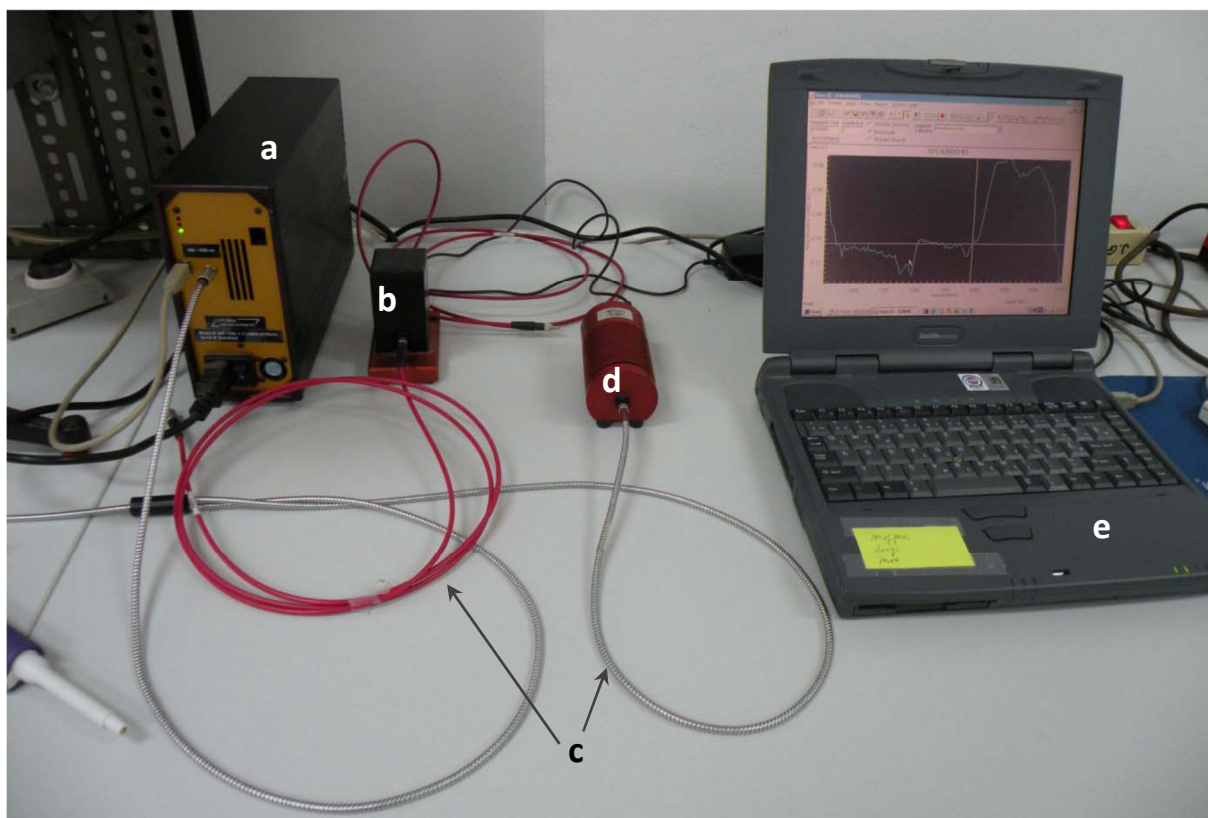
$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad [4]$$

### 3.2.3. Spektroskopija u bliskom infracrvenom području

Bliska infracrvena spektroskopija (engl. near infrared spectroscopy - NIR) temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja valne duljine u rasponu od 780 do 2500 nm, a glavna prednost ove tehnike je u tome što obično nije potrebna priprema uzorka, stoga je analiza vrlo jednostavna i brza (Huang i sur., 2008). NIR spektar hrane obuhvaća široke skupove koji proizlaze iz preklapanja odgovarajućih apsorpcija, uglavnom overtona i kombinacije vibracijskih vrpca koje uključuju C-H, O-H i N-H kemijske veze (Alishahi i sur., 2010).

Za NIR spektroskopiju koristio se NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 $\mu$ m, s instaliranim Control Development softverom Spec32 kao neinvazivna tehnika u bliskom infracrvenom području od 904 do 1699 nm, u kojem se reflektira zračenje bučinog ulja.

Oprema za NIR spektroskopiju prikazana je na slici 9. Svaki uzorak bučinog ulja snimao se tri puta, te su se izračunale srednje vrijednosti.



Slika 9. Oprema za NIR spektroskopiju (a) NIR instrument; (b) mjesto za snimanje uzoraka u kivetu; (c) optički kablovi; (d) izvor svjetla; (e) računalo. (vlastita fotografija)

### 3.2.4. Statistička obrada podataka

Za obradu podataka koristio se program XLStat 2014 (Addinsoft, New York, SAD) koji je instaliran kao aplikacija unutar programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, SAD). Iz dobivenih rezultata analiza izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije na osnovu najmanje  $n=3$  ponavljanja. Također je provedeno određivanje korelacije između određivanih fizikalno-kemijskih parametara.

Od kemometrijskih metoda koristila se analiza glavnih komponenti (eng. principal component analysis – PCA) kako bi se identificirao obrazac eksperimentalnih podataka te da se izraze podaci temeljeni na njihovoj sličnosti i raznolikosti. Na dvije grupe uzoraka izdvojenih analizom glavnih komponenata provedena je i jednosmjerna analiza varijance (eng. one-way analysis of variance – ANOVA) da se utvrdi signifikantnost razlika među grupama.

Na temelju podataka kromatografskih, kolorimetrijskih i NIR spektroskopskih analiza uzoraka bučinog ulja pomoću funkcije *LINEST* izvedeni su predikcijski modeli kojima je moguće predvidjeti koncentracije određivanih spojeva na osnovu značajnih parametara boje ili



jedinica apsorpcije pri značajnim valnim duljinama. Kao značajni izabrani su parametri koji su pokazali signifikantnu korelaciju s rezultatima kemijskih analiza.

Podaci su organizirani u matricu  $\mathbf{X}$  s uzorcima postavljenim u redovima i NIR spektrima ili parametrima boje smještenim u stupcima. Svaki vektor varijable je automatski skaliran s pripadnom valnom duljinom uzorka te se prikazuje kao:

$$\mathbf{X}_{i,j} \leftarrow \frac{X_{i,j} - \bar{X}_j}{\sigma_j(X_j)} \quad [5]$$

### 3.2.4.1. Modeli bazirani na kolorimetriji

Značajni parametri kolorimetrijskih mjerenja ( $L$  i  $\Delta E_{ab}$ ) korišteni su dalje u predikcijskim modelima koji su linearni regresijski modeli sljedećeg osnovnog oblika:

$$y_i = \sum a_{i,j} \cdot KP_j + e_i \quad [6]$$

$$y_i = a_{i,1} \cdot KP_1 + a_{i,2} \cdot KP_2 + e_i \quad [7]$$

te uključanjem ključnih kolorimetrijskih parametara (KP), izraz poprima sljedeći oblik:

$$y_i = a_{i,1} \cdot L + a_{i,2} \cdot \Delta E_{ab} + e_i \quad [8]$$

gdje je:

$y_i$  – zavisna varijabla;  $i = 1, \dots, 11$ ;

( $i = 1$ , skvalen;  $i = 2$ ,  $\gamma$ -tokoferol;  $i = 3$ ,  $\alpha$ -tokoferol;  $i = 4$ , kampesterol;  $i = 5$ ,  $\Delta 5$ -stigmasterol;  $i = 6$ ,  $\beta$ -sitosterol;  $i = 7$ , spinasterol;  $i = 8$ , stigmastatrienol;  $i = 9$ , stigmastadienol;  $i = 10$ ,  $\Delta 7$ -stigmasterol;  $i = 11$ ,  $\Delta 7$ -avenasterol)

indeks  $j$  se odnosi na promatrane kolorimetrijske parametre (KP);

( $j = 1$ ,  $L$ ;  $j = 2$ ,  $\Delta E_{ab}$ )

$e$  – odstupanje od funkcionalnog odnosa (greška modela)

### 3.2.4.2. Modeli bazirani na NIR spektroskopiji

Značajne valne duljine izdvojene iz apsorpcijskih spektara korištene su dalje u predikcijskim modelima koji su također linearni regresijski modeli, a njihov osnovni oblik je sljedeći:

$$y_i = b_i + \sum a_{i,j} \cdot AU_{\lambda_j} + e_i \quad [9]$$

$$y_i = b_i + a_{i,1} \cdot AU_{\lambda_1} + a_{i,2} \cdot AU_{\lambda_2} + \dots + a_{i,18} \cdot AU_{\lambda_{18}} + a_{i,19} \cdot AU_{\lambda_{19}} + e_i \quad [10]$$

te uključenjem ključnih valnih duljina, izraz poprima sljedeći oblik:

$$y_i = b_i + a_{i,1} \cdot AU_{904} + a_{i,2} \cdot AU_{905} + \dots + a_{i,18} \cdot AU_{921} + a_{i,4} \cdot AU_{922} + e_i \quad [11]$$

gdje je:

$y_i$  – zavisna varijabla;  $i= 1, \dots, 11$ ;

( $i=1$ , skvalen;  $i=2$ ,  $\gamma$ -tokoferol;  $i=3$ ,  $\alpha$ -tokoferol;  $i=4$ , kampesterol;  $i=5$ ,  $\Delta 5$ -stigmasterol;  $i=6$ ,  $\beta$ -sitosterol;  $i=7$ , spinasterol;  $i=8$ , stigmastatrienol;  $i=9$ , stigmastadienol;  $i=10$ ,  $\Delta 7$ -stigmasterol;  $i=11$ ,  $\Delta 7$ -avenasterol)

indeks  $j$  se odnosi na promatrane apsorpcijske spektre (AU) pri valnim duljinama 904 – 922 nm.

$e$  – odstupanje od funkcionalnog odnosa (greška modela)

Reprezentativnost regresijskog modela ocjenjuje se koeficijentom determinacije ( $R^2$ ) prema Chadockovoj ljestvici (Tablica 3) koji pokazuje vezu između promatrane zavisne i nezavisnih varijabli modela (Cukor, 2006). Što je koeficijent determinacije bliži jedinici to je veza među promatranim varijablama reprezentativnija tj. čvršća.

Tablica 3. Chadockova ljestvica (Cukor, 2006)

$R^2$	Značenje
0	odsutnost veze
0,01-0,25	slaba veza
0,25-0,64	veza srednje jakosti
0,64-1	čvrsta veza
1	potpuna veza

## **4. REZULTATI**

U ovom poglavlju prikazani su rezultati kromatografskih, kolorimetrijskih, NIR spektroskopskih i statističkih analiza provedenih u svrhu istraživanja autentičnosti uzoraka bučinog ulja s hrvatskog tržišta. Rezultati najmanje 3 paralelna određivanja kemijskih i kolorimetrijskih parametara prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, a rezultati NIR spektroskopije kao srednje vrijednosti.

Tablice 4 i 5 prikazuju udjele (%) pojedinačnih  $\Delta 5$ - i  $\Delta 7$ -sterola, a tablica 6 koncentracije ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) ukupnih sterola, pojedinačnih i ukupnih tokoferola te skvalena određene GC-MS metodom u uzorcima bučinog ulja s tržišta (BU-1 do BU-25) i laboratorijskog bučinog ulje (BU-LAB) te rafiniranog suncokretovog ulja (SU-K).

Na osnovu analitičkih podataka provedena je analiza korelacije odnosno utvrđivanje statističke povezanosti među određivanim varijablama. Koeficijenti korelacije između određivanih kemijskih parametara prikazani su u tablici 7. Statistička obrada podataka uključila je i analizu osnovnih komponenti te one-way ANOVA-u rezultati kojih su prikazani na slikama 10 i 11 i u tablici 8.

Na slici 12 prikazani su GC-MS kromatogrami skvalena, tokoferola i sterola u čistom bučinom ulju, čistom suncokretovom ulju i bučinom ulju s tržišta.

Rezultati kolorimetrijskih određivanja u uzorcima bučinog i suncokretovog ulja prikazani su u tablici 9, a NIR spektri istih uzoraka na slici 13.

Usporedbom odnosno statističkom obradom dobivenih rezultata kolorimetrije i NIR spektroskopije te rezultata GC-MS analiza dobiveni su koeficijenti korelacije koji su za značajne varijable prikazani u tablici 10. Tablice 11 i 12 prikazuju rezultate izrađenih modela veze između značajnih kolorimetrijskih veličina i NIR spektara sa zavisnim varijablama.

Tablica 4. Udjeli  $\Delta 5$ -sterola<sup>a</sup> u uzorcima bučinog ulja s tržišta (BU-1 do BU-25), laboratorijskog bučinog ulja (BU-LAB) i rafiniranog suncokretovog ulja (SU-K)

Uzorak	Kampesterol (%)	Kampestanol (%)	$\Delta 5$ -stigmasterol (%)	$\beta$ -sitosterol (%)	Ukupni $\Delta 5$ -steroli (%)
BU-1	2,33±0,04	0,87±0,08	1,57±0,06	7,06±0,12	11,83±0,30
BU-2	0,21±0,00	0,52±0,00	0,90±0,04	3,23±0,13	4,86±0,17
BU-3	2,90±0,08	0,89±0,02	1,45±0,04	8,47±0,11	13,71±0,25
BU-4	3,35±0,13	1,22±0,04	4,26±0,15	7,42±0,27	16,25±0,59
BU-5	4,76±0,06	0,64±0,05	4,83±0,22	27,89±0,24	38,12±0,57
BU-6	3,67±0,10	1,29±0,02	6,70±0,17	31,32±0,49	42,98±0,78
BU-7	2,23±0,04	0,69±0,04	1,40±0,06	7,50±0,09	11,81±0,23
BU-8	5,92±0,09	0,70±0,01	6,16±0,09	27,34±0,27	40,12±0,46
BU-9	5,70±0,07	0,71±0,06	5,51±0,13	30,54±0,33	42,45±0,59
BU-10	3,09±0,13	0,77±0,05	1,82±0,05	11,36±0,41	17,04±0,63
BU-11	5,62±0,03	0,67±0,04	5,61±0,20	31,57±2,56	43,47±2,83
BU-12	5,55±0,13	0,66±0,03	6,37±0,12	32,16±0,08	44,74±0,35
BU-13	4,21±0,18	0,84±0,02	6,77±0,36	21,97±0,30	33,78±0,87
BU-14	6,11±0,25	0,82±0,06	5,35±0,29	28,34±0,20	40,61±0,81
BU-15	4,70±0,22	1,22±0,06	3,26±0,18	13,59±0,68	22,78±1,14
BU-16	5,02±0,21	0,63±0,04	4,90±0,06	26,98±0,13	37,53±0,44
BU-17	2,26±0,07	0,86±0,09	1,39±0,09	6,04±0,14	10,55±0,39
BU-18	1,95±0,27	0,66±0,18	1,06±0,20	5,98±0,41	9,64±1,06
BU-19	3,54±0,20	0,75±0,05	2,82±0,11	12,92±0,41	20,02±0,77
BU-20	3,74±0,23	0,80±0,15	3,60±0,45	12,69±0,49	20,83±1,31
BU-21	3,78±0,06	0,91±0,06	2,27±0,10	12,54±0,44	19,49±0,66
BU-22	3,78±0,16	0,86±0,02	2,36±0,15	12,70±0,33	19,70±0,66
BU-23	2,49±0,14	1,04±0,01	1,09±0,07	6,35±0,27	10,97±0,49
BU-24	5,42±0,15	0,61±0,03	5,71±0,16	29,98±0,48	41,73±0,81
BU-25	5,29±0,09	0,50±0,05	4,41±0,26	27,60±0,33	37,81±0,73
Raspon (Min - Max)	0,21-6,11	0,50-1,29	0,90-6,77	3,23-32,16	4,86-44,74
BU-LAB	2,28±0,11	0,86±0,08	2,44±0,29	7,19±0,12	12,78±0,60
SU-K	9,76±0,14	0,45±0,07	11,84±0,12	70,10±0,02	92,15±0,36

<sup>a</sup> Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija najmanje n=3 određivanja

Tablica 5. Udjeli  $\Delta^7$ -sterola<sup>a</sup> u uzorcima bučinog ulja s tržišta (BU-1 do BU-25), laboratorijskog bučinog ulja (BU-LAB) i rafiniranog suncokretovog ulja (SU-K)

Uzorak	Spinasterol (%)	Stigmastatrienol (%)	Stigmastadienol (%)	$\Delta^7$ -stigma-sterol (%)	Avenasterol (%)	Ukupni $\Delta^7$ -steroli (%)
BU-1	22,08±0,29	24,19±0,45	25,84±0,74	1,53±0,15	14,53±0,16	88,17±1,80
BU-2	26,14±0,32	23,54±0,47	25,93±0,39	1,01±0,07	18,52±0,36	95,14±1,61
BU-3	23,13±0,26	21,89±0,30	24,84±0,75	1,19±0,14	15,25±0,16	86,29±1,61
BU-4	22,29±0,28	22,20±0,17	21,92±0,62	1,47±0,01	15,87±0,31	83,75±1,40
BU-5	14,43±0,31	16,59±0,09	16,70±0,18	0,57±0,04	13,59±0,31	61,88±0,92
BU-6	14,59±0,40	15,58±0,20	15,48±0,33	0,80±0,02	10,58±0,18	57,02±1,12
BU-7	24,49±0,21	22,93±0,31	24,01±0,37	1,29±0,10	15,47±0,14	88,19±1,13
BU-8	13,32±0,40	17,63±0,17	15,20±0,92	1,00±0,07	12,73±0,29	59,88±1,85
BU-9	13,10±0,22	15,28±0,42	15,93±0,42	0,57±0,03	12,67±0,50	57,55±1,59
BU-10	23,88±0,09	20,91±0,42	21,29±0,37	1,03±0,08	15,86±0,10	82,96±1,06
BU-11	13,21±0,87	15,18±0,85	14,69±0,43	1,36±0,16	12,09±0,78	56,53±3,09
BU-12	12,74±0,21	15,71±0,21	12,84±0,16	0,36±0,00	13,62±0,22	55,26±0,81
BU-13	14,95±0,33	17,36±0,21	19,14±0,81	1,43±0,04	13,32±0,01	66,22±1,39
BU-14	14,85±0,14	14,17±0,22	17,56±0,58	0,19±0,05	12,62±0,36	59,39±1,35
BU-15	19,51±0,27	21,93±0,43	20,86±0,22	0,09±0,02	14,83±0,48	77,22±1,41
BU-16	16,01±0,22	16,31±0,27	16,86±0,48	0,46±0,48	12,84±0,22	62,47±1,66
BU-17	24,43±0,39	25,26±0,07	22,85±0,21	1,16±0,03	15,75±0,14	89,45±0,84
BU-18	25,62±0,12	25,50±0,56	21,96±0,42	1,11±0,13	16,16±0,23	90,36±1,45
BU-19	22,00±1,01	19,93±0,46	22,17±1,09	0,86±0,52	15,02±0,25	79,98±3,32
BU-20	20,97±0,44	20,60±0,22	21,18±0,58	1,38±0,08	15,04±0,22	79,17±1,54
BU-21	22,59±0,62	20,16±0,27	21,64±0,33	0,94±0,09	15,18±0,25	80,51±1,56
BU-22	23,00±0,33	20,21±0,13	21,88±0,14	1,03±0,13	14,18±0,58	80,30±1,31
BU-23	24,69±0,29	23,44±0,40	23,58±0,63	0,89±0,03	16,42±1,08	89,03±2,43
BU-24	14,40±0,50	14,22±0,15	17,67±0,11	0,58±0,04	11,41±0,09	58,27±0,89
BU-25	15,10±0,13	16,96±0,29	15,52±0,48	1,21±0,06	13,40±0,12	62,19±1,07
Raspon (Min - Max)	12,74-26,14	14,17-25,50	12,84-25,93	0,09-1,53	10,58-18,52	55,26-95,14
BU-LAB	21,80±0,22	23,83±0,24	25,52±0,21	1,75±0,09	14,30±0,17	87,22±0,92
SU-K	0,00±0,00	2,68±0,00	4,86±0,20	0,30±0,01	0,00±0,00	7,85±0,21

<sup>a</sup> Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija najmanje n=3 određivanja

Tablica 6. Udjeli ukupnih sterola, skvalena i tokoferola<sup>a</sup> u uzorcima bučinog ulja s tržišta (BU-1 do BU-25), laboratorijskog bučinog ulja (BU-LAB) i rafiniranog suncokretovog ulja (SU-K)

Uzorak	Ukupni steroli (mg kg <sup>-1</sup> )	Skvalen (mg kg <sup>-1</sup> )	α-tokoferol (mg kg <sup>-1</sup> )	γ-tokoferol (mg kg <sup>-1</sup> )	Ukupni tokoferoli (mg kg <sup>-1</sup> )
BU-1	2286,0±15,8	1980,7±43,1	62,8±5,8	226,4±7,1	289,2±12,9
BU-2	1806,6±8,0	1983,0±26,8	24,6±1,3	231,7±9,0	256,2±10,3
BU-3	2532,0±40,0	1872,8±52,2	65,3±4,3	261,1±2,7	326,3±7,0
BU-4	2080,4±38,5	1966,3±79,2	52,9±1,0	168,8±5,1	221,7±6,1
BU-5	2085,1±98,2	1179,1±59,2	78,0±4,1	115,1±1,6	193,1±5,7
BU-6	2431,0±15,1	1121,7±1,9	154,4±2,1	169,6±5,8	324,0±7,9
BU-7	2020,5±21,9	1772,0±66,5	55,6±3,4	245,2±4,3	300,8±7,7
BU-8	1765,1±18,5	924,3±35,9	87,3±7,8	127,0±2,7	214,3±10,5
BU-9	1977,0±33,9	921,4±20,2	116,1±7,8	133,6±10,1	249,8±17,9
BU-10	2391,4±54,5	1896,8±120,3	59,6±7,5	116,2±3,2	175,9±10,6
BU-11	2219,5±56,9	1091,9±47,4	98,2±3,9	118,3±4,2	216,5±8,1
BU-12	1969,4±101,8	1677,1±80,1	89,1±4,1	86,1±4,2	175,2±8,4
BU-13	1885,3±1,2	1795,8±25,7	63,9±2,0	180,2±9,6	244,1±11,6
BU-14	1973,7±17,7	1142,1±65,8	116,1±2,7	158,6±2,5	274,7±5,2
BU-15	2127,4±35,4	1367,1±35,3	64,7±5,4	181,0±4,7	245,7±10,1
BU-16	2075,7±10,8	863,8±40,1	111,5±2,1	133,8±7,7	245,2±9,8
BU-17	2002,1±9,4	1791,6±10,5	30,6±2,5	169,1±7,2	199,7±9,6
BU-18	2028,4±25,9	1854,5±14,4	32,7±7,7	230,6±26,8	263,2±34,5
BU-19	2232,9±77,8	1217,3±15,0	29,1±4,7	89,3±16,7	118,5±21,3
BU-20	2093,6±26,1	1254,8±140,7	61,9±5,0	152,6±5,2	214,6±10,2
BU-21	2353,0±37,1	1795,6±14,6	75,2±4,6	211,0±7,4	286,2±12,0
BU-22	2108,6±41,4	1173,1±57,5	64,8±3,7	163,4±7,7	228,2±11,4
BU-23	2006,3±52,9	2058,6±69,2	40,3±1,0	276,0±20,8	316,3±21,7
BU-24	2491,6±63,9	1117,4±38,0	132,5±13,1	124,2±13,8	256,7±27,0
BU-25	2002,5±41,5	766,8±56,0	66,5±1,7	81,5±4,3	148,0±6,1
Raspon (Min - Max)	1765,1-2532,0	766,8-2058,6	24,6-154,4	86,1-276,0	118,5-326,3
BU-LAB	2284,2±22,6	1923,5±41,9	63,9±3,9	228,5±3,6	292,4±7,5
SU-K	2250,2±62,5	73,8±2,0	246,6±10,1	18,2±1,4	264,8±11,5

<sup>a</sup> Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija najmanje n=3 određivanja

Tablica 7. Koeficijenti korelacije<sup>a</sup> između varijabli određenih GC-MS analizom

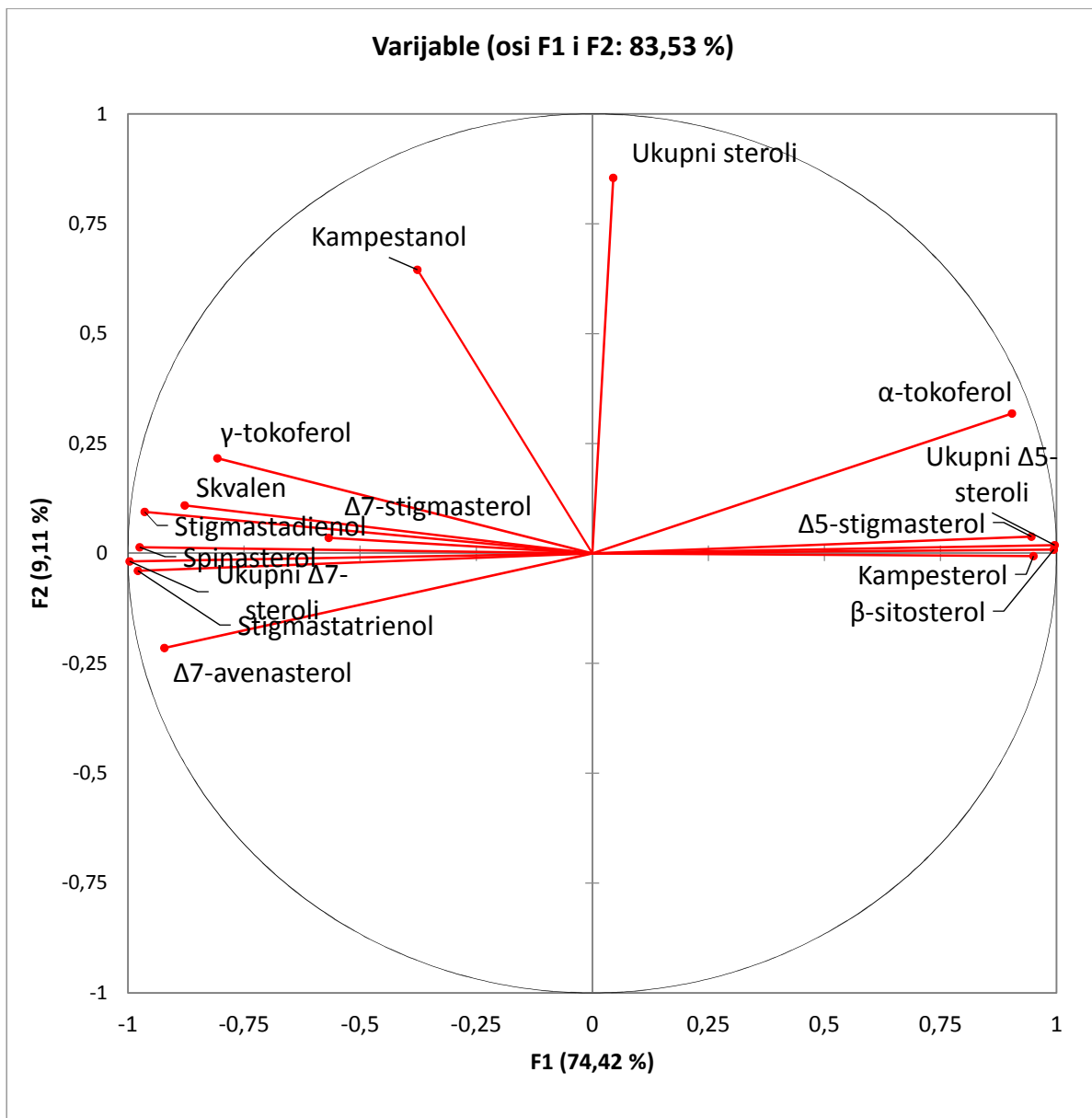
<b>Varijable</b>	Skvalen	$\gamma$ -tokoferol	$\alpha$ -tokoferol	Kampesterol	Kampestanol	$\Delta 5$ -stigma-sterol	$\beta$ -sitosterol	Ukupni $\Delta 5$ -steroli	Spinasterol	Stigma-statrienol	Stigma-stadienol	$\Delta 7$ -stigma-sterol	$\Delta 7$ -avenasterol	Ukupni $\Delta 7$ -steroli	Ukupni steroli
Skvalen	<b>1</b>	<b>0,7740</b>	<b>-0,7498</b>	<b>-0,8460</b>	<b>0,4002</b>	<b>-0,7600</b>	<b>-0,8467</b>	<b>-0,8450</b>	<b>0,8142</b>	<b>0,8355</b>	<b>0,8227</b>	<b>0,5116</b>	<b>0,7852</b>	<b>0,8450</b>	0,0114
$\gamma$ -tokoferol	<b>0,7740</b>	<b>1</b>	<b>-0,5606</b>	<b>-0,7823</b>	<b>0,4402</b>	<b>-0,7370</b>	<b>-0,7720</b>	<b>-0,7767</b>	<b>0,7505</b>	<b>0,7636</b>	<b>0,8166</b>	<b>0,4302</b>	<b>0,6406</b>	<b>0,7767</b>	0,0145
$\alpha$ -tokoferol	<b>-0,7498</b>	<b>-0,5606</b>	<b>1</b>	<b>0,8194</b>	-0,1883	<b>0,8603</b>	<b>0,9126</b>	<b>0,9098</b>	<b>-0,8727</b>	<b>-0,9068</b>	<b>-0,8238</b>	<b>-0,5019</b>	<b>-0,9403</b>	<b>-0,9098</b>	0,2833
Kampesterol	<b>-0,8460</b>	<b>-0,7823</b>	<b>0,8194</b>	<b>1</b>	-0,3000	<b>0,8889</b>	<b>0,9256</b>	<b>0,9408</b>	<b>-0,9301</b>	<b>-0,9191</b>	<b>-0,9159</b>	<b>-0,5708</b>	<b>-0,8480</b>	<b>-0,9408</b>	0,0196
Kampestanol	<b>0,4002</b>	<b>0,4402</b>	-0,1883	-0,3000	<b>1</b>	-0,2242	<b>-0,3919</b>	-0,3551	0,3423	<b>0,3810</b>	0,3621	0,1073	0,2755	0,3551	0,2479
$\Delta 5$ -stigma-sterol	<b>-0,7600</b>	<b>-0,7370</b>	<b>0,8603</b>	<b>0,8889</b>	-0,2242	<b>1</b>	<b>0,9429</b>	<b>0,9592</b>	<b>-0,9664</b>	<b>-0,9300</b>	<b>-0,9224</b>	<b>-0,4333</b>	<b>-0,8786</b>	<b>-0,9592</b>	-0,0240
$\beta$ -sitosterol	<b>-0,8467</b>	<b>-0,7720</b>	<b>0,9126</b>	<b>0,9256</b>	<b>-0,3919</b>	<b>0,9429</b>	<b>1</b>	<b>0,9976</b>	<b>-0,9772</b>	<b>-0,9782</b>	<b>-0,9644</b>	<b>-0,5427</b>	<b>-0,9288</b>	<b>-0,9976</b>	0,0508
Ukupni $\Delta 5$ -steroli	<b>-0,8450</b>	<b>-0,7767</b>	<b>0,9098</b>	<b>0,9408</b>	-0,3551	<b>0,9592</b>	<b>0,9976</b>	<b>1</b>	<b>-0,9841</b>	<b>-0,9783</b>	<b>-0,9665</b>	<b>-0,5389</b>	<b>-0,9268</b>	<b>-1,0000</b>	0,0411
Spinasterol	<b>0,8142</b>	<b>0,7505</b>	<b>-0,8727</b>	<b>-0,9301</b>	0,3423	<b>-0,9664</b>	<b>-0,9772</b>	<b>-0,9841</b>	<b>1</b>	<b>0,9478</b>	<b>0,9437</b>	<b>0,4894</b>	<b>0,8929</b>	<b>0,9841</b>	0,0109
Stigma-statrienol	<b>0,8355</b>	<b>0,7636</b>	<b>-0,9068</b>	<b>-0,9191</b>	<b>0,3810</b>	<b>-0,9300</b>	<b>-0,9782</b>	<b>-0,9783</b>	<b>0,9478</b>	<b>1</b>	<b>0,9234</b>	<b>0,5532</b>	<b>0,8994</b>	<b>0,9783</b>	-0,0949
Stigma-stadienol	<b>0,8227</b>	<b>0,8166</b>	<b>-0,8238</b>	<b>-0,9159</b>	0,3621	<b>-0,9224</b>	<b>-0,9644</b>	<b>-0,9665</b>	<b>0,9437</b>	<b>0,9234</b>	<b>1</b>	<b>0,5491</b>	<b>0,8409</b>	<b>0,9665</b>	0,0634
$\Delta 7$ -stigma-sterol	<b>0,5116</b>	<b>0,4302</b>	<b>-0,5019</b>	<b>-0,5708</b>	0,1073	<b>-0,4333</b>	<b>-0,5427</b>	<b>-0,5389</b>	<b>0,4894</b>	<b>0,5532</b>	<b>0,5491</b>	<b>1</b>	<b>0,3977</b>	<b>0,5389</b>	0,0477
$\Delta 7$ -avenasterol	<b>0,7852</b>	<b>0,6406</b>	<b>-0,9403</b>	<b>-0,8480</b>	0,2755	<b>-0,8786</b>	<b>-0,9288</b>	<b>-0,9268</b>	<b>0,8929</b>	<b>0,8994</b>	<b>0,8409</b>	<b>0,3977</b>	<b>1</b>	<b>0,9268</b>	-0,2127
Ukupni delta7-steroli	<b>0,8450</b>	<b>0,7767</b>	<b>-0,9098</b>	<b>-0,9408</b>	0,3551	<b>-0,9592</b>	<b>-0,9976</b>	<b>-1,0000</b>	<b>0,9841</b>	<b>0,9783</b>	<b>0,9665</b>	<b>0,5389</b>	<b>0,9268</b>	<b>1</b>	-0,0411
Steroli ukupno	0,0114	0,0145	0,2833	0,0196	0,2479	-0,0240	0,0508	0,0411	0,0109	-0,0949	0,0634	0,0477	-0,2127	-0,0411	<b>1</b>

<sup>a</sup>Masnim slovima otisnuti koeficijenti korelacije statistički su značajni na razini 95%

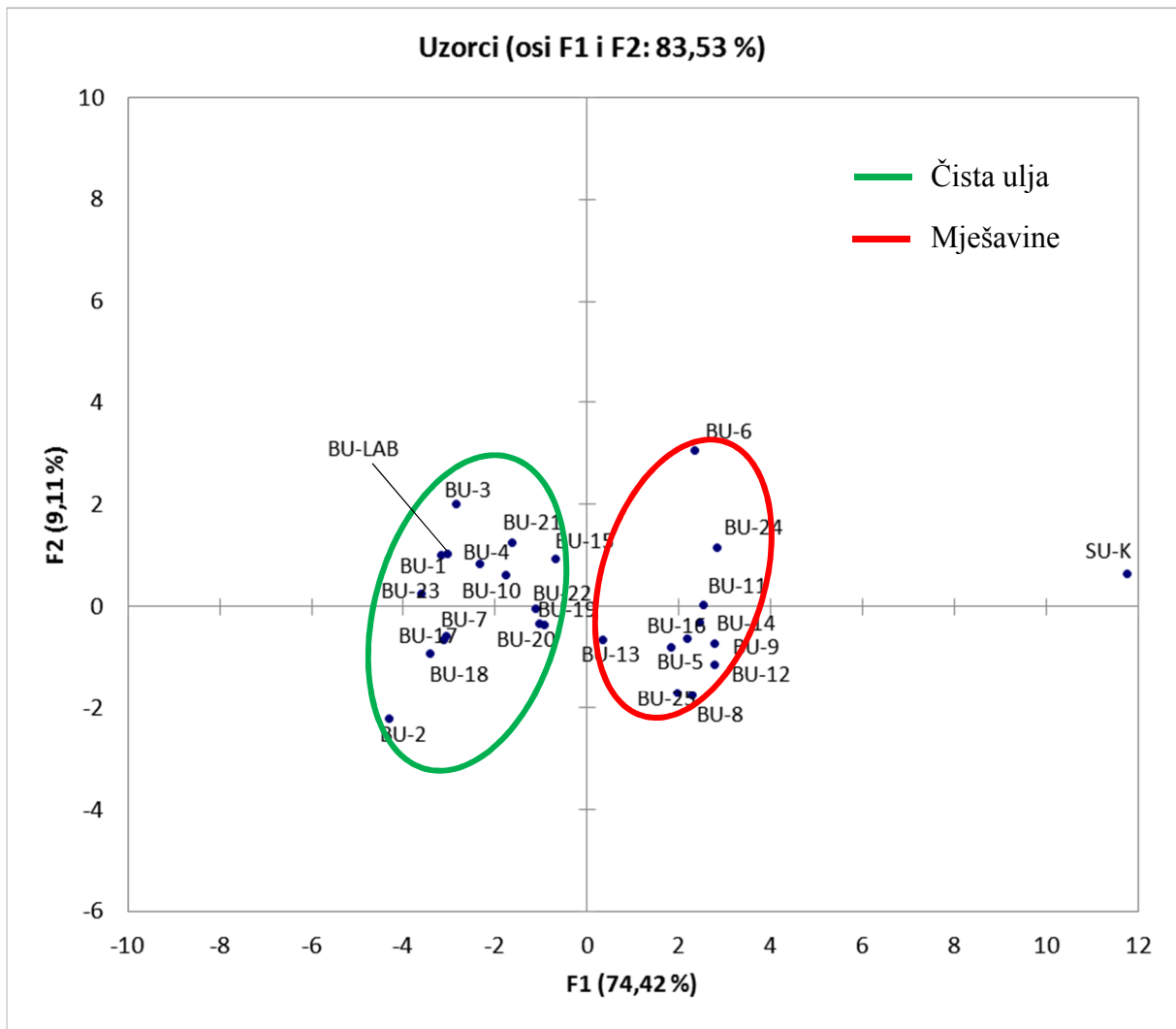


Analiza osnovnih komponenti (PCA) je jedna od metoda višedimenzionalne statističke analize. Jedna od zadaća analize osnovnih komponenti je sažimanje većega broja međusobno povezanih izvornih varijabli u manji broj zajedničkih osnovnih komponenti (faktora) koji će ih opisivati i objasniti njihovu međusobnu povezanost.

Projekcija izvornih varijabli odnosno njihovih faktorskih opterećenja (Slika 10) i vrijednosti svakog uzorka za faktor (Slika 11) u prostoru osnovnih komponenti (F1 i F2) omogućava dvodimenzionalnu vizualizaciju odnosa izvornih varijabli i načina na koji utječu na sličnosti ili razlike između uzoraka.



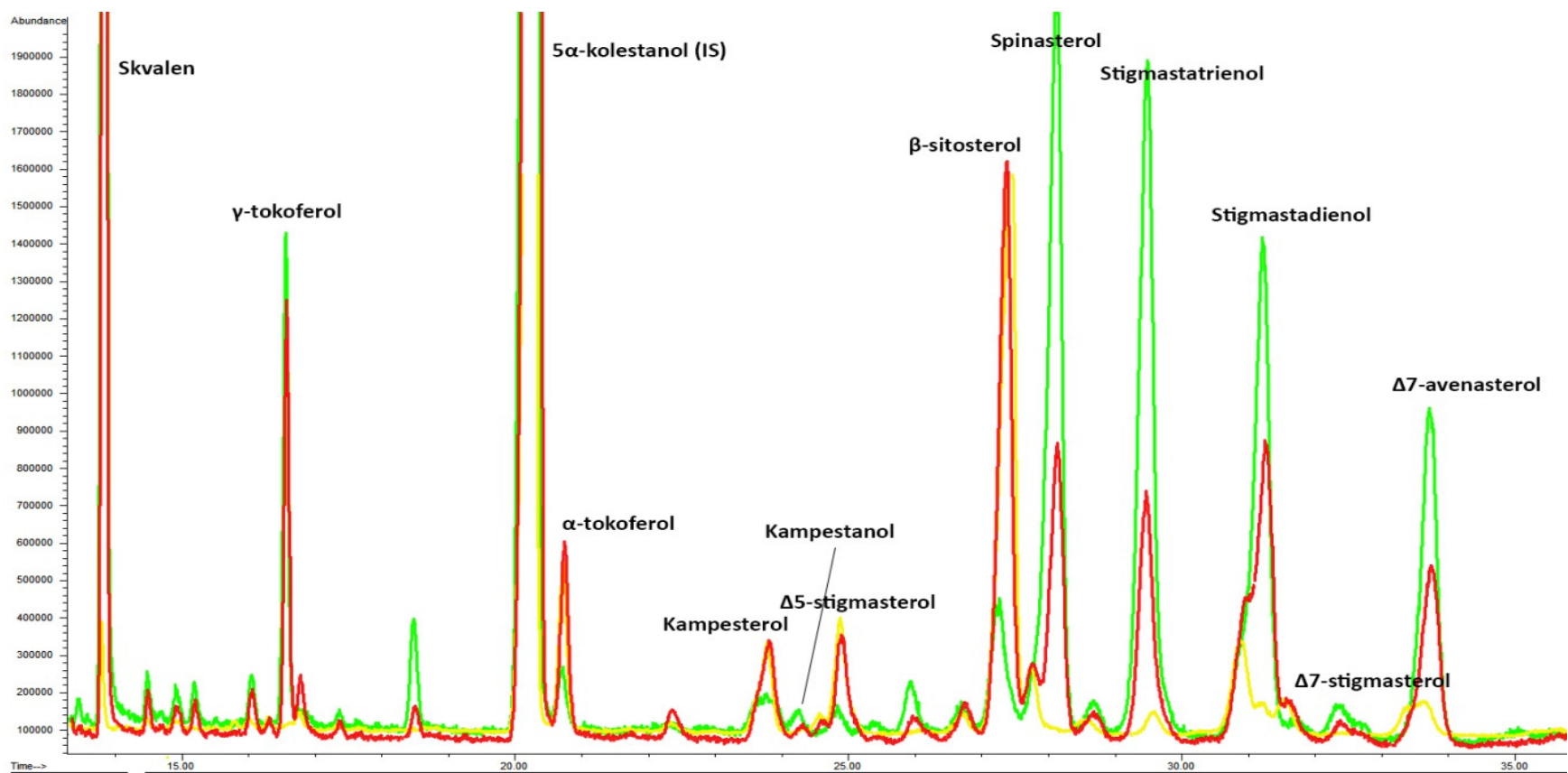
Slika 10. Projekcija aktivnih varijabli u ravnini faktora F1 i F2



Slika 11. Projekcija uzoraka ulja u ravnini faktora F1 i F2

Tablica 8. Parametri značajnosti određeni jednosmjernom ANOVA-om na dvije skupine uzoraka ulja (čistih i mješavina) izdvojenih analizom osnovnih komponenata

Kemijski parametar	Značajnost (p)
Kampesterol	<0,0001
Kampestanol	0,1242
$\Delta$ 5-stigmasterol	<0,0001
$\beta$ -sitosterol	<0,0001
Ukupni $\Delta$ 5-steroli	<0,0001
Spinasterol	<0,0001
Stigmastatrienol	<0,0001
Stigmasta-dienol	<0,0001
$\Delta$ 7-stigmasterol	0,0688
$\Delta$ 7-avenasterol	<0,0001
Ukupni $\Delta$ 7-steroli	<0,0001
Ukupni steroli	0,4165
Skvalen	0,0002
$\alpha$ -tokoferol	<0,0001
$\gamma$ -tokoferol	0,0020
Ukupni tokoferoli	0,5033

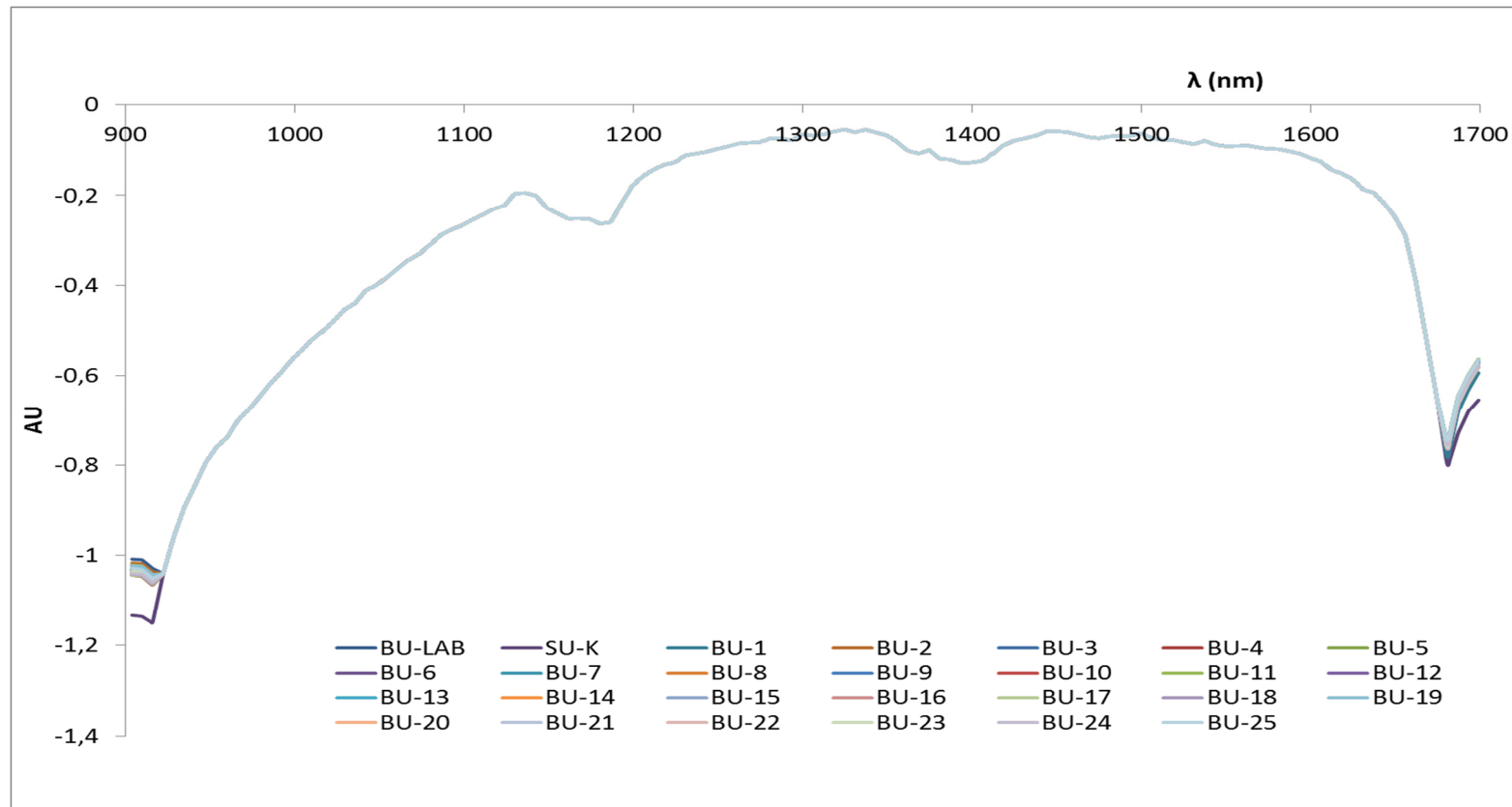


Slika 12. GC-MS kromatogrami skvalena, tokoferola i sterola u čistom bučinom ulju (BU-LAB, zeleno), rafiniranom suncokretovom ulju (SU-K, žuto) i bučinom ulju s tržišta (BU-18, crveno)

Tablica 9. Rezultati kolorimetrijskih<sup>a</sup> određivanja u uzorcima u uzorcima bučinog ulja s tržišta (BU-1 do BU-25), laboratorijskog bučinog ulja (BU-LAB) i rafiniranog suncokretovog ulja (SU-K)

Uzorak	L*	a*	b*	$\Delta E^*_{ab}$
BU-1	43,09±0,01	0,42±0,01	4,26±0,01	0,49
BU-2	43,81±0,06	-0,20±0,00	5,37±0,03	1,49
BU-3	43,00±0,00	0,11±0,01	4,14±0,01	0,16
BU-4	43,12±0,08	0,24±0,01	4,25±0,01	0,33
BU-5	42,66±0,49	0,55±0,01	4,37±0,01	0,72
BU-6	43,09±0,02	0,39±0,00	4,29±0,03	0,47
BU-7	43,07±0,01	0,10±0,01	4,20±0,01	0,18
BU-8	43,32±0,01	0,39±0,01	4,23±0,01	0,56
BU-9	43,18±0,02	0,50±0,01	4,22±0,01	0,59
BU-10	43,06±0,01	0,34±0,01	4,30±0,01	0,43
BU-11	43,33±0,01	0,46±0,01	2,28±0,01	1,96
BU-12	43,04±0,01	0,45±0,00	4,24±0,00	0,51
BU-13	43,09±0,07	0,45±0,01	4,29±0,01	0,53
BU-14	43,09±0,02	0,39±0,02	4,29±0,01	0,47
BU-15	43,06±0,01	0,31±0,00	4,28±0,01	0,39
BU-16	43,32±0,02	0,42±0,01	3,61±1,15	0,77
BU-17	43,06±0,07	0,06±0,01	4,16±0,01	0,13
BU-18	43,08±0,02	0,40±0,01	4,30±0,01	0,49
BU-19	43,22±0,03	0,47±0,01	4,26±0,01	0,58
BU-20	43,19±0,05	0,41±0,01	4,24±0,01	0,51
BU-21	42,82±0,02	0,34±0,01	4,26±0,07	0,44
BU-22	43,29±0,04	0,49±0,01	4,27±0,01	0,63
BU-23	43,06±0,05	0,27±0,01	4,22±0,04	0,34
BU-24	43,21±0,09	0,44±0,01	4,23±0,04	0,54
BU-25	43,07±0,03	0,17±0,01	4,20±0,01	0,24
Raspon (Min - Max)	42,66-43,81	-0,20-0,49	2,28-5,37	0,16-1,96
BU-LAB	42,99±0,03	-0,05±0,01	4,14±0,01	0,00
SU-K	46,53±0,03	-0,94±0,01	4,22±0,01	3,65

<sup>a</sup> Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija najmanje n=3 određivanja



Slika 13. NIR spektri uzoraka bučinog ulja s tržišta (BU-1 do BU-25), laboratorijski prešanog bučinog ulja (BU-LAB) i rafiniranog suncokretovog ulja (SU-K)

Tablica 10. Koeficijenti korelacije<sup>a</sup> između određenih kemijskih parametara te kolorimetrijskih i NIR spektroskopskih parametara

Varijable	Skvalen	$\gamma$ -toko-ferol	$\alpha$ -toko-ferol	Kampe-sterol	Kampe-sterol	$\Delta 5$ -stigma-sterol	$\beta$ -sito-sterol	Ukupni $\Delta 5$ -steroli	Spina-sterol	Stigma-statri-enol	Stigma-stadi-enol	$\Delta 7$ -stigma-sterol	$\Delta 7$ -avena-sterol	Ukupni $\Delta 7$ -steroli	Ukupni steroli
L	<b>-0,5531</b>	<b>-0,4523</b>	<b>0,6742</b>	<b>0,5452</b>	<b>-0,3899</b>	<b>0,5946</b>	<b>0,6645</b>	<b>0,6500</b>	<b>-0,5834</b>	<b>-0,6457</b>	<b>-0,5702</b>	-0,2693	<b>-0,7875</b>	<b>-0,6500</b>	0,0177
a	0,1877	0,0992	<b>-0,3873</b>	-0,1781	0,2672	-0,2484	-0,3185	-0,2972	0,2477	0,2859	0,2112	0,0234	<b>0,4956</b>	0,2972	-0,0426
b	0,2668	0,2251	-0,2102	-0,3456	0,0255	-0,2262	-0,2598	-0,2681	0,2802	0,2319	0,3010	-0,1190	0,2375	0,2681	-0,2251
$\Delta E_{ab}$	<b>-0,5681</b>	<b>-0,5022</b>	<b>0,6508</b>	<b>0,5665</b>	<b>-0,4550</b>	<b>0,6153</b>	<b>0,7039</b>	<b>0,6850</b>	<b>-0,6303</b>	<b>-0,6936</b>	<b>-0,6312</b>	-0,2860	<b>-0,7365</b>	<b>-0,6850</b>	0,0111
AU <sub>904</sub>	<b>0,5646</b>	<b>0,4789</b>	<b>-0,6994</b>	<b>-0,6609</b>	0,3191	<b>-0,5860</b>	<b>-0,6820</b>	<b>-0,6750</b>	<b>0,6041</b>	<b>0,6449</b>	<b>0,6257</b>	<b>0,4175</b>	<b>0,7910</b>	<b>0,6750</b>	-0,0596
AU <sub>905</sub>	<b>0,5655</b>	<b>0,4793</b>	<b>-0,7003</b>	<b>-0,6616</b>	0,3193	<b>-0,5872</b>	<b>-0,6830</b>	<b>-0,6760</b>	<b>0,6055</b>	<b>0,6455</b>	<b>0,6266</b>	<b>0,4157</b>	<b>0,7920</b>	<b>0,6760</b>	-0,0592
AU <sub>906</sub>	<b>0,5665</b>	<b>0,4797</b>	<b>-0,7011</b>	<b>-0,6623</b>	0,3195	<b>-0,5883</b>	<b>-0,6839</b>	<b>-0,6770</b>	<b>0,6070</b>	<b>0,6461</b>	<b>0,6274</b>	<b>0,4140</b>	<b>0,7929</b>	<b>0,6770</b>	-0,0588
AU <sub>907</sub>	<b>0,5674</b>	<b>0,4801</b>	<b>-0,7019</b>	<b>-0,6629</b>	0,3197	<b>-0,5895</b>	<b>-0,6849</b>	<b>-0,6779</b>	<b>0,6084</b>	<b>0,6467</b>	<b>0,6282</b>	<b>0,4122</b>	<b>0,7939</b>	<b>0,6779</b>	-0,0584
AU <sub>908</sub>	<b>0,5682</b>	<b>0,4805</b>	<b>-0,7026</b>	<b>-0,6636</b>	0,3199	<b>-0,5906</b>	<b>-0,6858</b>	<b>-0,6788</b>	<b>0,6098</b>	<b>0,6473</b>	<b>0,6290</b>	<b>0,4105</b>	<b>0,7948</b>	<b>0,6788</b>	-0,0580
AU <sub>909</sub>	<b>0,5691</b>	<b>0,4809</b>	<b>-0,7034</b>	<b>-0,6642</b>	0,3201	<b>-0,5917</b>	<b>-0,6867</b>	<b>-0,6797</b>	<b>0,6112</b>	<b>0,6478</b>	<b>0,6298</b>	<b>0,4087</b>	<b>0,7957</b>	<b>0,6797</b>	-0,0576
AU <sub>910</sub>	<b>0,5699</b>	<b>0,4812</b>	<b>-0,7039</b>	<b>-0,6648</b>	0,3202	<b>-0,5926</b>	<b>-0,6874</b>	<b>-0,6805</b>	<b>0,6124</b>	<b>0,6482</b>	<b>0,6305</b>	<b>0,4071</b>	<b>0,7964</b>	<b>0,6805</b>	-0,0571
AU <sub>911</sub>	<b>0,5704</b>	<b>0,4813</b>	<b>-0,7037</b>	<b>-0,6654</b>	0,3201	<b>-0,5927</b>	<b>-0,6874</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6128</b>	<b>0,6479</b>	<b>0,6308</b>	<b>0,4063</b>	<b>0,7961</b>	<b>0,6806</b>	-0,0564
AU <sub>912</sub>	<b>0,5709</b>	<b>0,4814</b>	<b>-0,7035</b>	<b>-0,6660</b>	0,3200	<b>-0,5928</b>	<b>-0,6873</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6132</b>	<b>0,6476</b>	<b>0,6311</b>	<b>0,4056</b>	<b>0,7958</b>	<b>0,6806</b>	-0,0556
AU <sub>913</sub>	<b>0,5714</b>	<b>0,4815</b>	<b>-0,7033</b>	<b>-0,6665</b>	0,3198	<b>-0,5928</b>	<b>-0,6873</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6135</b>	<b>0,6473</b>	<b>0,6313</b>	<b>0,4048</b>	<b>0,7955</b>	<b>0,6806</b>	-0,0549
AU <sub>914</sub>	<b>0,5719</b>	<b>0,4816</b>	<b>-0,7031</b>	<b>-0,6671</b>	0,3197	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6872</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6139</b>	<b>0,6469</b>	<b>0,6316</b>	<b>0,4040</b>	<b>0,7952</b>	<b>0,6806</b>	-0,0541
AU <sub>915</sub>	<b>0,5724</b>	<b>0,4817</b>	<b>-0,7028</b>	<b>-0,6676</b>	0,3195	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6871</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6143</b>	<b>0,6466</b>	<b>0,6318</b>	<b>0,4031</b>	<b>0,7948</b>	<b>0,6806</b>	-0,0533
AU <sub>916</sub>	<b>0,5728</b>	<b>0,4818</b>	<b>-0,7025</b>	<b>-0,6682</b>	0,3194	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6870</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6146</b>	<b>0,6462</b>	<b>0,6320</b>	<b>0,4023</b>	<b>0,7944</b>	<b>0,6806</b>	-0,0525
AU <sub>917</sub>	<b>0,5729</b>	<b>0,4818</b>	<b>-0,7025</b>	<b>-0,6682</b>	0,3194	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6870</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6147</b>	<b>0,6462</b>	<b>0,6321</b>	<b>0,4022</b>	<b>0,7943</b>	<b>0,6806</b>	-0,0524
AU <sub>918</sub>	<b>0,5729</b>	<b>0,4818</b>	<b>-0,7025</b>	<b>-0,6682</b>	0,3194	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6870</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6147</b>	<b>0,6462</b>	<b>0,6321</b>	<b>0,4022</b>	<b>0,7943</b>	<b>0,6806</b>	-0,0524
AU <sub>919</sub>	<b>0,5729</b>	<b>0,4818</b>	<b>-0,7025</b>	<b>-0,6682</b>	0,3194	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6870</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6147</b>	<b>0,6462</b>	<b>0,6321</b>	<b>0,4022</b>	<b>0,7943</b>	<b>0,6806</b>	-0,0524
AU <sub>920</sub>	<b>0,5729</b>	<b>0,4818</b>	<b>-0,7025</b>	<b>-0,6682</b>	0,3194	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6870</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6147</b>	<b>0,6461</b>	<b>0,6321</b>	<b>0,4022</b>	<b>0,7943</b>	<b>0,6806</b>	-0,0524
AU <sub>921</sub>	<b>0,5729</b>	<b>0,4818</b>	<b>-0,7025</b>	<b>-0,6682</b>	0,3194	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6870</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6147</b>	<b>0,6461</b>	<b>0,6320</b>	<b>0,4022</b>	<b>0,7943</b>	<b>0,6806</b>	-0,0524
AU <sub>922</sub>	<b>0,5729</b>	<b>0,4818</b>	<b>-0,7025</b>	<b>-0,6682</b>	0,3194	<b>-0,5929</b>	<b>-0,6870</b>	<b>-0,6806</b>	<b>0,6147</b>	<b>0,6462</b>	<b>0,6321</b>	<b>0,4022</b>	<b>0,7943</b>	<b>0,6806</b>	-0,0524

<sup>a</sup>Masnim slovima otisnuti koeficijenti korelacije statistički su značajni na razini 95% značajnost

Tablica 11. Rezultati modela veze između kolorimetrijskih parametara i zavisnih varijabli

Zavisna varijabla	Indeks prema jednadžbama 6-8	Koeficijent determinacije ( $R^2$ )	Veza <sup>a</sup> između nezavisne varijable (kolorimetrijske veličine L i $\Delta E_{ab}$ ) i zavisne varijable*
Skvalen	i = 1	0,929	čvrsta
$\gamma$ -tokoferol	i = 2	0,908	čvrsta
$\alpha$ -tokoferol	i = 3	0,859	čvrsta
Kampesterol	i = 4	0,885	čvrsta
$\Delta 5$ -stigmasterol	i = 5	0,823	čvrsta
$\beta$ -sitosterol	i = 6	0,824	čvrsta
Spinasterol	i = 7	0,946	čvrsta
Stigmastatrienol	i = 8	0,969	čvrsta
Stigmastadienol	i = 9	0,991	čvrsta
$\Delta 7$ -stigmasterol	i = 10	0,882	čvrsta
$\Delta 7$ -avenasterol	i = 11	0,855	čvrsta

<sup>a</sup> Prema Chadockovoj ljestvici (Cukor, 2006)

Tablica 12. Rezultati modela veze između NIR spektra i zavisnih varijabli

Zavisna varijabla	Indeks prema jednadžbama 9-11	Koeficijent determinacije ( $R^2$ )	Veza <sup>a</sup> između nezavisne varijable (NIR spektar, $\lambda=904 -$ $922$ nm) i zavisne varijable
Skvalen	i = 1	0,804	čvrsta
$\gamma$ -tokoferol	i = 2	0,695	čvrsta
$\alpha$ -tokoferol	i = 3	0,843	čvrsta
Kampesterol	i = 4	0,845	čvrsta
$\Delta 5$ -stigmasterol	i = 5	0,808	čvrsta
$\beta$ -sitosterol	i = 6	0,868	čvrsta
Spinasterol	i = 7	0,858	čvrsta
Stigmastatrienol	i = 8	0,829	čvrsta
Stigmastadienol	i = 9	0,867	čvrsta
$\Delta 7$ -stigmasterol	i = 10	0,822	čvrsta
$\Delta 7$ -avenasterol	i = 11	0,885	čvrsta

<sup>a</sup> Prema Chadockovoj ljestvici (Cukor, 2006)



## **5. RASPRAVA**

Autentičnost proizvoda bitno je pitanje za prehrambenu industriju zbog pravnih i ekonomskih razloga, a garancija je konstantne i jasno definirane kvalitete, sigurne upotrebe te primjene vjerskih standarda (*halal*, *košer*). Procjena kvalitete sirovine i gotovih proizvoda temeljni je parametar za visoke standarde i održavanje istih. Postoje različiti aspekti koji određuju ukupnu kvalitetu hrane, kao što su sigurnost odnosno odsutnost mikrobioloških zagađenja i toksikanata, kvaliteta u smislu senzorskih svojstava, stabilnosti i nutritivne vrijednosti proizvoda, te autentičnost samog proizvoda. Autentični proizvod je onaj koji je strogo u skladu s oznakom koju je dao proizvođač u pogledu sastojaka, prirodnih komponenata, izostanka štetnih tvari, tehnologije proizvodnje, geografskog i botaničkog porijekla, godine proizvodnje i dr. Problem kako jamčiti i osigurati autentičnost hrane, pa tako i ulja može se riješiti primjenom točne specifikacije za sirovine i odabirom dobavljača s jasno utemeljenim sustavom osiguranja kvalitete. Patvorenje se najčešće provodi iz ekonomskih razloga odnosno da se poveća količina ili vrijednost proizvoda slabije kvalitete te da se smanji udio skupljih sastojaka (Dennis i Ashurst, 2013).

Iako do sada nije napravljeno sustavno istraživanje autentičnosti bučinog ulja na tržištu Republike Hrvatske i nema vjerodostojnih podataka, iz kontakata s proizvođačima bučinog ulja i raspravama u elektroničkim medijima može se zaključiti kako jedan dio proizvođača još uvijek koristi tradicionalni način proizvodnje bučinog ulja pri kojem se tijesto bučnih koštica prži uz dodatak rafiniranog, najčešće suncokretovog ulja. Korak dalje idu proizvođači koji miješaju pogaču bučnih koštica zaostalu nakon prešanja s rafiniranim uljem, a smjesu ponovo prže i prešaju. Takav postupak, bez navođenja količine dodanog rafiniranog ulja na oznaci proizvoda protuzakonit je jer Pravilnik o jestivim uljima i mastima NN 41/12 (Pravilnik, 2012) jasno definira da se bučnim uljem može zvati jedino ulje bučnih koštica, dok se mješavine ulja stavljaju na tržište pod nazivom koji uključuje sva sadržana ulja.

Navedenim Pravilnikom (2012) također su definirani i različiti parametri koje pojedina ulja moraju zadovoljavati prije stavljanja na tržište i koji mogu ukazivati na mogućnost patvorenja ulja, ali se postavlja pitanje postoje li dovoljne mjere kontrole bučinog ulja na tržištu.

Stoga je u sklopu istraživanja u ovom radu iz slobodne prodaje prikupljeno 25 uzoraka ulja označenog kao „bučino ulje“ i „nerafinirano bučino ulje“ bez navoda o dodatku drugog ulja te je provedena usporedba svojstava s laboratorijski proizvedenim bučnim uljem. Za daljnju usporedbu također je analizirano i rafinirano suncokretovo ulje s tržišta.

## 5.1. GC-MS ANALIZA STEROLA, TOKOFEROLA I SKVALENA

Od velikog broja fizikalnih i kemijskih metoda utvrđivanja patvorenja kao vrlo učinkovita pokazala se metoda određivanja sterola. Pri tome je obavezno provesti analizu profila sterola u ulju jer samo ukupna količina sterola u ulju teško može potvrditi je li u analizirano ulje dodano neko drugo. Nadalje, granice za udjel sterola u bučinom ulju propisane su Pravilnikom (2012), ali ta analiza nažalost nije uključena u rutinsku tržišnu kontrolu bučinog ulja.

Rezultati određivanja ukupnih sterola metodom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (Tablica 6) pokazuju da je udjel ukupnih sterola u laboratorijski proizvedenom bučinom ulju ( $2284,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) u granicama Pravilnika (2012) koje iznose od 2100-5000  $\text{mg kg}^{-1}$ . Udjel ukupnih sterola u bučnim uljima s tržišta u čak njih 15 nije u zakonskim granicama, već pokazuje vrijednosti manje od 2100  $\text{mg kg}^{-1}$ . Razlog ovom odstupanju može biti u različitom kultivaru i godini uzgoja (Giuffrè i Louadj, 2013) te se ovaj podatak ne može se smatrati pouzdanim pokazateljem patvorenja. Nadalje, autori Murkovic i sur. (2004) navode da je udjel ukupnih sterola u analiziranim bučnim uljima bio 1930  $\text{mg kg}^{-1}$  što je vrlo blizu prosječnoj vrijednosti dobivenoj ovim istraživanjem.

Breinhölder i sur. (2002) navode da se bučino ulje po udjelu  $\Delta 7$ -sterola znatno razlikuje od većine poznatih biljnih ulja koja sadrže većinom  $\Delta 5$ -sterole.  $\Delta 5$ -steroli karakteristični su i u visokom udjelu prisutni u većini najzastupljenijih rafiniranih ulja (suncokretovo, repičino i sojino). Stoga analiza upravo tih komponenti daje podatke koji su relevantni za dokazivanje patvorenja.

Pojedinačni steroli određeni GC-MS-om u analiziranim uzorcima bučinog ulja s tržišta, laboratorijskog bučinog ulja te rafiniranog suncokretovog ulja podijeljeni su na  $\Delta 5$ - i  $\Delta 7$ -sterole te prikazani u tablicama 4 i 5. Iz rezultata za udjel  $\Delta 5$ -sterola (Tablica 4) vidljivo je da suncokretovo ulje sadrži 92,15%  $\Delta 5$ -sterola, dok bučino ulje proizvedeno u laboratoriju sadrži 12,78% što je u skladu su s literaturnim podacima (Neđeral Nakić i sur, 2006; Hrabovski i sur., 2012), odnosno potvrđuje razlike u sastavu između ova dva ulja.

Dominantan  $\Delta 5$ -sterol u uzorku rafiniranog suncokretovog ulja je  $\beta$ -sitosterol s udjelom od 70,10% dok ga u laboratorijski proizvedenom bučinom ulju ima 7,19%. U oba ulja od ostalih  $\Delta 5$ -sterola slijede kampesterol,  $\Delta 5$ -stigmasterol i kampestanol. Granice utvrđene Pravilnikom (2012) za suncokretovo ulja navode udjel  $\beta$ -sitosterola 50-70%, a za bučino ulje 1-5% odnosno

prema ovom parametru oba ulja odstupaju od propisa. Kampesterola kojeg bučino ulje po Pravilniku (2012) može sadržavati do 5% u 8 uzoraka bučinog ulja s tržišta ima u većim udjelima, dok se laboratorijsko bučino ulje i suncokretovo ulje u udjelima kampesterola slažu s Pravilnikom (2012).

Odstupanje laboratorijski proizvedenog ulja od propisanih granica navodi na zaključak kako su one sastavljene na osnovu starijih kultivara bučinih koštica te da bi u budućnosti bilo dobro korigirati te granice na osnovu ovog i sličnih istraživanja (Neđeral Nakić i sur., 2006; Dulf i sur., 2009) u kojima se za udjel  $\beta$ -sitosterola navode vrijednosti 5,6-8,5%.

Granice utvrđene Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (Pravilnik, 2012) za suncokretovo ulje također se ne podudaraju s podacima o udjelima kampesterola, kampestanola i  $\Delta 5$ -stigmasterola u suncokretovom ulju dobivenim u radu Schwartz i sur. (2008) prema kojima su ti udjeli i dvostruko veći od propisanih.

Udjel ukupnih  $\Delta 5$ -sterola u 25 bučinih ulja s tržišta kreće se od 4,86-44,74%, a najveći zabilježeni udjel  $\beta$ -sitosterola prisutan je u uzorku BU-12 i iznosi 32,16% što je čak 6 puta više od granice utvrđene Pravilnikom (2012). Velika odstupanja u udjelu  $\Delta 5$ -sterola u pojedinim uzorcima bučinih ulja s tržišta ukazuju na dodatak suncokretovog ulja.

Zabilježeni udjeli dominantnih  $\Delta 7$ -sterola tj. stigmastadienola, stigmastatrienola i spinasterola (Tablica 5) u uzorku laboratorijskog bučinog ulja u skladu je s literaturnim podacima (Neđeral Nakić i sur., 2006; Dulf i sur., 2009), ali također kao i u slučaju  $\beta$ -sitosterola priličan broj uzoraka bučinih ulja s tržišta ne zadovoljava pojedine granice Pravilnika (2012). Udjel spinasterola niži je od donje granice određene Pravilnikom (2012) u svim uzorcima, udjel stigmastatrienola bio je u granicama u laboratorijskom bučinom ulju i još 13 uzoraka s tržišta, dok se u udjelu stigmastadienola svi uzorci slažu sa Pravilnikom (2012).

Udjel ukupnih  $\Delta 7$ -sterola u uzorcima bučinog ulja s tržišta kreće se u širokom rasponu od 55,26 do 95,14% te također ukazuje na dodatak suncokretovog ulja koje sadrži  $\Delta 7$ -sterole u niskom udjelu (Breinhölder i sur., 2002) te posljedično smanjuje udio  $\Delta 7$ -sterola.

Autori Dulf i sur. (2009) u svojem istraživanju promjena udjela sterola prilikom patvorenja bučinog ulja suncokretovim došli su do sličnih zaključaka odnosno navode da kada se u hladno prešano bučino ulje doda 30% hladno prešanog suncokretovog ulja povećava se udjel  $\Delta 5$ -stigmasterola i  $\beta$ -sitosterola. Udjel ukupnih sterola bučinog ulja patvorenog sa suncokretovim uljem nije se puno razlikovao od onog čistog bučinog ulja.

U istraživanju Mandl i sur. (1999) navodi se da i prisutnost brasikasterola (u slučaju dodatka repičinog ulja) ili  $\Delta 5$ -stigmasterola (u slučaju dodatka suncokretovog ulja) mogu ukazati na patvorenje bučinog ulja i to već pri dodatku 2% drugog ulja. U analiziranim uljima nije zabilježen brasikasterol niti u jednom uzorku bučinih ulja s tržišta što znači da nisu bili patvoreni dodatkom repičinog nego isključivo suncokretovog ulja.

Pored udjela i sastava sterola GC-MS metodom u analiziranim uzorcima ulja određen je i udjel skvalena i tokoferola.

Dessi i sur. (2002) u svom istraživanju navode da skvalen štiti masne kiseline od oksidacije tako što djeluje kao «hvatač» slobodnih radikala. Navodi se i inhibirajuća uloga skvalena u nastanku mnogih oblika tumora i raka, npr. raka crijeva, pluća i kože. Kod biljnih ulja najviše podataka o udjelu i važnosti skvalena navodi se za maslinovo ulje. Udjel skvalena u maslinovom ulju prema Giacometti i sur. (2001) iznosi 1360-7080 mg kg<sup>-1</sup> i najviši je u usporedbi s drugim uljima. Rezultati istraživanja udjela skvalena u bučinom ulju autora Neđeral Nakić i sur. (2006) pokazuju da bučino ulje sadrži 2259 mg kg<sup>-1</sup> skvalena što ga čini bogatim izvorom ovog bioaktivnog spoja. S druge strane suncokretovo ulje sadrži niske udjele skvalena odnosno oko 50 mg kg<sup>-1</sup> (Chiou i sur., 2009) pa se može pretpostaviti da bi i udjel skvalena mogao poslužiti kao kriterij za određivanje patvorenja bučinog ulja suncokretovim. Iz rezultata u tablici 6 vidljiva je vrlo velika razlika u udjelu skvalena između laboratorijski proizvedenog bučinog ulja (1923,5 mg kg<sup>-1</sup>) i rafiniranog suncokretovog ulja (73,8 mg kg<sup>-1</sup>). Raspon udjela skvalena u uzorcima bučinog ulja s tržišta vrlo je širok i iznosi 766,8-2058,6 mg kg<sup>-1</sup> pri čemu dva uzorka (BU-16 i BU-25) imaju više od 1000 mg kg<sup>-1</sup> manje skvalena nego što ga se nalazi u laboratorijski dobivenom bučinom ulju.

Tokoferoli su posebno značajne funkcionalne komponente ulja. Posjeduju vitaminska (vitamin E) i antioksidacijska svojstva. Kao antioksidansi štite ulja od oksidacijskog kvarenja, a štite i tkiva u organizmu od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima koji nastaju u mnogim uobičajenim metaboličkim funkcijama (López Ortíz, 2004).

Prema Schwartzu i sur. (2008) suncokretovo ulje je jedno od najboljih izvora  $\alpha$ -tokoferola (590 mg kg<sup>-1</sup>), a prilično visok udjel zabilježen je i u ovom istraživanju s vrijednošću za  $\alpha$ -tokoferola od 246,6 mg kg<sup>-1</sup> (Tablica 6). Iz vrijednosti za  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferol u laboratorijskom bučinom ulju vidljivo je da ono sadrži znatno manje  $\alpha$ -tokoferola odnosno svega 63,9 mg kg<sup>-1</sup>, ali zato sadrži 228,5 mg kg<sup>-1</sup>  $\gamma$ -tokoferola kojeg u suncokretovom ulju ima tek 18,2 mg kg<sup>-1</sup>. Od bučinih ulja s tržišta čak 6 uzoraka ima udio  $\alpha$ -tokoferola viši od 90 mg kg<sup>-1</sup>, granice koja je

prema rezultatima istraživanja brojnih autora (Kamm i sur., 2001; Stevenson i sur., 2007; Nederal Nakić i sur., 2006) gornja granica za udio  $\alpha$ -tokoferola u bučinom ulju. Maksimalna vrijednost za  $\alpha$ -tokoferol zabilježena je u uzorku BU-6 koje ga sadrži 154 mg kg<sup>-1</sup>. Udjel  $\gamma$ -tokoferola u uzorcima bučinog ulja s tržišta kreće se od 86,1-276,0 mg kg<sup>-1</sup> što je unutar granica koje se navode u literaturi (Kamm i sur., 2001; Stevenson i sur., 2007).

Za bolje razumijevanje povezanosti među pojedinim kemijskim parametrima određenim plinskom kromatografijom napravljena je statistička analiza korelacije. Tablica 7 prikazuje koeficijente korelacije između različitih ispitivanih kemijskih parametara, odnosno daje poveznicu između dva skupa podataka. Na taj način može se interpretirati manja ili veća povezanost između različitih bioaktivnih spojeva. Iz tablice 7 vidi se da su pojedinačni  $\Delta$ 7-steroli u jakoj negativnoj korelaciji s  $\Delta$ 5-sterolima te u jakoj i srednjoj pozitivnoj korelaciji s drugim  $\Delta$ 7-sterolima pri čemu su primjerice koeficijenti korelacije za spinasterol s kampesterolom,  $\Delta$ 5-stigmasterolom,  $\beta$ -sitosterolom te stigmastatrienol, stigmastadienol,  $\Delta$ 7-stigmasterol i avenasterol redom  $r = -0,930$ ;  $r = -0,966$ ;  $r = -0,977$ ;  $r = 0,948$ ;  $r = 0,944$ ;  $r = 0,489$  i  $r = 0,893$ . Navedeni koeficijenti korelacije ukazuju da što je više  $\Delta$ 7-sterola ima manje  $\Delta$ 5-sterola i obrnuto što je potvrđuje zapažanja o udjelu tih spojeva u analiziranim uzorcima. Skvalen pokazuje pozitivnu korelaciju s  $\gamma$ -tokoferolom i ukupnim  $\Delta$ 7-sterolima ( $r = 0,774$  i  $r = 0,845$ , a negativnu s  $\alpha$ -tokoferolom i ukupnim  $\Delta$ 5-sterolima ( $r = -0,750$  i  $r = -0,845$ ). Negativnu korelaciju međusobno pokazuju  $\alpha$ -tokoferol i  $\gamma$ -tokoferol ( $r = -0,561$ ) odnosno što je više jednog izomera tokoferola, manje je drugog i obrnuto.

## 5.2. ANALIZA OSNOVNIH KOMPONENTI I ANALIZA VARIJANCE

Za potrebe ovog rada također je provedena i analiza osnovnih komponenti (PCA) na rezultatima udjela sterola, skvalena i tokoferola (varijable) u bučnim uljima s tržišta, laboratorijskom bučinom ulju i rafiniranom suncokretovom ulju (slučajevi). PCA je vrlo široko korišten postupak za analizu podataka. Omogućuje jednostavnu, ne parametarsku metodu izlučivanja bitne informacije i značajki iz skupova podataka korištenjem rješenja iz linearne algebre. Matematički gledano, postupak analize glavnih komponenti traži novi koordinatni sustav s manje koordinatnih osi kako bi predstavio podatke uz što manji gubitak informacija. Drugim riječima, omogućuje učinkovitu redukciju dimenzionalnosti podataka (Vigni i sur., 2013).

U sklopu PCA analize provedene u ovom radu ukupno je bilo 15 varijabli i 27 slučajeva (uzorci). Cilj je bio utvrditi mogu li se uzorci, prema dobivenim vrijednostima udjela sterola, skvalena i tokoferola, razlikovati s obzirom na autentičnost (dodatak suncokretovog ulja).

Rezultati su prikazani kao projekcije varijabli (Slika 10) i uzoraka (Slika 11) u prostoru osnovnih komponenti faktora F1 i F2. Sažetak ukupnih varijacija uključenih analitičkih parametara predstavljen je u prva dva faktora PCA analize koji zajedno objašnjavaju 83,53% varijance rezultata.

Koordinate pojedinih varijabli u koordinatnom sustavu dva faktora (Slika 10) prikazuju korelaciju određenog kemijskog parametra sa svakim faktorom zasebno. Prva osnovna komponenta (F1) objašnjava 74,42% varijance, te pokazuje pozitivnu korelaciju sa  $\alpha$ -tokoferolom,  $\Delta 5$ -stigmasterolom, kampesterolom,  $\beta$ -sitosterolom i ukupnim  $\Delta 5$ -sterolima, a negativnu korelaciju sa skvalenom,  $\gamma$ -tokoferolom, spinasterolom, stigmastatrienolom, stigmastadienolom,  $\Delta 7$ -stigmasterolom,  $\Delta 7$ -avenasterolom i ukupnim  $\Delta 7$ -sterolima. Druga osnovna komponenta (F2) objašnjava 9,11% varijance, te pokazuje pozitivnu korelaciju sa kampestanolom i udjelom ukupnih sterola.

Razmatranjem raspodjele uzoraka u faktorskoj ravnini F1 i F2 vidljivo je da je došlo do vrlo jasnog razdvajanja uzoraka laboratorijski proizvedenog bučinog ulja (BU-LAB) i rafiniranog suncokretovog ulja (SU-K) uzduž prvog faktora (F1). Uzrok tome je što suncokretovo ulje sadrži visok udjel spojeva koji pozitivno koreliraju s F1, a čisto bučino ulje visok udjel spojeva koji s istim faktorom negativno koreliraju. Usporedbom pozicije varijabli i uzoraka vidljivo je da su skvalen,  $\gamma$ -tokoferol i ukupni  $\Delta 7$ -steroli karakteristični za bučino, a  $\Delta 5$ -steroli i  $\alpha$ -tokoferol za suncokretovo ulje.

Analiza položaja uzoraka bućinih ulja s tržišta u koordinatnom prostoru dva faktora (Slika 11) otkriva dvije skupine uzoraka od kojih je jedna smještena s lijeve strane koordinatnog sustava zajedno sa laboratorijski proizvedenim bućinim uljem, a druga s desne strane koordinatnog sustava odnosno na strani na kojoj se nalazi i uzorak rafiniranog suncokretovog ulja. Budući se dodatkom suncokretovog ulja u bučino smanjuje udjel skvalena,  $\gamma$ -tokoferola i ukupnih  $\Delta 7$ -steroli, a povećava udjel  $\Delta 5$ -sterola i  $\alpha$ -tokoferol ova raspodjela jasan je dokaz da su bućina ulja s desne strane koordinatnog sustava mješavine čistog bućinog ulja. Dodano suncokretovo ulje koje je svojim kemijskim svojstvima uzrokovalo pomak uzoraka prema pozitivnim vrijednostima faktora F1. Dakle, od ukupno 25 analiziranih uzoraka možemo utvrditi da se u njih 11 radi o mješavinama bućinog i suncokretovog ulja odnosno da je toliki

broj uzoraka uključenih u ovo istraživanje bio patvoren. Prema rezultatima ove analize grubo se može procijeniti kako je u patvorenim uzorcima bučinog ulja bilo dodano oko 30-40% ulja suncokreta.

Da bi se dodatno potvrdili rezultati PCA analize bučina ulja s tržišta podijeljena su u dvije skupine (čista i mješavine) te je na njima provedena jednosmjerna ANOVA da se utvrdi jesu li udjeli skvalena, tokoferola i sterola u ovim skupinama uistinu statistički značajno različiti. Iz podataka za faktore značajnosti ( $p$ ) navedenih u tablici 8 vidljivo je da se PCA-om izdvojena čista i patvorena bučina ulja razlikuju na razini pouzdanosti 99,99% ( $p \leq 0,0001$ ) za kampesterol,  $\Delta 5$ -stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, ukupne  $\Delta 5$ -sterole, spinasterol, stigmastatrienol, stigmastadienol,  $\Delta 7$ -avenasterol i ukupne  $\Delta 7$ -sterole. Statistički značajna razlika na razini pouzdanosti 99,90% ( $p \leq 0,001$ ) postoji za skvalen, a na razini pouzdanost 99,00% ( $p \leq 0,01$ ) za  $\alpha$ -tokoferol.

Statistička analiza potvrdila je jasne razlike među uzorcima koje su također vidljive i na slici 12 koja prikazuje usporedne GC-MS kromatograme skvalena, tokoferola i sterola u laboratorijski proizvedenom čistom bučinom ulju, rafiniranom suncokretovom ulju i uzorku BU-18 kao primjeru bučinog ulja s tržišta koje je prema rezultatima PCA analize smješten u skupinu mješavina tj. patvorenih ulja. Dodatak suncokretovog ulja u BU-18 doveo je do povećanja površine ispod pikova  $\alpha$ -tokoferola i  $\Delta 5$ -sterola, a smanjenja površine pikova skvalena,  $\gamma$ -tokoferol i  $\Delta 7$ -sterola.

Sveukupno razmatrajući rezultate određivanja udjela bioaktivnih spojeva u sklopu provedenog istraživanja vidljivo je da 44% uzoraka bučinog ulja s tržišta pokazuje prisustvo suncokretovog ulja u svom sastavu odnosno da pojedini proizvođači bučinih ulja u Hrvatskoj znaju stavljati znatne količine drugih biljnih ulja u bučino ulje, prikazujući ga i dalje potrošaču kao ljekovito i zdravo, iako su se njegovi funkcionalni sastojci dodatkom drugog ulja znatno promijenili tj. smanjili.

### **5.3. KOLORIMETRIJSKA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA U BLISKOM INFRACRVENOM PODRUČJU**

Kao što je navedeno te potom i potvrđeno rezultatima ovog istraživanja određivanje udjela bioaktivnih spojeva, posebice sterola vrlo je pouzdan način dokazivanja patvorenja bučinog ulja. Međutim obzirom da je metoda primijenjena u ovom radu (HR EN ISO 12228,



2004) vrlo komplicirana, zahtjevna i dugotrajna u nastavku istraživanja pokušalo se pronaći metodu koja bi imala dobru korelaciju s određivanjem kemijskih parametara, a istovremeno značila uštedu vremena, kemikalija i skupe laboratorijske opreme. Stoga su odabrane kolorimetrijska i NIR spektroskopska metoda, prva radi značajne razlike u boji suncokretovog i bučinog ulja, a druga zbog već istraživane primjene u detekciji patvorenja različitih ulja (Kamm i sur., 2001)

Koncentracije i sastavi prirodnih pigmenata u mastima važan su parametar kvalitete jer utječu na boju kao jedan od osnovnih atributa na osnovu kojih potrošač ocjenjuje kvalitetu proizvoda (npr. zeleno maslinovo ulje, crveno palmino ulje, žuto-jantarno ulje iz sjemena pamuka).

Tijekom ovog istraživanja provedeno je kolorimetrijsko mjerenje boje, a rezultati analize tj. dobivenih vrijednosti za svjetlinu ( $L^*$ ), crveno-zeleno ( $a^*$ ) i žuto-plavo ( $b^*$ ) te ukupnu razliku boje ( $\Delta E^{*ab}$ ) prema standardu (HRN EN ISO 11664-4, 2012) postavljenom 1976. od francuske Međunarodne komisije za rasvjetu (franc. Commission Internationale de l'Eclairage - CIE) prikazani su u tablici 9.

Svjetlina ili  $L^*$  vrijednost predstavlja skalu 0-100 koja se kreće od crnog prema bijelom području i za laboratorijski proizvedeno bučino ulje iznosi 42,99, a za rafinirano suncokretovo ulje 46,53 čime se potvrđuje jasno vidljiva razlika u svjetlini bučinog i suncokretovog ulja.  $L^*$  vrijednosti u uzorcima bučinih ulja s tržišta nalaze se u rasponu od 42,66 – 43,81.  $a^*$  vrijednost čije negativne vrijednosti odgovaraju zelenoj, a pozitivne vrijednosti crvenoj boji za laboratorijski proizvedeno bučino ulje iznosila je -0,05 dok je za suncokretovo bila znatno viša i iznosila 0,94. Razlog vrijednosti  $a^*$  za bučino ulje blizu 0 može biti u dikromatskom karakteru ovog ulja koje ovisno o debljini sloja u kojem se nalazi može biti crveno ili zeleno (Kreft i Kreft, 2007).  $a^*$  vrijednosti u uzorcima bučinog ulja s tržišta iznosile su -0,20 do 0,49.  $b^*$  vrijednost predstavlja skalu koja se kreće od plavog (negativne vrijednosti) do žutog (pozitivne vrijednosti) i u ovom istraživanju iznosi 4,14 za laboratorijsko bučino ulje i 4,22 za rafinirano suncokretovo ulje. Vrijednosti dobivene za ostale uzorke kreću se u rasponu 2,28-5,37.

Andjelkovic i sur. (2010) istraživali su udjel fenolnih spojeva u 6 uzoraka bučinog ulja te njegovu korelaciju s određenim parametrima kvalitete među kojima i bojom.  $L^*$  vrijednost uzoraka bučinog ulja kretala se u rasponu 43,09-49,53 i nije se statistički znatno razlikovala dok su se vrijednosti  $a^*$  (-0,15 - 3,44) i  $b^*$  (-0,32 - 8,47) značajno razlikovale. Dodatno je pokazano da ukupan sastav fenola korelira negativno sa  $L^*$ ,  $b^*$  i izračunatoj zasićenosti, a

pozitivno s  $a^*$  i izračunatom nijansom. Rezultati istraživanja Andjelkovic i sur. (2010) osim ekstremno visokih vrijednosti za  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  u jednom uzorku uglavnom se poklapaju s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

$\Delta E^*_{ab}$  je vrijednost koja predstavlja ukupnu razliku boje i računa se na osnovu izmjerenih  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti. Ako je veća od 0,2 znači da se razlika u boji između dva objekta može primijetiti ljudskim okom. Za usporedbu i proračun ukupne razlike u boji kao ulje standardne boje uzeto je laboratorijski proizvedeno bučino ulje.  $\Delta E^*_{ab}$  očekivano je najveća u uzorku SU-K i iznosi 3,65. Vrijednosti  $\Delta E^*_{ab}$  dobivene za uzorke bučinih ulja s tržišta kretale su se u rasponu 0,16 - 1,96, ali su u velikoj većini uzoraka bile  $<1$  što znači da su razlike u boji ljudskom oku tek vrlo slabo primjetne.

Na rezultatima kolorimetrijskih mjerenja i kromatografski određenih kemijskih parametara napravljena je statistička analiza korelacije kako bi se utvrdilo postoji li međusobna povezanost  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  i  $\Delta E^*_{ab}$  s udjelima sterola, skvalena i tokoferola (Tablica 10). Primjećene razlike u vrijednostima  $L^*$ ,  $a^*$  i  $\Delta E^*_{ab}$  u uzorcima bučinog i suncokretovog ulja čine ove parametre potencijalnim alatima za detekciju patvorenja bučinog ulja. Koeficijenti korelacije za  $L^*$  i  $\Delta E^*_{ab}$  pokazuju pozitivnu statistički značajnu korelaciju na razini 95% značajnosti s  $\alpha$ -tokoferolom, kampesterolom,  $\Delta 5$ - stigmasterolom,  $\beta$ - sitosterolom i ukupnim  $\Delta 5$ -sterolima odnosno spojevima karakterističnim za suncokretovo ulje te negativnu statistički značajnu korelaciju s skvalenom,  $\gamma$ - tokoferolom, kampestanolom, stigmastatrienolom, stigmastadienolom,  $\Delta 7$ - stigmasterolom, avenasterolom, ukupnim  $\Delta 7$ - sterolima.  $a^*$  je pokazao negativnu statistički značajnu korelaciju jedino s udjelom  $\alpha$ - tokoferola.

Koeficijenti korelacije za  $b^*$  i kemijske parametre nisu pokazali značajnu povezanost te je time potvrđeno da vrlo mala razlika u vrijednosti  $b^*$  između bučinog i suncokretovog ulja čini ovaj parametar neadekvatnim alatom za detekciju patvorenja bučinog ulja suncokretovim.

U proteklih 30 godina NIR metoda se dokazala kao najefikasnija i napredna metoda za kontinuirano praćenje, kontrolu procesa i kvalitete proizvoda te kontrolu same procesne linije (Huang i sur., 2008). Glavna prednosti NIR-a je u tome što obično nije potrebna priprema uzorka, stoga je analiza vrlo jednostavna i vrlo brza (15 i 90 sekundi) te se može provesti on-line.

NIR spektroskopija rutinski se koristi za analizu sastava te funkcionalnu i sezonsku analizu sastojaka hrane, procesnih međuprodukata i gotovih proizvoda (Hernández Gómez i

sur., 2006). Ova metoda ima veliku ulogu u kontroli osnovnog kemijskog sastava hrane, a pomoću nje može se odrediti koncentracija svih hranjivih tvari. Posebno značenje ima u tehnologiji kada je potreban brz rezultat analize (Liu i sur., 2010).

Rezultati NIR spektroskopske analize u uzorcima bučinih i suncokretovog ulja prikazani su na slici 13. Iz prikazanih spektara snimanih na valnim duljinama 904 - 1699 nm vidljivo je da su većinom vrlo slični. Razlike između uzoraka vidljive su na valnim duljinama 904 - 930 nm (N-H drugi „overtone“, O-H drugi „overtone“ i C-H treći „overtone“) te 1670-1699 nm (C-H prvi „overtone“). Usporedbom spektara laboratorijski proizvedenog bučinog i rafiniranog suncokretovog ulja vidljivo je da su apsorbancije u navedenim valnim duljinama niže u suncokretovom nego u bučinom ulju. Postojanje te razlike čini NIR potencijalnim alatom za detekciju bučinog ulja.

Statističkom obradom izračunati su koeficijenti korelacije između navedenih varijabli kako bi se utvrdilo je li veza NIR apsorbancija na valnim duljinama za koje su zamijećene razlike među uljima i kromatografski određeni udjela sterola, skvalena i tokoferola statistički signifikantna. Rezultati su pokazali da veza ne postoji niti za jednu valnu duljinu u rasponu 923-930 i 1670 - 1699 nm (rezultati nisu prikazani). S druge strane vidljivo je (Tablica 10) da između apsorbancija pri valnim duljinama 904 - 922 nm postoji statistički značajna pozitivna korelacija na razini 95% značajnosti sa skvalenom,  $\gamma$ - tokoferolom, kampestanolom, stigmastatrienolom, stigmastadienolom,  $\Delta$ 7- stigmasterolom, avenasterolom, ukupnim  $\Delta$ 7-sterolima (od  $r = 0,402$  za absorpciju pri 922 nm i  $\Delta$ 7-stigmasterol do  $r = 0,796$  za absorpciju pri 910 nm i  $\Delta$ 7-avenasterol) odnosno spojevima karakterističnim za bučino ulje. S druge strane zamijećena je statistički značajna negativna korelacija s  $\alpha$ -tokoferolom, kampesterolom,  $\Delta$ 5-stigmasterolom,  $\beta$ - sitosterolom i ukupnim  $\Delta$ 5-sterolima (od  $r = -0,704$  za absorpciju pri 910 nm i  $\alpha$ -tokoferol do  $r = -0,593$  za absorpciju pri 922 nm i  $\Delta$ 5-stigmasterol).

Na osnovu vrijednosti parametara dobivenih kolorimetrijom i NIR također su napravljeni matematički modeli veze pri čemu su korišteni samo parametri koji su pokazali značajnu korelaciju s kemijskim parametrima odnosno  $L^*$  i  $\Delta E^{*ab}$  te absorpcije na valnim duljinama  $\lambda = 904 - 922$  (Tablice 11 i 12).

Linearni regresijski odnosno predikcijski modeli dobiveni metodom najmanjih kvadrata pokazuju povezanost analiziranih parametara. Iz tablice 11 vidljivo je da vrlo jednostavni modeli bez slobodnog člana izvedeni na bazi kolorimetrijskih veličina imaju vrlo visoke koeficijente determinacije za sve analizirane zavisne varijable pri čemu je najveći  $R^2 = 0,946$

za spinasterol, a najmanji  $R^2 = 0,823$  za  $\Delta 5$ -stigmasterol što znači čvrstu vezu prema Chadockovoj ljestvici (Cukor, 2006). Rezultati u tablici 12 prikazuju modele veze između NIR parametara odnosno absorpcije na valnim duljinama  $\lambda = 904 - 922$  te kemijskih parametara. Iz njih je vidljivo da je na osnovu modela sa složenim članom također postoji čvrsta veza među zavisnom i nezavisnim varijablama. Najviši koeficijent determinacije zabilježen je za  $\Delta 7$ -avenasterol  $R^2 = 0,885$ , a najniži za  $\gamma$ -tokoferol  $R^2 = 0,695$ . Prema tome se dolazi do zaključka kako je na osnovu posebice kolorimetrijskih, a potom i NIR spektroskopskih parametara moguće s visokom vjerojatnošću predvidjeti udjele sterola, skvalena i tokoferola u bučinom ulju odnosno otkriti patvorenje.

Primijećena čvrsta korelacija dobivenih parametara kolorimetrijske i NIR spektroskopske metode idu u korist postavljenom specifičnom cilju istraživanja koji se odnosi na utvrđivanje metode koja bi za utvrđivanje patvorenja bučinog ulja imala adekvatnu korelaciju s kromatografskom metodom.

Dobiveni rezultat potvrđuje istraživanja brojnih autora primjerice Yanga i sur. (2005) o upotrebi NIR-a za uspješno, brzo i jednostavno određivanje autentičnosti jestivih ulja i masti kemometrijskim analizama. Međutim to i slična istraživanja napravljena su većinom na djevičanskom maslinovom ulju, a prema dostupnoj je literaturi moguće zaključiti kako je ovo istraživanje prvo takve vrste provedeno na bučinom ulju.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu dobivenih rezultata i provedene rasprave izvedeni su slijedeći zaključci:

1. Bučino ulje sadrži  $\Delta 7$ -sterole od kojih su dominantni spinasterol, stigmastatrienol i stigmastadienol dok su za rafinirano suncokretovo ulje karakteristični  $\Delta 5$ -steroli i to  $\beta$ -sitosterol, kampesterol i  $\Delta 5$ -stigmasterol. Bučino ulje također sadrži znatno više skvalena i  $\gamma$ -tokoferola, a manje  $\alpha$ -tokoferola karakterističnog za suncokretovo ulje.
2. Udjeli ukupnih sterola, kampesterola,  $\beta$ -sitosterola i spinasterola u većem broju uzoraka bučinih ulja s tržišta, ali i u laboratorijski proizvedenom bučinom ulju odstupali su od identifikacijskih kriterija za bučino ulje postavljenih Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 41/12) te na osnovu njih nije moguće utvrditi patvorenost.
3. Pojedinačni  $\Delta 7$ -steroli međusobno su u pozitivnoj korelaciji te u negativnoj korelaciji s pojedinačnim  $\Delta 5$ -sterolima. Skvalen pozitivno korelira s  $\gamma$ -tokoferolom i ukupnim  $\Delta 7$ -sterolima, a negativno s  $\alpha$ -tokoferolom i  $\Delta 5$ -sterolima.
4. Rezultati analize osnovnih komponenti pokazuju pozitivnu korelaciju prvoga faktora sa spojevima karakterističnim za suncokretovo, a negativnu korelaciju sa spojevima karakterističnim za bučino ulje. Drugi faktor pokazuje pozitivnu korelaciju s kampestanolom i udjelom ukupnih sterola.
5. U prostoru dva faktora bučina ulja s tržišta podijeljena su u dvije skupine (čista i mješavine) od kojih je jedna smještena oko laboratorijski proizvedenog bučinog ulja, a druga se nalazi bliže uzorku rafiniranog suncokretovog ulja. Na osnovu toga je utvrđeno da se u 11 od ukupno 25 analiziranih bučinih ulja s tržišta radi o mješavinama sa, prema gruboj procjeni oko 30-40% suncokretovog ulja.
6. Kolorimetrijske veličine  $L^*$  i  $\Delta E^*_{ab}$  kao i apsorpcije spektroskopije u bliskom infracrvenom području ( $\lambda=904-922$  nm) različite su za laboratorijsko bučino i rafinirano suncokretovo ulje. Također je pokazana statistički značajna korelacija tih parametara sa sterolima, skvalenom i tokoferolom, te su na osnovu njih izvedeni predikcijski modeli koji pokazuju čvrstu povezanost s kemijskim veličinama.

## **7. ZAHVALE**

*Veliko hvala našoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Albino koja nam je omogućila pisanje ovog rada. Hvala joj na strpljenju, stručnoj pomoći i motivaciji koju nam je pružila.*



## **8. LITERATURA**

Alishahi, A., Farahmand, H., Prieto, N., Cozzolino, D. (2010) Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: a review. *Spectrochim. Acta A* **75** (1), 1–7.

Andjelkovic, M., Van Camp, J., Trawka, A., Verhé, R. (2010) Phenolic compounds and some quality parameters of pumpkin seed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 208- 217.

Anonymous 1 (2015) Buča (*Cucurbita pepo* L.), < <http://www.esihospital.org/blog/pumpkin-seed-oil.html>>. Pristupljeno 25. ožujka 2015.

Anonymous 2 (2012) Prikaz načina očitavanja boje u L\*a\*b\* sustavu, <<http://www.mtk.nyme.hu/index.php?id=835>>. Pristupljeno 24. ožujka 2015.

Breinhölder, P., Mosca, L., Lindner, W. (2002) Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. *J. Chrom. B* **777**, 67–82.

Chiou, A., Kalogeropoulos, N., N. Salta, F., Efstathiou, P., K. Andrikopoulos, N. (2009) Pan-frying of French fries in three different edible oils enriched with olive leaf extract: Oxidative stability and fate of microconstituents. *LWT - Food Sci. Technol.* **42**, 1090–1097.

Cukor, G. (2006) Proračuni u obradi skidanjem strugotine, Sveučilište u Rijeci, Rijeka.

Dennis, M.J., Ashurst, P.R. (2013) An introduction to food authentication. U: Food Authentication, (Dennis, M.J. i Ashurst, P.R., ured.), Chapman and Hall, London, Engleska, str. 1-14.

Dessi, M.A., Deiana, M., Day, W.B., Rosa, A., Banni, S., Corongiu, F.P. (2002) Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids: effect of squalene. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104** (8), 506-512.

Dulf, F.V., Bele, C., Ungureșan, M., Parlog, R., Socaciu, S. (2009) Phytosterols as Markers of Identification of the Adulterated Pumpkin Seed Oil with Sunflower Oil. *Bulletin UASVM Agriculture* **66**, 301-307.

Giacometti, J., Tota, M., Milin, Č. (2001) Skvalen - izvor i primjena. *Priroda* **91**, 885-888.

Giuffrè, A.M., Louadj, L. (2013) Influence of Crop Season and Cultivar on Sterol Composition of Monovarietal Olive Oils in Reggio Calabria (Italy). *Czech J. Food Sci.* **31**, 256-263.

Hernández Gómez A, He Y., García Pereira A. (2006) Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *J. Food Eng.* **77** (2), 313–319.

Hrabovski, N., Sinadinović-Fišer, S., Nikolovski, B., Sovilj, M., Borot, O. (2012) Phytosterols in pumpkin seed oil extracted by organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub>. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114** (10), 1204 – 1211.

HR EN ISO 12228 (2004) Životinjske i biljne masti i ulja -Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola - Metoda plinske kromatografije.

HRN EN ISO 11664-4 (2012) Kolorimetrija - 4. dio: CIE 1976 L\*a\*b\* prostor boje.

Huang, H., Yu, H., Xu, H., Ying, Y. (2008) Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *J. Food Eng.* **87** (3), 303–313.

Kamm, W., Dionisi, F., Hischenhuber, C., Engel, K. (2001) Authenticity Assessment of Fats and Oils. *Food Rev. Int.* **17**, 249-290.

Kreft, S., Kreft, M. (2007) Physicochemical and physiological basis of dichromatic colour. *Naturwissenschaften* **94**, 935-939.

Liu, Y., Sun, X., Ouyang, A. (2010) Nondestructive measurement of soluble solid content of navel orange fruit by visible–NIR spectrometric technique with PLSR and PCA-BPNN. *LWT - Food Sci. Technol.* **43**, 602–607.

López Ortíz, C.M., Prats Moya, M.S., Berenguer Navarro, V. (2004) A rapid chromatographic method for simultaneous determination of  $\beta$ -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 141-149.

Mandl, A., Reich, G., Lindner, W. (1999) Detection of alduration of pumpkin seed oil of content and composition of specific  $\Delta^7$ -phytosterols. *Eur. Food Res. Technol.* **209**, 400-406.

Murkovic, M., Mülleser, U., Neunteufl, H. (2001) Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins. *J. Food Compos. Anal.* **15**, 633-638.

Murkovic, M., Piironen, V., Lampi, A.M., Kraushofer, T., Sontag, G. (2004) Changes in chemical compositions of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: non-volatile compounds). *Food Chem.* **84**, 359-365.

Neđeral Nakić, S., Rade, D., Škevin, D., Štrucelj, D., Mokrovčak, Ž., Bartolić, M. (2006) Chemical characteristics of oil from maked and husk seeds of *Cucurbita pepo* L. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108**, 936-943.

Nederal, S., Škevin, D., Kraljić, K., Obranović, M., Papeša, S., Bataljaku, A. (2012) Chemical composition and oxidative stability of roasted and cold pressed pumpkin seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **89**, 1763-1770.

Nicolaï, B.M, Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I., Lammertyn, J. (2007) Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol.Tec.* **46 (2)**, 99-118.

Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., Lampi, A.M. (2000) Review Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 939-966.

Pospišil, M. (2013) Ratarstvo, 2. dio-industrijsko bilje, Zrinski d.d., Čakovec.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) *Narodne novine* **41**, Zagreb.

Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., Lampi, A.M. (2008) Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 152-161.

Stevenson, D.G., Eller, F.J., Wang, L., Jane, J., Wang, T., Inglett, G.E. (2007) Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4005-4013.

TechRentals (2015) Using NIR/MIR spectroscopy, <[http://www.slideshare.net/TechRentals?utm\\_campaign=profiletracking&utm\\_medium=sss&utm\\_source=ssslideview](http://www.slideshare.net/TechRentals?utm_campaign=profiletracking&utm_medium=sss&utm_source=ssslideview)>. Pristupljeno 14.04.2015.

Vigni, M.L., Durante, C., Cocch, M. (2013) Exploratory Data Analysis. U: Chemometrics in Food Chemistry, (Marini, F., ured.), Elsevier ltd., London, Engleska, str. 55-126.

Yang, H., Irudayaraj, J., Paradkar, M.M. (2005) Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, F-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chem.* **93**, 25-32.

## **9. SAŽETAK**

Procjena autentičnosti bučinog ulja primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom, kolorimetrije i spektroskopijom u bliskom infracrvenom području

*Iva Trtanj*

*Dunja Velagić*

Zahvaljujući trendovima moderne prehrane koji propagiraju konzumaciju minimalno procesiranih namirnica, u posljednjih nekoliko godina bučino ulje se sve više odmiče od imidža regionalnog proizvoda, poznatog samo ograničenom broju potrošača i postaje jedan od najpoznatijih predstavnika tzv. funkcionalne hrane iz skupine ulja i masti. Radi niskog prinosa i visokih troškova proizvodnje bučino ulje postiže visoku tržišnu cijenu te je u proizvodnom procesu posljedično moguća i pojava njegovog patvorenja s jeftinijim rafiniranim uljima.

Stoga je glavni cilj ovog rada bio, uz upotrebu plinske kromatografije s masenom spektrometrijom, procijeniti ima li patvorina među uzorcima bučinog ulja prikupljenim s hrvatskog tržišta. Radi određivanja markera patvorenja ista analiza provela se i na laboratorijski proizvedenom bučinom ulju te rafiniranom suncokretovom ulju. Također, specifični cilj rada bio je istražiti mogućnosti primjene kolorimetrije i spektroskopije u bliskom infracrvenom području za otkrivanje patvorenja bučinog ulja.

U analiziranim uljima detektirani su  $\Delta 7$ -steroli, skvalen i  $\gamma$ -tokoferol kao spojevi specifični za bučino te  $\Delta 5$ -steroli i  $\alpha$ -tokoferol kao spojevi specifični za suncokretovo ulje. Provedbom analize osnovnih komponenti zajedno s analizom varijance određivanih kemijskih parametara utvrđeno je da se u 44% uzoraka na tržištu, označenih kao bučino ulje, radi o mješavinama sa suncokretovim uljem. Pojedini parametri kolorimetrije i spektroskopije u bliskom infracrvenom području imali su visoku korelaciju s kemijskim parametrima te postoji mogućnost njihovog korištenja u svrhu brze i jednostavne detekcije patvorenja bučinog ulja.

Ključne riječi: bučino ulje, patvorenje, steroli, kolorimetrija, NIR spektroskopija

## **10. SUMMARY**



Assessment of pumpkin seed oil's authenticity using gas chromatography with mass spectrometry, colorimetry and near infrared spectroscopy

*Iva Trtanj*

*Dunja Velagić*

Following recent nutrition trends that promote the consumption of minimally processed foodstuff, pumpkin seed oil is shifting away from the image of regional product known only to the limited number of consumers, becoming one of the most known representatives of so called functional foods from the oils and fats group. Due to the low yield and high production costs pumpkin seed oil has high market value consequently enabling its adulteration with less expensive refined oils are possible.

Therefore, the main goal of this research was to asses the possible adulterations of pumpkin seed oils from Croatian market by the use of gas chromatography with mass spectrometry. To enable detecting the adulteration markers, the analyses were also carried out on the laboratory produced pumpkin seed oil and the refined sunflower oil. In addition, the goal was to explore the possibilities of colorimetric and near infrared spectroscopic analyses to detect of pumpkin seed oil's adulteration.

In the analyzed oils,  $\Delta^7$ -sterols, squalene and  $\gamma$ -tocopherol were detected as compounds specific for pumpkin seed oil, while  $\Delta^5$ -sterols and  $\alpha$ -tocopherol were specific for sunflower seed oil. Principal component analysis paired with analysis of variance of determined chemical compounds revealed that 44% of the samples deleared as pumpkin seed oils were actually blends with sunflower oil. Individual parameters of colorimetric and near infrared spectrometric analysis show high correlation with the chemical parameters, evoking the possibility of their usage in the purpose of fast and inexpensive detection of pumpkin seed oil's adulteration.

Keywords: pumpkin seed oil, adulteration, sterols, colorimetry, NIR spectroscopy

## **12. ŽIVOTOPISI**

### **Iva Trtanj**

Rođena sam 06.09.1990. u Sisku, gdje sam pohađala i završila Osnovnu školu Ivana Kukuljevića. Zatim sam sa školovanjem nastavila u Gimnaziji Sisak, opći smjer.

2009. upisujem Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu, smjer Prehrambena tehnologija, nakon kojeg sam stekla zvanje sveučilišne prvostupnice inženjerke prehrambene tehnologije sa osvojena 183 ECTS boda.

Nakon završenog preddiplomskog studija upisujem diplomski studij na istom fakultetu, smjer Prehrambeno inženjerstvo. Trenutno sam studentica druge godine diplomskog studija.

### **Dunja Velagić**

Rođena sam 14.05.1990. u Zagrebu. Osnovnu naobrazbu stekla sam kroz prvih šest razreda u Osnovnoj Waldorfskoj školi u Zagrebu te kroz sedmi i osmi razred u Osnovnoj školi Eugena Kvaternika u Velikoj Gorici.

2005. godine upisujem Klasičnu gimnaziju u Zagrebu. Nakon završetka srednje škole upisujem preddiplomski studij prehrambene tehnologije na Prehrambeno - biotehnološkom fakultetu u Zagrebu.

Po završetku preddiplomskog studija svoje školovanje nastavljam na istom fakultetu upisom diplomskog studija Prehrambeno inženjerstvo. Trenutno sam studentica druge godine diplomskog studija.