

Mr Snežana Ž. Kravić

**ODREĐIVANJE *TRANS* MASNIH KISELINA U
PREHRAMBENIM PROIZVODIMA GASNOM
HROMATOGRAFIJOM–MASENOM
SPEKTROMETRIJOM**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2010.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: Mr Snežana Ž. Kravić
AU

Mentor: Dr Zvonimir Suturović, redovni profesor
MN

Naslov rada: Određivanje *trans* masnih kiselina u prehrambenim proizvodima
gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski / Engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina
UGP

Godina: 2010.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
MA

Fizički opis rada: (broj poglavlja / stranica / slika / tabela/ referenci)
FO 6 147 27 41 177

Naučna oblast: Hemijsko-tehnološke nauke
NO

Naučna disciplina: Primenjena hemija
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Gasna hromatografija, masena spektrometrija, mikrotalasna ekstrakcija, *trans* masne kiseline, prehrambeni proizvodi

PO

UDK

Čuva se:
ČU

U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad,
Bulevar cara Lazara 1

Važna napomena:
VN

-

Izvod:
IZ

U okviru doktorske disertacije optimizovani su uslovi određivanja metilestara masnih kiselina, uključujući i *trans* izomere, primenom kapilarne gasne hromatografije–masene spektrometrije, na kapilarnoj koloni SP-2560 (dužina x unutrašnji prečnik: 100 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne likvidne faze 0,20 μm, biscijanopropil polisiloksan). Korišćenjem standarnih rastvora metilestara masnih kiselina optimizovani su temperaturni program, odnos razdeljivanja i uslovi akvizicije podataka SCAN tehnikom. Razvijena je metoda za pripremu uzoraka u cilju određivanja sastava masnih kiselina u prehrambenim proizvodima gasnom hromatografijom–masenom spektrometrijom zasnovana na istovremenoj mikrotalasnoj ekstrakciji i esterifikaciji (SMEE). Validacija metode je izvedena poređenjem sa rezultatima dobijenim gasnom hromatografijom–masenom spektrometrijom nakon ekstrakcije po Soxhlet-u i derivatizacije masnih kiselina u metilestre masnih kiselina. Rezultati dobijeni primenom razvijene i referentne metode bili su statistički isti, kako u pogledu sastava masnih kiselina, tako i efikasnosti ekstrakcije. Rezultati su pokazali da su prednosti SMEE u odnosu na konvencionalnu metodu: kratko vreme pripreme uzoraka i samim tim manja potrošnja energije, kao i upotreba malih količina skupih organskih rastvarača. Dobro slaganje rezultata dobijenih primenom referentne i metode zasnovane na istovremenoj mikrotalasnoj ekstrakciji i esterifikaciji pokazuje da bi se SMEE mogla primeniti kao rutinska metoda za pripremu uzoraka prehrambenih proizvoda u cilju određivanja *trans* masnih kiselina (TFA). Određen je sastav masnih kiselina, sa posebnim akcentom na *trans* masne kiseline, u 273 uzoraka prikupljenih sa našeg tržišta u periodu od juna 2006. do juna 2009. godine. Sadržaj *trans* masnih kiselina u analiziranim uzorcima prehrambenih proizvoda, sirovina i međuproizvoda koji se koriste u pekarskoj i konditorskoj industriji, kretao se u veoma širokom intervalu, od 0,0% do čak 48,7%. Prosečan sadržaj *trans* masnih kiselina iznosio je 0,2% u uljima, 6,5% u jestivim margarinima, 19,9% u margarinima za domaćinstvo, 9,8% u industrijskim margarinima, 24,3% u namenskim mastima, 10,8% u masnim punjenjima, 1,6% u mlečnim proizvodima, 10,9% u slanom trajnom pecivu, 10,2% u čajnom pecivu, 6,3% u tvrdom keksu, 11,0% u vafel proizvodima, 10,6% u čokoladnim proizvodima i 9,2% u karamelama. Od ukupno 124 analizirana uzorka, koja se ne koriste za direktnu upotrebu u ishrani (namenske masti, masna punjenja, industrijski i margarini za domaćinstvo) 86 uzoraka (69,3%) sadrži više od 5% *trans* masnih kiselina, 25 (20,2%) sadrži manje od 5% TFA, dok u 13 uzoraka (10,5%) nije detektovano prisustvo *trans* izomera. Od ukupno 140 analiziranih uzoraka, koji se koriste za direktnu upotrebu u ishrani 74 uzoraka (52,8%) sadrži više od 2% *trans* masnih kiselina, 20 (14,3%) sadrži manje od 2% TFA, dok u 46 uzoraka (32,9%) nije detektovano prisustvo *trans* izomera.

Datum prihvatanja teme: 19.02.2009.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

predsednik: dr Biljana Abramović, redovni profesor Prirodno–
matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
član: dr Zvonimir Suturović, redovni profesor
Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
član: dr Mira Pucarević, redovni profesor Fakulteta za
zaštitu životne sredine EDUKONS Univerziteta
član: dr Jaroslava Švarc-Gajić, docent Tehnološkog
fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual material, printed
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: MSc Snežana Ž. Kravić
AU

Mentor: Zvonimir Suturović, PhD, full professor
MN

Title: Determination of *trans* fatty acids in foodstuffs by gas
TI chromatography-mass spectrometry

Language of text: Serbian (Roman)
LT

Language of abstract: Serbian / English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: AP Vojvodina
LP

Publication year: 2010
PY

Publisher: Author`s reprint
PU

Publication place: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: (Chapters / pages / figures / tables / ref.)
PD 6 147 27 41 177

Scientific field: Chemical-technological sciences
SF

Scientific discipline: Applied chemistry
SD

Subject, Key words: Gas chromatography, mass spectrometry, microwave extraction,
SKW *trans* fatty acids, foodstuffs

UC

Holding data: Library of Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, Bulevar cara
HD Lazara 1, Serbia

Note: -

N

Abstract: In this thesis, operating conditions for fatty acids determination, AB including *trans* isomers, by capillary gas chromatography–mass spectrometry, on capillary column SP-2560 (100 m x 0.25 mm, with a 0.20 µm film thickness of biscyanopropyl polysiloxane liquid phase) were optimized. Temperature program, split ratio and condition of data acquisition by SCAN technique were optimized using standard solutions of fatty acid methyl esters. A sample preparation method based on simultaneous microwave assisted extraction–esterification (SMEE) was developed for the determination of the fatty acid composition of foodstuffs by gas chromatography–mass spectrometry. The proposed sample preparation method was validated by comparison with the reference Soxhlet extraction method followed by derivatisation by methyl ester formation and the same determination step. The fatty acid compositions, as well as extraction efficiencies obtained by the use of the proposed SMEE method and reference method were statistically similar. The results showed that compared to the conventional method, SMEE method offer the advantages of short sample preparation time, low consumption of expensive organic solvents and less energy consumption. This good agreement between results provided, both by the SMEE and reference method, demonstrates the usefulness of the former as the routine method for the treatment of food samples prior to *trans* fatty acid analysis. The fatty acid composition, and *trans* fatty acid content of 273 samples collected from June 2006 to June 2009 year were determined. *Trans* fatty acid content in the analysed samples of food products, raw materials and intermediate products used in bakery and confectionery industry was ranged in a very wide interval, from 0.0% to 48.7%. The average contents of *trans* fatty acids were 0.2% in oils, 6.5% in the edible margarines, 19.9% in cooking margarines, 9.8% in industrial margarines, 24.3% in shortenings, 10.8 % in fat fillings, 1.6% in dairy products, 10.9% in crackers, 10.2% in tea cookies, 6.3% in biscuits, 11.0% in wafer products, 10.6% in chocolate products and 9.2% in the caramels. From the total of 124 analysed samples, which are not used for direct human consumption (shortenings, fat fillings, industrial and cooking margarines) 86 samples (69.3%) contained more than 5% *trans* fatty acids, 25 (20.2 %) contained less than 5% TFA, while 13 samples (10.5%) had an undetectable levels of *trans* isomers. From a total of 140 analysed samples, which are used for direct human consumption 74 food samples (52.8%) contained more than 2% *trans* fatty acids, 20 (14.3%) contained less than 2% TFA, while 46 samples (32.9%) had an undetectable levels of *trans* isomers.

Accepted on Scientific
Board on:
AS

February 19, 2009

Defended:

DE

Thesis Defend Board:
DB

president: Biljana Abramović, PhD, full professor, Faculty of
Science, University of Novi Sad
member: Zvonimir Suturović, PhD, full professor, Faculty of
Technology, University of Novi Sad
member: Mira Pucarević, PhD, full professor, Faculty of
Environmental Protection, EDUCONS University
member: Jaroslava Švarc-Gajić, PhD, assistant professor,
Faculty of Technology, University of Novi Sad

Spisak skraćenica

a.m.u.	atomska jedinica mase (<i>engl.</i> atomic mass unit)
BHA	butilovani hidroksianizol
BHT	butilovani hidroksitoluen
CI	hemijska jonizacija (<i>engl.</i> Chemical Ionization)
<i>cis</i> MUFA	<i>cis</i> -mononezasićene masne kiseline
<i>cis</i> PUFA	<i>cis</i> -polinezasićene masne kiseline
CLA	konjugovana linolna kiselina (<i>engl.</i> Conjugated Linolenic Acid)
DHA	dokosaheksaenska masna kiselina
DMOX	dimetiloksazolin
EI	jonizacija elektronima (<i>engl.</i> Electron Impact)
EPA	Agencija za zaštitu životne sredine (<i>engl.</i> Environmental Protection Agency)
EPA	eikosapentaenska masna kiselina
FAB	jonizacija bombardovanjem atomima (<i>engl.</i> Fast Atom Bombardment)
FD	jonizacija desorpcijom (<i>engl.</i> Field Desorption)
FI	jonizacija u električnom polju (<i>engl.</i> Field Ionization)
FID	plameno jonizacioni detektor (<i>engl.</i> Flame Ionization Detector)
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovim transformacijama (<i>engl.</i> Fourier Transform Infrared)
GC	gasna hromatografija (<i>engl.</i> Gas Chromatography)
GC-IR	gasna hromatografija-infracrvena spektroskopija (<i>engl.</i> Gas Chromatography –Infrared Spectroscopy)
GC-MS	gasna hromatografija-masena spektrometrija (<i>engl.</i> Gas Chromatography – Mass Spectrometry)
HDL	lipoproteini velike gustine (<i>engl.</i> High Density Lipoprotein)
HETP	visina ekvivalenta teorijskog poda (<i>engl.</i> Height Equivalent of a Teoretical Plate)
HPLC	visokopritisna tečna hromatografija (<i>engl.</i> High Preassure Liquid Chromatography)
IR	infracrveno zračenje (<i>engl.</i> Infrared)

IT	jon trap analizator (<i>engl.</i> Ion Trap)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDL	lipoproteini male gustine (<i>engl.</i> Low Density Lipoprotein)
MALDI	jonizacija potpomognuta laserskom desorpcijom iz matriksa (<i>engl.</i> Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
ME	mikrotalasna ekstrakcija
MFD	fenomen depresije mlečne masti (<i>engl.</i> Milk Fatt Depresion)
MS	maseni spektrometar
MUFA	mononezasićene masne kiseline (<i>engl.</i> Monounsaturated Fatty Acids)
NBS	Nacionalni biro za standarde
NMR	nuklearna magnetna rezonanca (<i>engl.</i> Nuclear Magnetic Resonance)
PBM	postupak vrednovanja na bazi verovatnoće (<i>engl.</i> Probability Based Matching)
PFA	perfluoroalkoksi
PFTBA	perfluorotributilamin
PLOT	kapilarne kolone sa poroznim slojem (<i>engl.</i> Porous Layer Open Tubular)
PTV	temperaturno programirano isparavanje (<i>engl.</i> Programmed Temperature Vaporizing)
PUFA	polinezasićene masne kiseline (<i>engl.</i> Polyunsaturated Fatty Acids)
RSD	relativna standardna devijacija
SCAN	snimanje masenog spektra
SCOT	kolone sa unutrašnjim zidom prevučeni stacionarnom likvidnom fazom i sprašenim inertnim nosačem (<i>engl.</i> Supported Coated Open Tubular)
SFA	zasićene masne kiseline (<i>engl.</i> Saturated Fatty Acids)
SIM	praćenje jona definisanih masa (<i>engl.</i> Selected Ion Monitoring)
SMEE	simultana mikrotalasna ekstrakcija – esterifikacija
SR	odnos razdeljivanja (<i>engl.</i> Split Ratio)
SS	jonizacija varnicom (<i>engl.</i> Spark Source)
TFA	<i>trans</i> masne kiseline (<i>engl.</i> Trans Fatty Acid)
TFM	tetrafluorometoksil polimer
TIC	totalni jonski hromatogram (<i>engl.</i> Total Ion Chromatogram)
TLC	hromatografija na tankom sloju (<i>engl.</i> Thin Layer Chromatography)
TOF	analizator na bazi vremena preleta (<i>engl.</i> Time Of Flight)
UFA	nezasićene masne kiseline (<i>engl.</i> Unsaturated Fatty Acids)
UV	ultraljubičasto zračenje (<i>engl.</i> Ultraviolet)
WCOT	standardne kapilarne kolone (<i>engl.</i> Wall-Coated Open Tubular)
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (<i>engl.</i> World Health Organization)

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	4
2.1. Masti i ulja	4
2.2. Triacilgliceroli	5
2.3. Masne kiseline	6
2.3.1. Podela i obeležavanje masnih kiselina	6
2.3.1.1. Zasićene masne kiseline	7
2.3.1.2. Nezasićene masne kiseline	8
2.3.1.3. Esencijalne masne kiseline	10
2.3.2. Fizičke i hemijske karakteristike	13
2.3.2.1. Fizičke karakteristike	13
2.3.2.2. Hemijske karakteristike	15
2.3.2.2.1. Reakcije na estarskoj vezi i karboksilnoj grupi	15
2.3.2.2.2. Reakcije u lancu masne kiseline	16
2.4. <i>Trans</i> masne kiseline	16
2.4.1. Nastanak <i>trans</i> masnih kiselina	16
2.4.1.1. Proces nastajanja <i>trans</i> masnih kiselina u telu preživara	17
2.4.1.2. Postupak nastajanja <i>trans</i> masnih kiselina industrijskom parcijalnom hidrogenacijom	18
2.4.2. Uticaj <i>trans</i> masnih kiselina na ljudski organizam	19
2.4.3. Zakonska regulativa	21
2.4.4. Masti sa smanjenim sadržajem <i>trans</i> masnih kiselina	22
2.4.5. Prisustvo <i>trans</i> masnih kiselina u namirnicama.....	23
2.4.6. Metodologija određivanja <i>trans</i> masnih kiselina	24
2.4.6.1. Gasna hromatografija u analizi <i>trans</i> masnih kiselina	26
2.4.6.1.1. Priprema uzoraka koji sadrže lipide za gasnu hromatografiju .	28
2.5. Mikrotalasna ekstrakcija (ME)	29
2.5.1. Teorijske osnove	30
2.5.1.1. Mehanizam mikrotalasne ekstrakcije	32
2.5.2. Instrumentacija	33
2.5.3. Parametri procesa mikrotalasne ekstrakcije	34
2.5.3.1. Rastvarač	34
2.5.3.2. Vreme ekstrakcije	35

2.5.3.3. Mikrotalasna snaga	35
2.6. Kapilarna gasna hromatografija–masena spektrometrija (GC–MS)	35
2.6.1. Gas nosač	37
2.6.2. Injektor	39
2.6.3. Kapilarne kolone	42
2.6.3.1. Stacionarne faze	44
2.6.3.1.1. Debljina filma stacionarne faze	46
2.6.3.2. Kapacitet kolone	47
2.6.4. Vezivanje GC i MS	47
2.6.5. Jonski izvor	48
2.6.6. Maseni analizator	50
2.6.7. Detektori masenih spektrometara	54
2.6.8. Vakuumski sistem	54
2.6.9. Uloga računara u GC–MS analizi	55
2.6.10. Kalibracija masenog spektrometra	55
2.6.11. Merne tehnike u GC–MS analizi	57
2.6.12. PBM (Probability Based Matching) sistem	59
3. Eksperimentalni deo.....	60
3.1. Aparatura	60
3.2. Hemikalije, reagensi i standardi	60
3.3. Uzorci	62
3.3.1. Priprema uzoraka	64
3.3.1.1. Određivanje sadržaja masti	64
3.3.1.2. Ekstrakcija lipida	65
3.3.1.2.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u	65
3.3.1.2.2. Mikrotalasna ekstrakcija u otvorenom sistemu	65
3.3.1.3. Priprema metilestara masnih kiselina	66
3.3.1.4. Simultana mikrotalasna ekstrakcija–esterifikacija u otvorenom sistemu	66
3.3.2. Analiza metilestara masnih kiselina gasnom hromatografijom–masenom spektrometrijom	66
3.3.3. Kvalitativno i kvantitativno određivanje	67
4. Rezultati i diskusija	69
4.1. Optimizacija uslova GC–MS analize	69
4.1.1. Definisanje odnosa razdeljivanja	69
4.1.2. Podešavanje rada masenog spektrometra	69

4.1.3. Optimizacija temperaturnog programa	70
4.2. Definisanje korekcionih faktora	76
4.3. Definisanje postupka pripreme uzorka	78
4.3.1. Optimizacija simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije	80
4.3.2. Poređenje sastava ekstrakata dobijenih primenom različitih metoda	84
4.4. Određivanje sadržaja <i>trans</i> masnih kiselina u prehrambenim proizvodima	90
5. Zaključak	130
6. Literatura	133

1. Uvod

Masti predstavljaju bogat izvor energije i važne gradivne elemente tkiva i biomembrana, te ih je neophodno svakodnevno unositi u organizam. Masti, kao jedan od osnovnih sastojaka prehrambenih proizvoda, utiču na njihov ukus, konzistenciju, teksturu i druge fizičke osobine. Funkcionalna uloga masti u prehrambenim tehnologijama je višestruka. One određuju fizičke, senzorne i reološke karakteristike samog proizvoda, utiču na teksturu i punoću ukusa i imaju pozitivan efekat na svežinu proizvoda.

Masne kiseline, koje su sastavni deo masti, u prirodnim namirnicama i industrijskim proizvodima mogu se javiti kao slobodne, ili estarski vezane u vidu mono-, di- i triglicerida, fosfolipida, lipoproteina ili glikolipida. Molekuli masnih kiselina mogu da sadrže jednu, ili više dvostrukih veza što je slučaj kod mononezasićenih, odnosno, polinezasićenih masnih kiselina. Dvostruke veze se najčešće javljaju u *cis* konfiguraciji, mada se u prirodi mogu naći u malim količinama i *trans* masne kiseline (*trans* fatty acid, TFA). S druge strane, hidrogenovanje i termička obrada tečnih biljnih ulja, postupci koji se primenjuju pre svega u cilju sprečavanja oksidacije i dobijanja tehnološki pogodnijeg proizvoda, dovode i do izomerizacije *cis* masnih kiselina u *trans* oblik, pri čemu može doći i do premeštanja dvostruke veze duž ugljovodoničnog lanca. Prehrambeni proizvodi kao što su margarini, namazi, prelive za salate, konditorski i pekarski proizvodi, u čiji sastav ulaze hidrogenovana biljna ulja, kao i pržena hrana, takođe sadrže *trans* masne kiseline. Od devedesetih godina XX veka sprovedena su brojna ispitivanja vezana za uticaj *trans* masnih kiselina na zdravstveno stanje ljudi pa se danas, pored zasićenih masnih kiselina, i *trans* masne kiseline smatraju štetnim i nepoželjnim sastojcima prehrambenih proizvoda. Mnogobrojne kliničke i eksperimentalne studije su potvrdile da *trans* masne kiseline deluju izrazito aterogeno jer dovode do porasta ukupnog holesterola i lipoproteina male gustine (low density lipoprotein, LDL), kao i lipoproteina (a), a snižavaju nivo lipoproteina velike gustine (high density lipoprotein, HDL). Osim negativnih efekata TFA na kardiovaskularni sistem, *trans* masne kiseline su dovedene u vezu i sa razvojem nekih karcinoma, dijabetesa tipa 2, tromboza, alergija i astme kod dece.

S obzirom da su mnogobrojne studije pokazale da zasićene i *trans* masne kiseline štetno deluju na ljudsko zdravlje, Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO) preporučuje da ukupni unos masti ne bude veći od 30%, a udeo zasićenih masnih kiselina manji od 10% dnevno potrebne energije (po poslednjim preporukama čak ispod 7%), dok su TFA ograničene na manje od 1% dnevno potrebne energije. Imajući u vidu preporuke Svetske zdravstvene organizacije, mnoge zemlje su uvele zakonsku regulativu vezanu za obavezno deklarisanje sadržaja *trans* masnih kiselina u prehrambenim proizvodima, dok je u Danskoj zakonski definisan i maksimalno dozvoljen sadržaj TFA.

Potreba za poznavanjem masnokiselinskog sastava, pre svega životnih namirnica, i raščlanjivanjem složenih lipidnih uzoraka, ne samo na pojedine masne kiseline, već i na njihove geometrijske i pozicione izomere, analitičarima nameće zadatak za razvojem brze, tačne, reproduktivne i osetljive metode za identifikaciju i određivanje sadržaja masnih kiselina u hrani i drugim biološkim matricama. Danas se u ove svrhe koriste instrumentalne metode analize, a kada je određivanje *trans* masnih kiselina u pitanju, najzastupljenije su: kapilarna gasna hromatografija, visokopritisna tečna hromatografija, hromatografija na adsorbensu impregniranom srebrnim jonima, IR spektroskopija, kao i kombinovane tehnike. Najčešće korišćena tehnika u analitici *trans* masnih kiselina je kapilarna gasna hromatografija, a metode obuhvataju: prethodnu ekstrakciju lipida iz uzorka, dalju transformaciju analita u pogodno derivate kao što su metilestri i na kraju, gasno hromatografsko određivanje. Svaki od ovih koraka uključuje određene kritične operacije, podešavanje parametara i interpretaciju rezultata, tako da su analitičari tokom izvođenja analiza suočeni sa brojnim problemima.

Ekstrakcija lipida se tradicionalno izvodi na različite načine uz primenu organskih rastvarača u zavisnosti od karakteristika samog uzorka kao i zahteva same analize. Osnovni nedostatak najčešće primenjivanih klasičnih ekstrakcionih tehnika, kao što su metode po Soxhlet-u, Folch-u, Röse-Gottlieb-u, i dr., je dugo vreme izođenja ekstrakcije. Stoga se sve više ispituje mogućnost primene novih, bržih metoda za ekstrakciju lipida iz različitih tipova uzoraka, kao što su sistemi za automatsku hidrolizu i ekstrakciju, ekstrakcija fluidima u nadkritičnom stanju, ekstrakcija u zatvorenim sistemima na povišenoj temperaturi i pritisku, ekstrakcija po Soxhlet-u potpomognuta mikrotalasima, ultrazvučna ekstrakcija i dr. U cilju sprečavanja kontaminacije i razgradnje uzorka tokom hidrolize, ekstrakcije i metilovanja, teži se primeni metoda koje bi omogućile direktno dobijanje metilestara iz matriksa uzorka.

Imajući u vidu podatak da su bolesti srca i krvnih sudova vodeći uzrok smrtnosti u Srbiji, sa učešćem od 55,8% u svim uzrocima smrti, kao i činjenicu da pojedine masne kiseline negativno utiču pre svega na razvoj kardiovaskularnih bolesti, u cilju prevencije kardiovaskularnih oboljenja u našoj zemlji, trebalo bi što pre započeti proces praćenja sadržaja aterogenih masti u namirnicama, što je delom i predviđeno u okviru Strategije za prevenciju i kontrolu hroničnih nezaraznih bolesti Republike Srbije koju je donela Vlada Republike Srbije.

Osnovni cilj ovog rada bio je razvoj odgovarajuće analitičke metode koja bi se mogla primeniti za analizu sirovina, poluproizvoda i gotovih prehrambenih proizvoda, u cilju određivanja sadržaja masnih kiselina, uključujući i njihove *trans* izomere. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije će obuhvatiti tri osnovne faze:

1. Optimizaciju uslova određivanje masnih kiselina primenom kapilarne gasne hromatografije-masene spektrometrije (GC–MS),
2. Definisavanje postupka pripreme različitih vrsta uzoraka i
3. Određivanje sadržaja *trans* masnih kiselina u sirovinama, poluproizvodima i gotovim proizvodima.

Optimizacija uslova GC–MS određivanja masnih kiselina obuhvatiće definisanje temperaturnog programa, odnosa razdeljivanja, opsega masa snimanih SCAN tehnikom i količine uzorka što će omogućiti odgovarajuće razdvajanje metilestara masnih kiselina, uključujući i *trans* izomere, u relativno kratkom vremenu.

Eksperimentalni rad u drugoj fazi istraživanja, odnosno definisanje postupka pripreme različitih vrsta uzoraka, obuhvatiće ekstrakciju masti i pripremu metilestara. U cilju skraćivanja vremena potrebnog za pripremu uzoraka prehrambenih proizvoda za GC–MS analizu, ispitaće se mogućnost primene istovremene mikrotalasne ekstrakcije i esterifikacije u otvorenom sistemu. Kao referentna metoda primeniće se, uobičajeno korišćena ekstrakcija po Soxhlet-u, praćena derivatizacijom. Pripremljeni uzorci će se analizirati primenom GC–MS, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima, a dobijeni rezultati će se uporediti primenom Studentovog *t*-testa jednakosti srednjih vrednosti u cilju validacije metode za pripremu uzoraka. Ukoliko se ustanovi da se primenom istovremene mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije postižu isti ili bolji rezultati u odnosu na referentnu metodu, uz istovremeno skraćivanje vremena trajanja analize, očekuje se da će ova tehnika naći primenu u rutinskim analizama, odnosno u kontroli kvaliteta komercijalnih proizvoda.

U trećoj fazi istraživanja definisani postupci za pripremu uzoraka i izvođenje GC–MS analize će se primeniti za određivanje masnokiselinskog sastava sirovina, međuproizvoda i gotovih proizvoda sa našeg tržišta, u kojima se očekuje prisustvo industrijski dobijenih *trans* masnih kiselina (namenske masti, masna punjenja, margarini, konditorski i pekarski proizvodi). Određivanje i praćenje sadržaja masnih kiselina u navedenim proizvodima, sa akcentom na aterogene masti, omogućiće definisanje funkcionalnih osobina ovih proizvoda, odnosno njihove nutritivne vrednosti. Takođe, dobijeni rezultati će poslužiti i kao osnova za određivanje prosečnog unosa aterogenih masti u našoj zemlji, izradu preporuka za pravilnu ishranu, edukaciju stanovništva i saradnju sa proizvođačima, odnosno predstavljali bi značajan doprinos u prevenciji i kontroli hroničnih nezaraznih bolesti.

2. Teorijski deo

2.1. Masti i ulja

Potreba čoveka za mastima datira od najranijih vremena. Ulja i masti su neophodni sastojci pravilne ishrane jer imaju mnogobrojne značajne biološke uloge u organizmu: odličan su izvor energije i esencijalnih nutritijenata (liposolubilnih vitamina, esencijalnih masnih kiselina), služe kao energetska rezerva, poboljšavaju osećaj ukusa i doprinose osećaju sitosti, imaju gradivnu ulogu kao sastavni deo svih ćelijski membrana (Dimić, 2005). Lipoproteini, kompleksi masti i proteina, su važni sastojci ćelija koji se nalaze u ćelijskim membranama i mitohondrijama unutar citoplazme i služe za transport lipida u krvi. U potkožnim tkivima i oko unutrašnjih organa masti služe kao izolacioni materijal. Napolarni lipidi deluju kao električni izolatori koji omogućavaju brzo prenošenje depolarizacionih talasa duž nervnih vlakana. Masti, takođe učestvuju u metaboličkim transformacijama pri čemu se stvaraju specifične supstance od fiziološkog i nutritivnog značaja: steroidni hormoni, žučne kiseline, eikosanoidi i dr.

Kako bi se osigurala višestruka uloga masti i ulja u razvoju i funkcionisanju organizma, oni se moraju konzumirati pravilno, odnosno neophodno je unositi određene količine masnoće visokog kvaliteta i dobre održivosti. Naime, veoma ozbiljni poremećaji u organizmu, koji imaju za posledicu pojavu nekih oboljenja, sve češćih u savremenom društvu, pripisuju se u najvećoj meri nepravilnom uzimanju masti. Po mnogim autorima (Erkkilä *et al.*, 2008), visok sadržaj lipida i holesterola u krvi, ateroskleroza, gojaznost, hipertenzija, koronarne bolesti srca u najužoj su vezi sa vrstom i količinom masti koja se dnevno unosi u organizam. Mnogobrojnim istraživanjima utvrđena je direktna veza između vrste masti, odnosno sadržaja zasićenih, mononezasićenih, polinezasićenih i *trans* masnih kiselina u ishrani i razvoja kardiovaskularnih oboljenja. Stoga, da bi se obezbedila kvalitetna i zdrava ishrana pri savremenim uslovima života neophodno je poznavati potrebne količine masnoće za zadovoljenje odgovarajućeg celokupnog

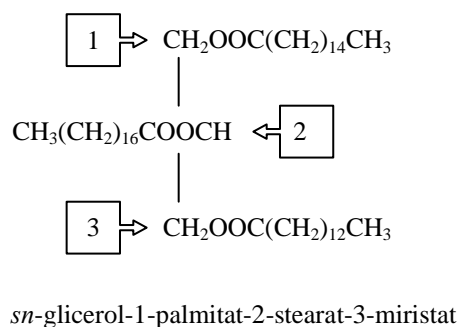
dnevnog energetskeg unosa, nutritivnu vrednost, sastav, biohemijske funkcije masti, kao i metode tehnološke i kulinarske obrade koje dovode do nepoželjnih promena u masnoj fazi.

Masti i ulja pripadaju grupi lipida. Masti i ulja se obično dele prema poreklu na biljna i životinjska, a prema konzistenciji na temperaturi okoline na čvrste – masti i tečne – ulja. U hemijskom pogledu, to su triestri trohidroksilnog alkohola glicerola i masnih kiselina, odnosno monokarboksilnih kiselina sa dugim lancem. Nazivaju se triacilgliceroli ili, po starijoj nomenklaturi, trigliceridi.

2.2. Triacilgliceroli

Triacilgliceroli su jedinjenja koja nastaju reakcijom između jednog molekula glicerola i tri molekula, istih ili različitih, masnih kiselina. Ukoliko su sve tri masne kiseline u molekulu triacilglicerola iste nazivaju se jednostavni, a ukoliko su različite mešoviti. Prirodne masti i ulja su smeše estara glicerola u kojima preovladava jedna ili dve masne kiseline. Vrsta i položaj masnih kiselina u molekulu triacilglicerola utiču na fizička svojstva masti i ulja. Triacilgliceroli stvaraju u organizmu energetske depoe iz kojih se, zavisno od potreba organizma, oslobađaju masne kiseline, a iz njih procesom oksidacije energija neophodna za život svih ćelija organizma uopšte (Flider & Orthofer, 1981).

Kako glicerol sadrži dve primarne hidroksilne grupe, centralni ugljenikov atom zahteva hiralanu poziciju, ukoliko su obe primarne hidroksilne grupe esterifikovane različitim masnim kiselinama (Dimić, 2005). Najčešći način obeležavanja stereospecifične strukture triacilglicerola je pomoću Fišerove planarne projekcije glicerola, pri čemu se srednja hidroksilna grupa nalazi sa leve strane centralnog ugljenikovog atoma. Ugljenikovi atomi se obeležavaju brojevima 1, 2 i 3, konvencionalno prihvaćeno, sa vrha prema dole i stavlja se oznaka *sn*- pre glicerola. Na slici 2.1. je dat šematski prikaz hemijske građe i način obeležavanja triacilglicerola.



Slika 2.1. Šematski prikaz hemijske građe i način obeležavanja triacilglicerola

2.3. Masne kiseline

Masne kiseline su osnovni gradivni elementi acilglicerola i drugih klasa lipida kao što su: fosfolipidi, glikolipidi, voskovi i dr. Sastavljene su od pravog lanca ugljenikovih atoma, a molekul se završava karboksilnom grupom. Masne kiseline predstavljaju reaktivni deo molekula triacilglicerola te je poznavanje njihovih hemijskih i fizičkih karakteristika neophodno za poznavanje svojstava samih triacilglicerola. Zato se pri izučavanju jestivih masti i ulja razmatra sastav, kao i svojstva masnih kiselina koja se nalaze u mastima i uljima biljnog i animalnog porekla.

U prirodnim uljima i mastima se nalazi veoma velik broj masnih kiselina, preovladavaju masne kiseline nerazgranatog lanca sa parnim brojem ugljenikovih atoma i jednom karboksilnom grupom, što je u vezi sa njihovim biološkim poreklom. Masne kiseline se međusobno razlikuju po broju ugljenikovih atoma u molekulu, po broju, položaju i konfiguraciji nezasićenih veza, kao i prisustvu drugih funkcionalnih grupa duž lanca.

2.3.1. Podela i obeležavanje masnih kiselina

Masne kiseline se dele po nekoliko osnova (Dimić, 2005):

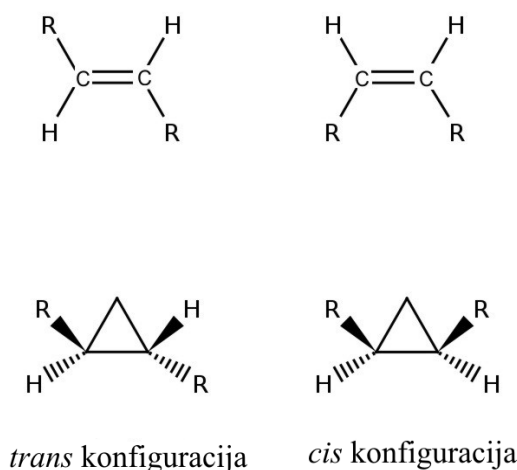
1. prema broju ugljenikovih atoma,
 2. na osnovu nezasićenih veza i
 3. prema prostornom rasporedu kiselinskih ostataka oko nezasićene veze.

1. Prema broju ugljenikovih atoma masne kiseline se dele na:
 - a) masne kiseline kratkog lanca – broj ugljenikovih atoma do 8,
 - b) masne kiseline srednjeg lanca – broj ugljenikovih atoma od 8 do 14 i
 - c) masne kiseline dugačkog lanca – broj ugljenikovih atoma iznad 14.

2. Na osnovu odsustva, odnosno prisustva dvostrukih veza masne kiseline se dele na:
 - a) zasićene i
 - b) nezasićene, koje se dalje dele na:
 - mononezasićene – imaju jednu dvostruku vezu i
 - polinezasićene – imaju od dve do najviše šest dvostrukih veza.

3. Na osnovu geometrijske izomerizacije, odnosno prostorne orijentacije dela masnih kiselina oko nezasićene veze, masne kiseline se dele na:
- cis* masne kiseline i
 - trans* masne kiseline (slika 2.2.).

Najveći broj masnih kiselina ima svoj uobičajeni, trivijalni, naziv koji veoma često potiče od vrste masti u kojoj preovladava. Po IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) nomenklaturi svaka masna kiselina dobila je i sistematsko ime, prema ugljovodoniku sa istim brojem C-atoma, a u zavisnosti od broja dvostrukih veza u molekulu. Masne kiseline se u literaturi obično obeležavaju u skraćenom obliku, npr. 18:2 (9,12) je oznaka za linolnu kiselinu, pri čemu se prikazuje broj C atoma u molekulu i broj, položaj i konfiguracija dvostrukih veza. Podrazumeva se da su sve dvostruke veze u *cis* konfiguraciji, a ukoliko su prisutne dvostruke veze u *trans* konfiguraciji to je obavezno naznačeno (*t*, *tr* ili *trans*).



Slika 2.2. Oblik *cis* i *trans* dvostruke veze

2.3.1.1. Zasićene masne kiseline

Zasićene masne kiseline (saturated fatty acids, SFA) ne sadrže dvostruke veze, niti druge funkcionalne grupe duž lanca. Termin zasićene ukazuje na to da ugljenikovi atomi, pored međusobnih, grade veze samo sa vodonikom, (osim u COOH grupi). S obzirom na prave lance koje poseduju, vrlo gusto se pakuju i na taj način omogućavaju živim bićima da na manjem prostoru skladište veliku hemijsku energiju. Upravo zato imaju najveći udeo u masnom tkivu životinja.

Opšta formula zasićenih masnih kiselina je: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$.

U prirodnim uljima i mastima su najčešće prisutne zasićene masne kiseline sa 4 do 22 ugljenikova atoma. U tabeli 2.1. dat je prikaz najznačajnijih zasićenih masnih kiselina, kao i njihove formule, uobičajene oznake i tačke topljenja (Rac, 1964; Belitz *et al.*, 2009).

U mastima i uljima biljnog i animalnog porekla najzastupljenije su palmitinska i stearinska masna kiselina. Masne kiseline kratkog i srednjeg lanca (C_{4:0}–C_{12:0}), male molekulske mase, su konstituenti triglicerida samo u mastima mleka, kokosa i semena palme. Kao slobodne ili estarski vezane za alkohole male molekulske mase, u prirodi se javljaju u veoma malim količinama i to obično u biljnoj hrani i hrani proizvedenoj pod dejstvom mikroorganizama gde predstavljaju nosioce arome (Belitz *et al.*, 2009). Zasićene masne kiseline dugačkog lanca (>18:0) se javljaju u mahunastim plodovima kao što je kikiriki. Zasićene masne kiseline sa neparnim brojem C atoma, kao što je valerinska (5:0) ili enentinska (7:0) kiselina su u hrani prisutne samo u tragovima. Pentadekanska i margarinska kiselina se javljaju u mleku i mnogim biljnim uljima.

Tabela 2.1. Najznačajnije zasićene masne kiseline

Uobičajen naziv	Oznaka	Sistematsko ime	Formula	TT (°C)
buterna	C _{4:0}	n-butanska	CH ₃ –(CH ₂) ₂ –COOH	-7,9
kapronska	C _{6:0}	n-heksanska	CH ₃ –(CH ₂) ₄ –COOH	-3,4
kaprilna	C _{8:0}	n-oktanska	CH ₃ –(CH ₂) ₆ –COOH	16,7
kaprinska	C _{10:0}	n-dekanska	CH ₃ –(CH ₂) ₈ –COOH	31,6
laurinska	C _{12:0}	n-dodekanska	CH ₃ –(CH ₂) ₁₀ –COOH	44,2
miristinska	C _{14:0}	n-tetradekanska	CH ₃ –(CH ₂) ₁₂ –COOH	53,9
pentadekanska	C _{15:0}	n-pentadekanska	CH ₃ –(CH ₂) ₁₃ –COOH	52,1
palmitinska	C _{16:0}	n-heksadekanska	CH ₃ –(CH ₂) ₁₄ –COOH	63,1
margarinska	C _{17:0}	n-heptadekanska	CH ₃ –(CH ₂) ₁₅ –COOH	61,3
stearinska	C _{18:0}	n-oktadekanska	CH ₃ –(CH ₂) ₁₆ –COOH	69,6
arahinska	C _{20:0}	n-eikosanska	CH ₃ –(CH ₂) ₁₈ –COOH	75,3
behenska	C _{22:0}	n-dokosanska	CH ₃ –(CH ₂) ₂₀ –COOH	79,9
lignocerinska	C _{24:0}	n-tetrakosanska	CH ₃ –(CH ₂) ₂₂ –COOH	84,2
cerotinska	C _{26:0}	n-heksakosanska	CH ₃ –(CH ₂) ₂₄ –COOH	87,7

TT – tačka topljenja

2.3.1.2. Nezasićene masne kiseline

Nezasićene masne kiseline (unsaturated fatty acids, UFA) karakteriše prisustvo jedne ili više nezasićenih dvostrukih veza. Prisutne dvostruke veze su uglavnom u *cis* formi.

Zajednička formula za mononezasićene masne kiseline (monounsaturated fatty acids, MUFA) je $C_nH_{2n-2}O_2$, za nezasićene sa dve dvostruke veze $C_nH_{2n-4}O_2$, a za nezasićene sa tri dvostruke veze $C_nH_{2n-6}O_2$.

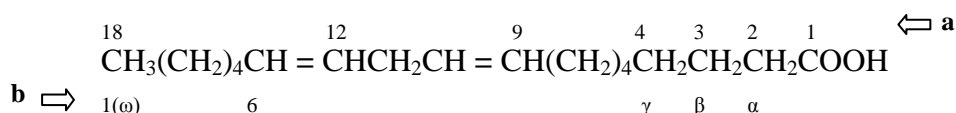
Dvostruke veze kod polinezasićenih masnih kiselina (polyunsaturated fatty acid, PUFA) mogu biti izolovane, odnosno nekonjugovane (između dvostrukih veza se nalazi jedna ili više metilenskih grupa) i konjugovane (dvostruke veze su u susednom položaju). U prirodnim mastima i uljima se gotovo isključivo nalaze nekonjugovane masne kiseline, dok se konjugovane masne kiseline mogu naći u manjim količinama u mlečnoj masti. Treba istaći da se u jednoj nezasićenoj masnoj kiselini dvostruka veza može nalaziti u različitim položajima, pri čemu na taj način nastaju različite varijante te kiseline.

Kako reaktivnost masnih kiselina, kao i triacilglicerola koji u svom sastavu imaju nezasićene masne kiseline, zavisi od broja i položaja dvostrukih veza, veoma je važno poznavanje stepena nezasićenosti i položaja dvostrukih veza masnih kiselina. Iz navedenog proizilazi da je veoma važno pravilno obeležavanje nezasićenih masnih kiselina.

Ugljenikovi atomi u nezasićenim masnim kiselinama se obeležavaju brojevima ili grčkim slovima, te se u literaturi najčešće primenjuje sledeći način obeležavanja (Dimić, 2005):

- obeležavanje po IUPAC-u, gde se položaj dvostruke veze računa od karboksilne grupe, tj. sa strane $-COOH$, ili
- biohemijsko obeležavanje – ECC (End of Carbon Chain), gde se položaj dvostruke veze računa od metil grupe, tj. sa strane $-CH_3$.

Na slici 2.3. dat je šematski prikaz obeležavanja nezasićenih masnih kiselina na primeru linolne kiseline.



a) obeležavanje prema IUPAC-u: **C_{18:2} cis 9,12**

b) biohemijsko obeležavanje: **C_{18:2} ω-6** ili **C_{18:2} n-6**

ω (omega) ili n se koristi za obeležavanje broja C atoma gde se nalazi prva nezasićena veza, pri čemu se broji od metil grupe.

Slika 2.3. Prikaz obeležavanja linolne kiseline

Mononezasićene masne kiseline nalaze se u većim količinama pre svega u prirodnim biljnim uljima, a potom i u životinjskim mastima. Najzastupljenija masna kiselina iz ove grupe je oleinska kiselina (C_{18:1}) koja se praktično nalazi u svim uljima i mastima. Polinezasićene masne kiseline se nalaze prvenstveno u biljnim i ribljim uljima, a najrasprostranjenija masna kiselina iz ove grupe je linolna.

U tabeli 2.2. dat je prikaz najznačajnijih nezasićenih masnih kiselina, kao i njihove formule, uobičajene oznake i tačke topljenja (Rac, 1964; Belitz *et al.*, 2009).

2.3.1.3. Esencijalne masne kiseline

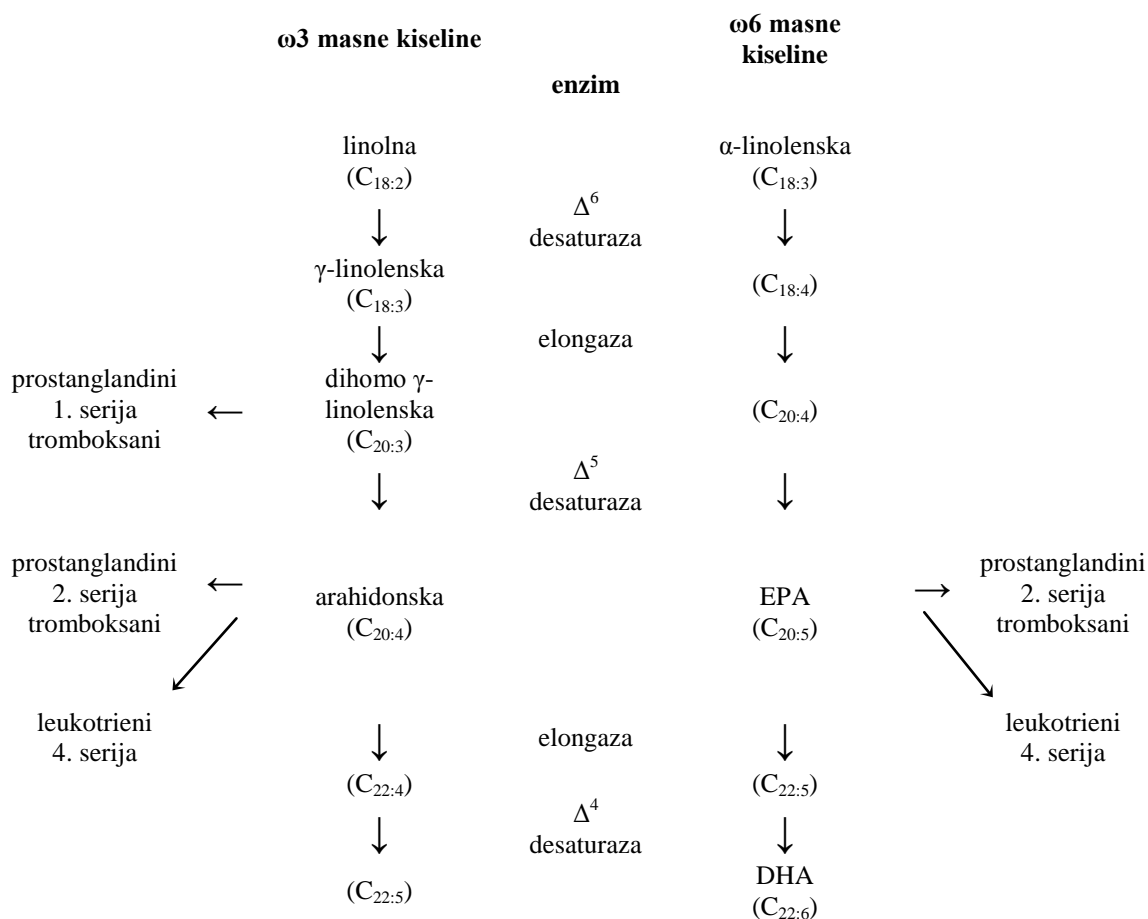
Esencijalne masne kiseline i njihovi derivati, kao što su triacilgliceroli, imaju nekoliko veoma bitnih funkcija u organizmu (Dimić, 2005):

- služe kao izvor energije,
- gradivni su elementi fosfolipida, strukturnih elemenata ćelijskih membrana,
- sastojci su lipoproteina krvne plazme i
- prekursori su važnih jedinjenja sa hormonskim dejstvom kao što su: prostaglandini, leukotrieni, tromboksani.

Esencijalne masne kiseline organizam ne može sintetisati, one se moraju unositi putem hrane, odnosno putem prirodnih ulja i masti. Ljudski organizam nije sposoban da sintetiše linolnu i α -linolensku kiselinu te one predstavljaju esencijalne masne kiseline. Linolna kiselina je najzastupljenija u biljnim uljima: ulje suncokreta (20–75%), sojino ulje (45–60%), ulje kukuruza (35–60%) i ulje šafrana (55–80%). α -linolenska kiselina se takođe nalazi u biljnim uljima, ali u manjim količinama u odnosu na linolnu. Ulja bogata linolenskom kiselinom su: sojino (4–11%), ulje uljane repice (5–15%) i laneno (50–60%) (Gunstone, 1996).

Unos esencijalnih masnih kiselina je neophodan u pravilnoj ishrani kako zbog njihovog primarnog metabolizma, tako i sa aspekta metabolizma lipoproteina plazme i sinteze pojedinih polinezasićenih masnih kiselina dugačkog lanca serije n-3 i n-6. Ove polinezasićene masne kiseline imaju različitu fiziološku ulogu i prekursori su hormonskih supstanci koje regulišu različite biohemijske procese u organizmu. Jedna od osnovnih funkcija esencijalnih masnih kiselina je njihova konverzija u metabolički aktivne prostaglandine i leukotriene (Akoh & Min, 1998). Naime, hranom unete linolna i α -linolenska masna kiselina transformišu se u organizmu u više nezasićene masne kiseline, te zajedno sa alimentarno (putem hrane) unetom arahidonskom kiselinom one postaju izvor velike serije različitih klasa prostaglandina i leukotriena. Njihova biosinteza se odigrava praktično u svim ćelijama, u kojima predstavljaju vrlo značajne komponente – ćelijske hormone, i imaju mnogobrojne, vrlo različite i specifične

uloge u organizmu. Na slici 2.4. je dat šematski prikaz transformacije esencijalnih masnih kiselina dejstvom enzimskog sistema u organizmu čoveka.



Slika 2.4. Biohemijska transformacija esencijalnih masnih kiselina

Usled nedostatka esencijalnih masnih kiselina u organizmu dolazi između ostalog do poremećaja rasta, promena na koži, gubitka težine, poremećaja u radu bubrega i jetre, agresije u ponašanju i depresije.

Među visokonezasićenim masnim kiselinama poseban značaj se pridaje ω-3 masnim kiselinama, posebno EPA i DHA kiselini. Naime, ustanovljeno je da ove kiseline snižavaju nivo lipida, posebno triglicerida u krvi, smanjuju sklonost zgrušavanju krvi, u blagoj meri snižavaju krvni pritisak, te ublažavaju proces ateroskleroze i koronarnih bolesti srca (Erkkilä *et al.*, 2008). Pored navedenog, neophodno je napomenuti da je veoma važno da organizam bude dobro snabdeven DHA, jer je ova masna kiselina gradivni element mozga i membrane fotoreceptora retine, te njen nedostatak izaziva ozbiljna oštećenja.

Tabela 2.2. Najznačajnije nezasićene masne kiseline

Uobičajen naziv	Oznaka	Sistematsko ime	Formula	TT (°C)
mononezasićene				
palmitooleinska	C _{16:1}	<i>cis</i> -9-heksadecenska	CH ₃ -(CH ₂) ₅ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH	0,5
oleinska	C _{18:1}	<i>cis</i> -9-oktadecenska	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH	16,3
elaidinska	C _{18:1} 19	<i>trans</i> -9-oktadecenska,	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH	46,5
vakcenska	C _{18:1} 11	<i>trans</i> -11-oktadecenska	CH ₃ -(CH ₂) ₅ -CH=CH-(CH ₂) ₉ -COOH	39,5
gadoleinska	C _{20:1}	<i>cis</i> -11-eikosenska	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₉ -COOH	23,5
eruka	C _{22:1}	<i>cis</i> -13-dokosenska	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₁₁ -COOH	33,5
polinezasićene				
linolna (ω-6)	C _{18:2}	<i>cis, cis</i> -9,12-oktadekadienska	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH	-0,5
α-linolenska (ALA) (ω-3)	C _{18:3}	<i>cis, cis, cis</i> -9,12,15-oktadekatrienska	CH ₃ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH	-11,0
γ-linolenska (GLA) (ω-6)	C _{18:3}	<i>cis, cis, cis</i> -6,9,12-oktadekatrienska	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₄ -COOH	
arahidonska (ω-6)	C _{20:4}	5,8,11,14-eikosatetraenska	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(CH=CH-CH ₂) ₄ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	-49,5
EPA (ω-3)	C _{20:5}	5,8,11,14,17-eikosapentaenska	CH ₃ -CH ₂ -(CH=CH-CH ₂) ₅ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	
DHA (ω-3)	C _{22:6}	4,7,10,13,16,19-dokosaheksaenska	CH ₃ -CH ₂ -(CH=CH-CH ₂) ₆ -CH ₂ -COOH	

Iako polinezasićene masne kiseline pokazuju mnogobrojna pozitivna dejstava, mora se napomenuti da su veoma sklone oksidaciji, kako u organizmu tako i van njega, usled čega dolazi do nastanka izuzetno reaktivnih slobodnih radikala i preko njih drugih štetnih produkata oksidacije. Slobodni radikali u organizmu mogu oštetiti ćelijske membrane kao i druge vitalne komponente ćelija (genetski materijal nukleusa), mogu inaktivirati pojedine enzime, što za posledicu ima pojavu raznih bolesti (Latta, 1991). Stoga se unošenje esencijalnih masnih kiselina u organizam mora povezati sa uzimanjem određenih količina vitamina E, biološkog antioksidansa.

2.3.2. Fizičke i hemijske karakteristike

2.3.2.1. Fizičke karakteristike

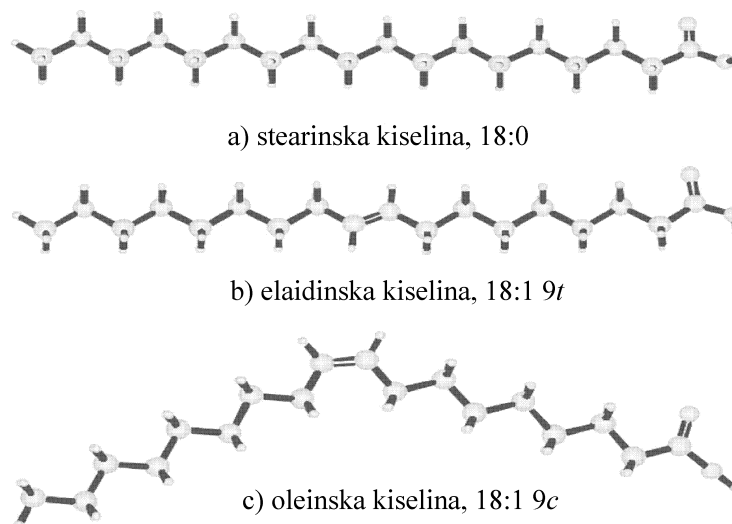
Masti imaju široku primenu u prehrambenoj industriji, a hrani, čiji su sastojak, daju odgovarajuću konzistenciju, topljivost i plastičnost. Pri tome, od njihovog sastava, količine i osobina zavisi tehnološki postupak koji se koristi u proizvodnji namirnica. Zbog toga se proučavanju fizičkih karakteristika masnih kiselina poklanja velika pažnja. Fizičke karakteristike masti i ulja zavise od stepena nezasićenosti, dužine ugljeničnog lanca, oblika izomera masnih kiselina, molekulske konfiguracije, kao i uslova proizvodnje.

Viskozitet, koji predstavlja meru unutrašnjeg trenja molekula, lagano opada sa povećanjem broja nezasićenih veza u molekulima masnih kiselina. Ulja koja sadrže masne kiseline sa malom molekulskom masom manje su viskozna od ulja sa masnim kiselinama veće molekulske mase, istog stepena nezasićenosti.

Površinski napon masnih kiselina raste sa porastom dužine ugljovodoničnog lanca, a opada sa porastom temperature (Shahidi, 2005).

Tačka topljenja zasićenih masnih kiselina raste sa porastom broja ugljenikovih atoma, odnosno dužinom lanca (Tabela 2.1). Tačka topljenja nezasićenih masnih kiselina zavisi od broja, položaja i konformacije dvostrukih veza. Tako na primer, mononezasićena oleinska kiselina i njen geometrijski izomer elaidinska kiselina imaju različite tačke topljenja (Tabela 2.2). Oleinska kiselina je tečna na temperaturi bliskoj sobnoj, dok je elaidinska u čvrstom agregatnom stanju čak i na temperaturama iznad sobne. Ove razlike su uslovljene pre svega geometrijom molekula. Molekuli zasićenih masnih kiselina su linearni što im omogućava gusto pakovanje. Za razliku od njih, molekuli *cis*-nezasićenih masnih kiselina su uvijeni, uvijenost raste sa brojem nezasićenih veza, te se molekuli nalaze na većem rastojanju. Kod *trans* konfiguracije molekuli su pretežno linearni, ili slabo uvijeni, te je omogućeno gusto pakovanje

kao i kod zasićenih masnih kiselina. Slika 2.5. prikazuje razlike u prostornoj strukturi zasićenih i *cis*- i *trans*- oblika nezasićenih masnih kiselina.



Slika 2.5. Prostorna orijentacija zasićenih i *cis* i *trans* oblika nezasićenih masnih kiselina

Masne kiseline sa većim brojem ugljenikovih atoma su praktično nerastvorne u vodi. One u vodenoj sredini obrazuju micide kod kojih je negativno naelektrisan COO⁻ kraj okrenut ka vodi, a nepolaran ugljovodonični niz ka unutrašnjosti micide. Posmatrano u celini, micide su uglavnom negativno naelektrisane i u rastvoru ostaju u suspendovanom stanju, jer se međusobno odbijaju.

Na temperaturama višim od temperature topljenja, masne kiseline se mešaju sa mnogim organskim rastvaračima: ugljovodonicima, etrima, estrima, ketonima i dr. Rastvorljivost masti u organskim rastvaračima opada sa sniženjem temperature i porastom dužine ugljovodoničnog lanca, a raste sa povećanjem broja dvostrukih veza.

Dielektrična konstanta masnih kiselina raste sa porastom broja dvostrukih veza, a opada sa porastom temperature (Shahidi, 2005). Određivanje dielektrične konstante može da posluži za kontrolu procesa proizvodnje i kvaliteta proizvoda koji sadrže vodu, jer ova veličina zavisi od količine vode u njima i strukture emulzije.

Indeks prelamanja svetlosti masti i masnih kiselina raste sa porastom dužine ugljovodoničnog lanca, broja dvostrukih veza i konjugacije. U praksi se koristi za identifikaciju i određivanje čistoće.

Sve nezasićene masne kiseline koje sadrže izolovanu *cis* dvostruku vezu apsorbuju UV zračenje na talasnoj dužini oko 190 nm. Konjugovane masne kiseline apsorbuju zračenje na različitim talasnim dužinama u zavisnosti od položaja dvostruke veze i dužine konjugacije (konjugovani dieni – 232 nm, konjugovani trieni – 270 nm, konjugovani tetraeni – 308 nm). Kako prirodne masti i ulja uglavnom ne sadrže konjugovane veze, a u toku oksidacije masti dolazi do pojave konjugovanih veza, merenjem apsorpcije UV zračenja se u praksi koristi za određivanje stepena nastalih autooksidacionih promena (Oštrić-Matijašević & Turkulov, 1980).

2.3.2.2. *Hemijske karakteristike*

Hemijske karakteristike, kao i hemijske reakcije kojima podležu masti, zavise prvenstveno od dužine lanca i stepena nezasićenosti masnih kiselina od kojih su sastavljene. Reaktivnost nezasićenih masnih kiselina je određena položajem i brojem dvostrukih veza. Ukoliko su dve nezasićene veze bliže jedna drugoj, masna kiselina pokazuje veću reaktivnost. Hemijske reakcije masti i masnih kiselina mogu se podeliti, u zavisnosti od toga gde dolazi do reakcije, u dve grupe:

1. reakcije na estarskoj vezi i karboksilnoj grupi i
2. reakcije u lancu masne kiseline.

2.3.2.2.1. *Reakcije na estarskoj vezi i karboksilnoj grupi*

U ovu grupu reakcija spada više fundamentalnih hemijskih reakcija bitnih za poznavanje sastava i kvaliteta masti među kojima su: hidroliza, saponifikacija, esterifikacija i druge.

U prisustvu vode masti se hidrolizuju, odnosno dolazi do razgradnje estarske veze pri čemu nastaju slobodne masne kiseline i glicerol. Bez prisustva katalizatora hidroliza se odvija sporo i reverzibilno. U industriji se proces ubrzava dodatkom kiseline, katalizatora, povišenom temperaturom i pritiskom. Ukoliko se hidroliza izvodi u prisustvu baza dolazi do saponifikacije, odnosno nastanka alkalnih soli – sapuna.

Esterifikacija je proces suprotan hidrolizi kod kog dolazi do reakcije između alkohola i masne kiseline uz izdvajanje vode. Interesterifikacija podrazumeva reakcije na estarskoj vezi i može se podeliti na tri tipa: alkoholiozu – dolazi do zamene alkoholnog dela estra; acidolizu – dolazi do zamene kiselinskog dela estra i izmenu estara (Rac, 1964). Iako interesterifikacija podrazumeva navedene reakcije, najčešće se za samu izmenu estara koristi termin interesterifikacija. Kako izmena estara masnih kiselina u molekulima glicerida uslovljava promenu fizičkih osobina masti, proces interesterifikacije se koristi kao jedan od tehnoloških

procesa za obradu masti kako bi se dobile visokokvalitetne masti koje će zadovoljiti potrebe prehrambene industrije.

Na povišenom pritisku i uz metalni katalizator, masne kiseline reaguju sa vodonikom i prelaze u alifatične alkohole. Tretiranjem masnih kiselina amonijakom ili aminima na povišenoj temperaturi, dobijaju se amidi tih kiselina.

2.3.2.2.2. Reakcije u lancu masne kiseline

U ovoj grupi su najzastupljenije reakcije kod kojih dolazi do adicije na nezasićenu vezu u lancu masne kiseline, iako se ne mogu zanemariti ni reakcije supstitucije vodonikovog atoma sa drugim atomima ili atomskim grupama u lancu zasićenih masnih kiselina. Najznačajnije reakcije iz ove grupe su hidrogenacija i autooksidacija. Hidrogenacija, vezivanje vodonika na dvostruke veze masnih kiselina, je veoma važan proces koji se u industriji koristi za dobijanje različitih vrsta čvrstih masti iz tečnih ulja.

Masne kiseline podležu autooksidaciji i na sobnim temperaturama, pri čemu se razlažu na ketone, aldehide i manje količine epoksida i alkohola, a može doći i do polimerizacije, odnosno nastaka većih molekula. Kako reakcije oksidacije imaju za posledicu pojavu stranog i neprijatnog mirisa, svrstavaju se u reakcije koje prouzrokuju kvarenje masti. U cilju sprečavanja autooksidacije u masti i ulja se dodaju različiti prirodni (β -karoten, tokoferoli, sezamol, karnozolna kiselina i dr.) i sintetski (butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT), propil galat i dr.) antioksidanti.

2.4. *Trans* masne kiseline

Trans masne kiseline predstavljaju nezasićene masne kiseline kod kojih se bar jedna dvostruka veza nalazi u *trans* konfiguraciji, odnosno vodonikovi atomi se nalaze na suprotnim stranama ugljenikovih atoma, za razliku od *cis* konfiguracije kod koje su vodonikovi atomi sa iste strane ugljenikovih atoma (Slika 2.2.).

2.4.1. Nastanak *trans* masnih kiselina

Trans masne kiseline mogu nastati prirodnim putem procesom biohidrogenacije u telu preživara, i tokom procesa parcijalne hidrogenacije biljnih i ribljih ulja (Frissche & Steinhart, 1998). Male količine *trans* masnih kiselina mogu se naći i u nekim biljkama: naru, grašku i

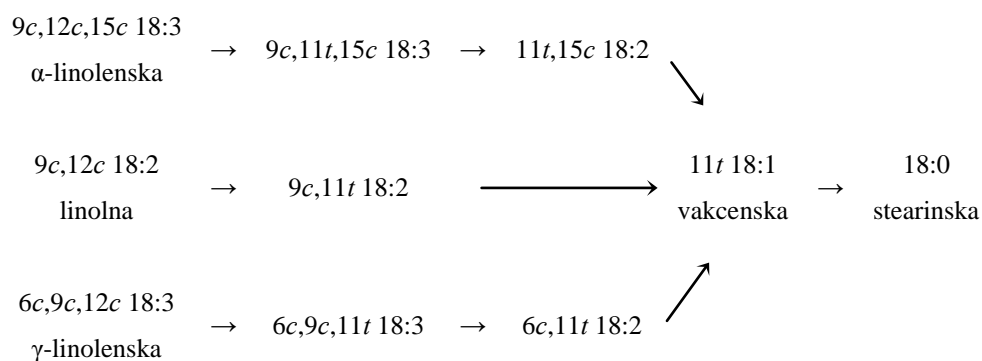
kupusu (Doyle, 1997). Termički tretmani masti i ulja kao što su deodorizacija, kuvanje, prženje i dr., takođe mogu dovesti do stvaranja *trans* izomera (Ledoux *et al.*, 2007).

2.4.1.1. Proces nastajanja *trans* masnih kiselina u telu preživara

Trans masne kiseline nastaju prirodnim putem u buragu preživara procesom bakterijske hidrogenacije koja je katalisana anaerobnom bakterijom *Butyrivibrio fibrosolvens*. Polinezasićene masne kiseline unete hranom se biohidrogenacijom u buragu preživara pod dejstvom bakterijskih enzima različitim putevima transformišu do nezasićenih i zasićenih masnih kiselina (Slika 2.6.) (Ledoux *et al.*, 2007). Novija istraživanja su pokazala da se i oleinska kiselina u buragu transformiše do *trans* 18:1 masnih kiselina (Mosley *et al.*, 2002).

Porast udela polinezasićenih masnih kiselina u ishrani preživara dovodi do porasta svih ostalih masnih kiselina koje iz njih nastaju metaboličkim putem, pri čemu naročito raste udeo *trans* 18:1 masnih kiselina, dok je dalja transformacija do stearinske kiseline veoma spora i ograničena.

Trans masne kiseline nastale tokom biohidrogenacije u buragu preživara bivaju apsorbovane, te se dalje prenose u ćelije, uključujući mamarne žlezde, i pod dejstvom Δ^9 -desaturaze podležu daljim enzimatskim reakcijama. Gotovo sve *trans* 18:1 masne kiseline podležu desaturaciji pod dejstvom Δ^9 -desaturaze *in vitro* (izuzetak su *8t*, *9t* i *10t* izomeri) pri čemu nastaju izomeri 18:2 masne kiseline kao što su: *9c*, *11t*; *7t*, *9c*; *9c,12t*; *9c,13t* (Pollard *et al.*, 1980).



Slika 2.6. Osnovni putevi biohidrogenacije nezasićenih masnih kiselina u buragu preživara

U grupi *trans* 18:1 masnih kiselina koje nastaju u telu preživara dominantna je vakkenska masna kiselina (*11 t* 18:1) sa udelom od oko 35–50% u odnosu na ukupne *trans* 18:1 masne kiseline (Ledoux *et al.*, 2007).

U mlečnoj masti se mogu naći i male količine *trans* izomera drugih masnih kiselina, kao što su 16:1 i 20:1 (Precht & Molquentin, 2000a).

Način ishrane životinja utiče na formiranje TFA na različite načine. Organski uzgoj krava značajno povećava sadržaj TFA u mleku, u odnosu na tradicionalan način uzgoja. Takođe se primećuje porast količine vakcenske kiseline tokom letnjih meseci. Ovo se objašnjava povećanim unosom sveže trave sa pašnjaka, koja je bogata polinezasićenim masnim kiselinama. Od skoro se fenomen depresije mlečne masti (milk fatt depression – MFD) povezuje sa porastom količine *trans* C18:1 kiseline u mlečnoj masti (Griinari *et al.*, 1998).

Sadržaj TFA u mleku, mlečnim proizvodima i mesu se kreće u opsegu od oko 1–9% (Aro *et al.*, 1998a).

2.4.1.2. Postupak nastajanja *trans* masnih kiselina industrijskom parcijalnom hidrogenacijom

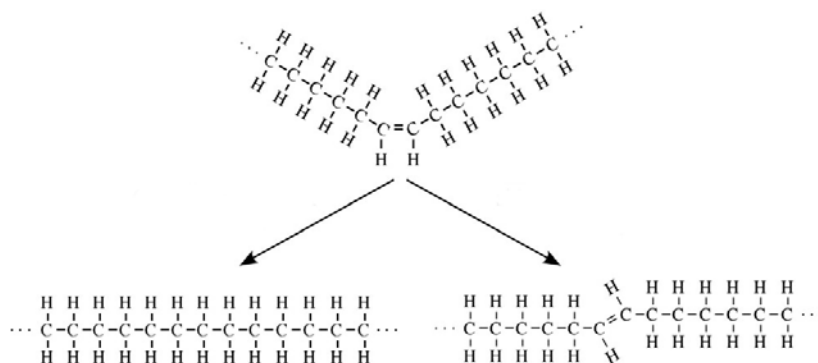
Hidrogenacija je primer heterogenog kataličkog procesa kod kog se u kontaktu nalaze tečno ulje, gasovit vodonik i čvrst katalizator. Sabatier i saradnici su 1897. godine eksperimentalno utvrdili da se etilenske veze mogu redukovati u svoje zasićene homologe ukoliko su izložene, uz odgovarajuće uslove, delovanju vodonika (Oštrić-Matijašević & Turkulov, 1980). Od tada se proces hidrogenacije izučava jer tok procesa, redosled adicije vodonika na dvostruke veze (poli- i mononezasićenih kiselina) zavisi od uslova rada. Ukoliko se prvo zasićuju masne kiseline sa najvećim brojem dvostrukih veza i tek kada su sve prevedene u mononezasićene, dolazi do stvaranja zasićenih masnih kiselina, hidrogenacija je selektivna. Ovu reakciju prati: premeštanje položaja dvostruke veze i stvaranje pozicionih izomera masnih kiselina i geometrijskih izomera *trans* masnih kiselina. Ukoliko hidrogenacija nije potpuna (do zasićenja svih dvostrukih veza) i prekida se ranije, u mastima će se naći i ove nove masne kiseline. Podešavanjem reakcionih parametara u procesu industrijske hidrogenacije kao što su: koncentracija katalizatora, pritisak, temperatura i agitacija, može se uticati na sadržaj TFA. Na primer, veće količine *trans* izomera nastaju pri primenjenim nižim pritiscima (100–200 kPa), višim temperaturama (200–215°C) i sadržaju katalizatora (nikla) 0,005%, dok se znatno manje količine TFA, ali uz veću konverziju dvostrukih u zasićene veze, dobijaju primenom viših pritisaka (300 kPa), nižih temperatura (165–180°C) i nešto višu koncentraciju katalizatora (0,008%) (Tarrango-Trani *et al.*, 2006).

Prilikom parcijalne hidrogenacije oleiske kiseline nastaju sledeće masne kiseline: stearinska, elaidinska i pozicioni izomeri oleinske kiseline, dok iz linolne kiseline nastaje još veći broj novih masnih kiselina među kojima su i masne kiseline sa konjugovanim dienima koje

se dalje redukuju u monoene. Na slici 2.7. je dat šematski prikaz nastajanja zasićenih i *trans* veza tokom hidrogenacije.

Proces hidrogenacije je našao veliku primenu u prehrambenoj industriji jer omogućava da se iz jedne vrste masti uz različite uslove rada dobiju masti različitog sastava, kozistencije i veće oksidacione i termičke stabilnosti.

Sadržaj *trans* masnih kiselina u mastima dobijenim parcijalnom hidrogenacijom dostiže čak 60% u odnosu na ukupne masne kiseline (Stender *et al.*, 2006). Wolff i saradnici (2000) su ustanovili da je dominantna *trans* masna kiselina u parcijalno hidrogenovanim biljnim uljima elaidinska kiselina (18:1 9t), čiji se udeo kreće u veoma širokom opsegu (15–46%), dok je prosečan udeo vaskenske kiseline oko 13%. U parcijalno hidrogenovanim biljnim uljima su prisutni i *trans* izomeri linolne i linolenske kiseline. Parcijalno hidrogenovana riblja ulja sadrže *trans* izomere masnih kiselina: 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, kao i druge TFA dugog lanca (Aro *et al.*, 1998b).



Slika 2.7. Šematski prikaz nastajanja zasićenih i *trans* veza tokom hidrogenacije

2.4.2. Uticaj *trans* masnih kiselina na ljudski organizam

Od početka druge polovine prošlog veka poznata je direktna povezanost između količine i vrste alimentarno unetih masti, odnosno unosa pojedinih vrsta masnih kiselina i samog holesterola, sa jedne strane, i nivoa serumskog holesterola i ubrzanog razvitka ateroskleroze i nastanka kardiovaskularnih oboljenja, sa druge strane. Najpre je to ustanovljeno za sam holesterol iz hrane, a nešto kasnije i za određene zasićene masne kiseline: laurinsku, miristinsku i palmitinsku. Početkom devedesetih godina prošlog veka u žižu istraživačkog interesa dospeli su *trans* izomeri nezasićenih masnih kiselina i njihov uticaj na proces aterogeneze, a taj interes je i danas izuzetno velik (Hornstra 1999; Oomen *et al.*, 2001; Stender & Dyerberg, 2003; Pfeuffer & Schrezenmeir, 2006).

Iako nisu uvek direktni izazivači, TFA utiču na nastanak i razvoj različitih poremećaja u organizmu.

Trans masne kiseline dovode do značajnog porasta ukupnog i LDL holesterola, kao i vrlo ateregenog lipoproteina (a), a snižavaju nivo HDL holesterola (Mensink & Katan, 1990; Zock & Katan, 1992; Judd *et al.*, 1994; Aro *et al.*, 1997; Lichtenstein *et al.*, 1999; Gatto *et al.*, 2003; Acherio, 2006; Müller *et al.*, 2001). Takođe nepovoljno utiču i na trigliceride, povišavajući njihovu koncentraciju u krvi (Lichtenstein, 2000; Steihart *et al.*, 2003). Uticaj *trans* izomera masnih kiselina na vrednosti krvnih lipida i lipoproteina čak je nepovoljniji od efekata zasićenih masnih kiselina. Zasićene masne kiseline za razliku od TFA, ne menjaju koncentracije lipoproteina (a) i triglicerida, a donekle povišavaju nivo protektivnog HDL holesterola, dok su efekti *trans* izomera i na ove lipidne frakcije nepovoljniji i menjaju ih u smislu aterogenog lipidnog profila (Crupkin & Zambelli, 2008; Steihart *et al.*, 2003; Ascherio, 2006; Gatto *et al.*, 2003). Ustanovljeno je da gram na gram *trans* izomera masnih kiselina, u poređenju sa uzimanjem zasićenih masnih kiselina, ima čak deset puta veći štetan uticaj na razvitak bolesti srca i krvnih sudova (Stender & Dyerberg, 2004).

Osim negativnih efekata TFA na kardiovaskularni sistem, *trans* masne kiseline su dovedene i u vezu sa razvojem nekih karcinoma, dijabetesa tipa 2, alergijama i astmom kod dece i trombozama (Stender & Dyerberg, 2003), ali još uvek ne postoje sigurni dokazi koji bi ovo potvrdili. Ustanovljeno je da TFA kiseline remete metabolizam esencijalnih masnih kiselina, a u najranijem uzrastu postoji izuzetno velika potreba za esencijalnim masnim kiselinama s obzirom na ubrzani rast i razvoj organa i tkiva (Hornstra, 2000; Claig-Schmidt, 2001). *Trans* izomeri masnih kiselina takođe nepovoljno deluju na hemostazne mehanizme (Lichtenstein, 2000; Stender *et al.*, 2006; Ascherio, 2006), a zamena zasićenih masnih kiselina *trans* izomerima dovodi i do poremećaja endotelne funkcije zdravih ispitanika (de Roos *et al.*, 2001; Stender & Dyerberg, 2004).

Posebnu grupu *trans* masnih kiselina predstavljaju konjugati linolne kiseline (CLA – conjugated linolenic acid). Nalaze se u malim količinama u masnim frakcijama mesa, mleka i mlečnih proizvoda, a od skoro postaju vrlo interesantni, zbog pozitivnih efekata po ljudsko zdravlje. Naime, eksperimenti na životinjama su pokazali da CLA izomeri dovode do snižavanja ukupnog i LDL holesterola i triglicerida, što ima za posledicu smanjivanje indeksa ateroskleroze (Lee *et al.*, 1994; Nikolosi *et al.*, 1997). Pored antiaterogenog, CLA pokazuju i antikancerogeni efekat (Ip & Thompson, 1994). Dokazano je da se lekovito dejstvo strogo povezuje sa pojedinim izomerima, pa tako *cis*9, *trans*12 CLA sprečava procese koji vode ka aterosklerozi, dijabetesu, hroničnim upalama i karcinomu. Sa druge strane, izomer *trans*10, *cis*12 CLA poseduje negativan zdravstveni efekat u indukcionom periodu dijabetesa (Léger *et al.*, 2007).

CLA kiseline mogu menjati odnos masnog i nemasnog tkiva u organizmu, čime redukuju akumulaciju masti.

S obzirom da su mnogobrojne studije pokazale da zasićene i *trans* masne kiseline štetno deluju na ljudsko zdravlje, Svetska zdravstvena organizacija (WHO, 2003) preporučuje da ukupni unos masti ne bude veći od 30%, a udeo zasićenih masnih kiselina manji od 10% dnevno potrebne energije (po poslednjim preporukama čak ispod 7%). U cilju prevencije kardiovaskularnih oboljenja TFA su ograničene na manje od 1% dnevno potrebne energije.

2.4.3. Zakonska regulativa

Nova saznanja o dejstvu *trans* izomera masnih kiselina na zdravlje ljudi dovela su do pojave zahteva da se nivo TFA strogo kontroliše i smanji u najvećoj mogućoj meri, te je u mnogim zemljama uvedena zakonska regulativa o obaveznom deklarisanju sadržaja TFA na prehrambenim proizvodima.

Danska je 2003. godine postala prva zemlja u svetu koja je donela zakon o maksimalno dozvoljenom sadržaju TFA u hrani. Ovom zakonu podležu ulja i masti, uključujući emulzije sa kontinualnom masnom fazom, a namenjene su ljudskoj ishrani, bilo da predstavljaju namirnicu, ili komponentu u proizvodnji hrane. Zakon se ne odnosi na proizvode životinjskog porekla sa prirodno većim količinama TFA (meso, mleko) i proizvode čiji je sastav regulisan drugim zakonima. Prema aneksu 1 ovog zakona, TFA definisane su kao suma svih izomera masnih kiselina sa 14, 16, 18, 20 i 22 ugljenikova atoma i jednom, ili više *trans* dvostrukih veza. Zabranjuje se prodaja svih navedenih proizvoda koji sadrže: više od 2% TFA u odnosu na ukupnu količinu masti, za direktnu upotrebu u ljudskoj ishrani; više od 5% za masti koje se koriste za industrijsku proizvodnju hrane, u restoranima, pekarskoj proizvodnji i više od 1% ukoliko su proizvodi obeleženi „bez TFA“ (www.tfx.org.uk/page116.html).

U Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama je od 1. januara 2006. godine na snazi zakon o obaveznom deklarisanju sadržaja *trans* masti na prehrambenim proizvodima. TFA su definisane kao suma svih nezasićenih masnih kiselina koje sadrže jednu ili više izolovanih nekonjugovanih dvostrukih veza u *trans* geometrijskoj konfiguraciji. U Sjedinjenim američkim državama se namirnicama bez TFA (*trans* fat free) mogu nazvati one, koje sadrže manje od 0,5 g TFA i 0,5 g zasićenih masti na 100 g namirnice, dok se u Kanadi namirnicama bez TFA mogu nazvati one, koje sadrže manje od 0,2 g TFA i 0,2 g zasićenih masti na 100 g namirnice (Mossoba *et al.*, 2007).

U Evropskoj Uniji podnet je zahtev da se nivo i sastav masti u hrani reguliše aneksom od maja 2006., koji je u skladu sa nutricionističkim saznanjima. Prema njemu je hrana sa niskim sadržajem zasićenih masti (low fat) ona koja sadrži manje zasićenih i *trans* masti (zbirno) od 1,5 g/100 g u čvrstim i manje od 0,75 g/100 ml u tečnim namirnicama. Bez zasićenih masti (saturated fat free) je ona hrana koja ne sadrži više od 0,1g TFA i zasićenih masti po 100 g ili 100 ml proizvoda (www.foodlaw.rdg.ac.uk/news/eu-06044.htm).

Neke zemlje, uključujući Argentinu, Brazil, Paragvaj, Urugvaj, Australiju i Novi Zeland, su tokom 2006. godine donele deklaraciju o sadržaju *trans* masti u hrani (Mossoba *et al.*, 2007).

Srbija nije zakonski regulisala nivo *trans*, kao ni zasićenih masnih kiselina u namirnicama.

2.4.4. Masti sa smanjenim sadržajem *trans* masnih kiselina

Trans masne kiseline u velikoj meri utiču na tačku topljenja, oksidacionu stabilnost, strukturne i senzorne karakteristike proizvoda u kojima se nalaze. Sa druge strane, kao što je već rečeno, TFA imaju negativan uticaj na zdravstveno stanje ljudi te su u nekim zemljama uvedene nove zakonske regulative vezane za deklarisanje sadržaja *trans* masti u prehrambenim proizvodima. Stoga prehrambena industrija mora pokušati da smanji sadržaj TFA reformulacijom masti uz istovremeno zadržavanje strukturnih i senzornih karakteristika gotovog proizvoda, što nije ni malo lak zadatak.

Razvijeni su brojni tehnološki postupci za dobijanje masti sa manjim sadržajem TFA koji se koriste u prehrambenoj i industriji jestivih ulja i masti, s tim što je cena ovih proizvoda najčešće viša u odnosu na cenu masti dobijenih primenom postupka parcijalne hidrogenacije.

Neki od razvijenih alternativnih postupaka za dobijanje masti sa manjim sadržajem *trans* masti su (Tarrango-Trani *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2005; Petrauskaite *et al.*, 1998; Khatoon *et al.*, 2005): upotreba prirodno stabilnih masti i ulja, interesterifikacija i mešanje masti, modifikovani postupak parcijalne hidrogenacije i proizvodnja uljarica sa izmenjenim sastavom masnih kiselina kroz tehnike uzgajanja biljaka i genetski inženjering.

Međutim, mnogi proizvodi sa smanjenim sadržajem *trans* masti sadrže velike količine zasićenih masnih kiselina (posebno lurske, miristinske i palmitinske), koje takođe negativno utiču na zdravlje. Proizvođači moraju težiti dobijanju proizvoda odgovarajućeg masnokiselinskog sastava, a ne samo jednostavnom smanjenju *trans* izomera.

Osnovni tehnički problemi proizvoda dobijenih novim metodama, vezuju se za njihovu stabilnost, koja je slabija, u odnosu na produkte dobijene parcijalnom hidrogenacijom.

Oksidativna stabilnost je značajno smanjena, pa je neophodna zaštita odgovarajućim materijalima za pakovanje i antioksidansima (Nielsen, 2006).

2.4.5. Prisustvo *trans* masnih kiselina u namirnicama

Trans masne kiseline u čovekov organizam dospevaju putem hrane. Prirodno se nalaze u mleku, mlečnim proizvodima, mesu i masnom tkivu preživara. Svega 2 do 8 % *trans* masnih kiselina unetih hranom potiče iz mlečnih produkata. Mnogo veći izvori ovih jedinjenja su hidrogenovana biljna ulja, koja se široko koriste u industriji brze hrane, polugotovih jela, pržene hrane, konditorskih i pekarskih proizvoda i dr.

Ilustracije radi, u tabeli 2.3. je dat prikaz sadržaja ukupnih *trans* masnih kiselina u različitim prehrambenim proizvodima (McDonald & Mossoba, 1997).

Tabela 2.3. Sadržaj ukupnih TFA u različitim prehrambenim proizvodima

Vrsta namirnice	Sadržaj TFA (%)
Margarini	0,4–49
Namenske masti	34–42
Ulja	0–1,5
Kolači	10–13
Različite vrste keksa	4–36
Hamburger	3–5
Krompirov čips	0–40
Pomfrit	3–34
Puter	2–7
Mleko	2,7–3,4

Tendencija proizvođača hrane danas je da namirnice uopšte ne sadrže TFA. Najčešće sa smanjenjem sadržaja TFA u prehrambenim proizvodima dolazi do drastičnog porasta nivoa zasićenih masnih kiselina, dok se sadržaj *cis*-nezasićenih masnih kiselina smanjuje (van Poppel *et al.*, 1998). Ne može se reći da je ovo rešenje ispravno, s obzirom na negativna dejstva koja SFA pokazuju. Zbog toga naučnici u prehrambenoj industriji insistiraju da se sadržaj ove dve grupe kiselina zbirno prikazuje. Ne treba težiti proizvodnji namirnica bez TFA, nego bi mnogo pravilnije bilo da se balansira unos "lakih" (*cis* mono- i polinezasićenih kiselina) i "teških" masnih kiselina (SFA i TFA). Preporučeni odnos "lakih" i "teških" masti je 2 : 1.

Količina alimentarno unetih TFA varira u zavisnosti od geografskog područja. Podaci Craig-Schmidt-a (Craig-Schmidt, 2006) pokazuju da je prosečan unos TFA znatno viši u severnoevropskim zemljama u odnosu na mediteranske zemlje u kojima se uobičajeno koristi maslinovo ulje. Unos TFA u Francuskoj je relativno nizak s obzirom da se mnogo više koriste masti preživara nego hidrogenovana biljna ulja. Studija (Van Poppel *et al.*, 1998) koja je obuhvatila 14 evropskih zemalja je pokazala da se prosečan unos *trans* masti u većini evropskih zemalja kreće od minimalnih 1,4 g/danu (0,6% energije) u Grčkoj, 1,6 g/danu (0,6% energije) u Portugaliji, 1,6 g/danu (0,5% energije) u Italiji, 2,1 g/danu (0,7% energije) u Španiji, 2,1 g/danu (0,9% energije) u Finskoj, 2,2 g/danu (0,8% energije) u Nemačkoj, 2,3 g/danu (1,2% energije) u Francuskoj, 2,6 g/danu (1,1% energije) u Švedskoj, 2,6 g/danu (1,0% energije) u Danskoj, 2,8 g/danu (1,3% energije) u Velikoj Britaniji, 4,0 g/danu (1,3% energije) u Norveškoj, 4,1 g/danu (1,4% energije) u Belgiji, 4,3 g/danu (1,6% energije) u Holandiji, do maksimalnih 5,4 g/danu (2,0% energije) u Irskoj. Unos *trans* masnih kiselina putem mleka, mlečnih proizvoda i mesa nije prelazio 2 g/danu ni u jednoj od 14 zemalja koje su bile uključene u studiju, te je zaključak da je neophodno smanjiti sadržaj TFA u prehrambenim proizvodima kao što su pekarski i konditorski proizvodi, brza hrana i hidrogenovane masti i ulja.

Podaci Stender-a i saradnika (Stender *et al.*, 2006) pokazuju da je unos *trans* masti u Danskoj značajno smanjen u periodu od 2001. do 2005. godine zahvaljujući zakonskoj regulativi.

Podataka o sadržaju *trans* masnih kiselina u prehrambenim proizvodima, a samim tim ni o njihovom prosečnom unosu, u našoj zemlji još uvek nema.

2.4.6. Metodologija određivanja *trans* masnih kiselina

Analitika masnih kiselina široko se primenjuje u prehrambenoj industriji, biohemijskim i medicinskim ispitivanjima. Na osnovu dobijenih rezultata definiše se kvalitet sirovina i gotovih proizvoda, zatim tehnološki procesi i dobijaju se podaci o metabolizmu masti, kao i njihovom uticaju na zdravlje.

Analitičke metode koje se koriste, dele se u četiri grupe: senzorne, hemijske, biohemijske i instrumentalne metode analize.

Senzorne metode se najčešće koriste da bi se ocenio kvalitet proizvoda (ili njegova promena) i priyatnost, odnosno prihvatljivost namirnice. Ocenu kvaliteta obavljaju obučeni stručnjaci, dok se priyatnost ocenjuje od strane potrošača.

Hemijske metode imaju trostruki značaj. Prvenstveno se koriste za pogonsku kontrolu, zbog čega je veliki broj svrstan u standardne metode propisane našim i internacionalnim

standardima. Dalje, one predstavljaju osnovu za primenu instrumentalnih metoda i na kraju, koriste se za pripremu uzoraka koja prethodi analiziranju željenog materijala.

Biohemijske metode obavljaju se *in vivo*, kada se u analizi koriste kompletni organizmi, ili *in vitro*, kada se koriste izolovani enzimi.

Instrumentalne metode imaju specifičan značaj u analitici, s obzirom da daju potpuni uvid u sastav i sadržaj pojedinih masnih kiselina u mastima.

U analitici *trans* masnih kiselina najrasprostranjenije su hromatografske i spektroskopske metode. Od hromatografskih metoda koriste se gasna hromatografija (GC), visokopritisna tečna hromatografija (HPLC) na obrnutim fazama i hromatografija sa adsorbensom impregniranim srebrnim jonima (Ag^+ hromatografija). Od spektroskopskih metoda u upotrebi su klasična infracrvena (IR) spektroskopija, kao i novije tehnike, FTIR (Fourier Transform InfraRed), Ramanove, UV i NMR spektroskopije (Christie, 1989; Nikolova-Damyanova, 1992; Mossoba *et al.*, 2007; Delmonte & Rader, 2007).

HPLC tehnikom na obrnutim fazama postiže se dobro razdvajanje geometrijskih i nekih pozicionih izomera masnih kiselina. Osnovni problem kod razvoja ovih uređaja je odabir odgovarajućeg detektora. Pri analizi realnih uzoraka, može doći do preklapanja pikova, naročito ako su u pitanju kompleksne smeše sa velikim brojem komponenata (Christie, 1989). Ova tehnika se najčešće koristi u cilju pripreme uzoraka za analizu, odnosno razdvajanje pojedinih frakcija koje se dalje analiziraju primenom kapilarne gasne hromatografije (Juanéda *et al.*, 2007).

Ag^+ hromatografija se bazira na specifičnoj osobini nezasićenih organskih jedinjenja da grade komplekse jonoizmenjivačkog tipa sa prelaznim metalima, u ovom slučaju sa srebrom. S obzirom da *cis* izomeri grade stabilnije komplekse sa solima srebra nego *trans* izomeri, ova tehnika se primenjuje u analizi TFA izvedena kao kolonska (HPLC) i hromatografija na tankom sloju (TLC). Pored geometrijske konfiguracije dvostrukih veza, retenciona zapremina zavisi i od broja i položaja dvostrukih veza u ugljenikovom lancu (Juanéda *et al.*, 2007) te stabilnost kompleksa raste po sledećem redosledu: zasićene < *trans* 22:1 < *trans* 20:1 < *trans* 18:1 < *cis* 22:1 < *cis* 20:1 < *cis* 18:1 (Nikolova-Damyanova, 1992).

Hromatografisanjem metilestra masnih kiselina primenom Ag^+ TLC, pri čemu se kao mobilna faza koristi heksan/etar (90:10, v/v) obično se dobijaju četiri frakcije: zasićene, *trans* mononezasićene, *cis* mononezasićene i polinezasićene masne kiseline. Modifikacijom uslova rada postignuto je i razdvajanje različitih 18:2 i 18:3 geometrijskih izomera (Wolff, 1992). U cilju identifikacije, kao i kvantitativnog određivanja, dalje se primenjuje gasnohromatografska analiza pojedinačnih frakcija pri izotermnom ili programskom temperaturnom režimu. GC u kombinaciji sa Ag^+ TCL je dugotrajna tehnika koja još uvek nije automatizovana, te se retko koristi.

Osnovni problem koji se javio prilikom razvoja Ag^+ HPLC bio je razvoj stabilne i reproduktivne stacionarne faze (Christie, 1987). Danas je dostupna komercijalna kolona ChromSpher Lipids[®] (Chromopack) koja daje zadovoljavajuće rezultate, uz napomenu da je skupa i lakolomljiva te je neophodno pažljivo rukovanje pri radu (Juanéda *et al.*, 2007). Primenom Ag^+ HPLC tehnike uz upotrebu navedene kolone, postignuto je razdvajanje *trans* i *cis* monoena metilestara masnih kiselina u dve frakcije koje su dalje analizirane primenom gasne hromatografije (Adolf *et al.*, 1995). Prvobitno primenom Ag^+ HPLC nije postignuto zadovoljavajuće razdvajanje geometrijskih *c,t* i *t,c* izomera linolne kiseline i mono- i di- *trans* izomera linolenske kiseline (Adolf, 1994), ali kasnije uz upotrebu dve serijski vezane kolone razdvajanje navedenih izomera je znatno poboljšano (Adolf & Lamm, 1998). Primenom Ag^+ HPLC uz dve ili više serijski vezane kolone postignuto je i razdvajanje konjugovanih izomera linolne kiseline (Sehat *et al.*, 1999), međutim razdvajanje ovih izomera se mnogo lakše postiže primenom GC.

Određivanje ukupnog sadržaja *trans* masti primenom IR metoda zasniva se na merenju apsorpcije na 966 cm^{-1} , što je karakteristično za izolovane *trans* dvostruke veze (Mossoba *et al.*, 2007). Ove dvostruke veze se prvenstveno javljaju kod mononezasićenih *trans* masnih kiselina nastalih tokom procesa parcijalne hidrogenacije. Prisustvo izomera mono- *trans* diena i triena u većim količinama dovodi do problema pri kvantitativnom određivanju jer se molarna apsortivnost njihovih *trans* veza može razlikovati od *trans* monoena. Ovaj problem je izraženiji ukoliko je u molekulu prisutno više od jedne *trans* dvostruke veze, jer se po definiciji sadržaj *trans* masti izražava kao sadržaj *trans* mononezasićenih masnih kiselina, sa obzirom da se za definisanje IR kalibracione krive najčešće koristi samo metilelaidat. U nekoliko poslednjih godina objavljeno je nekoliko IR metoda, od kojih su neke i validovane putem kolaborativnih studija (AOAC 2001; AOCS 1999; Azizian & Kramer 2005; Milosevic *et al.*, 2004). Međutim, osnovni problem za primenu ovih metoda u analizi prehrambenih proizvoda je taj što se mogu primenjivati samo ukoliko je sadržaj *trans* masti iznad 5 % u odnosu na ukupne masti. Pored toga, IR metode ne pružaju informacije o sastavu masnih kiselina te samim tim ne omogućavaju određivanje sadržaja zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina, što takođe treba da bude deklarirano na prehrambenim proizvodima.

2.4.6.1. Gasna hromatografija u analizi *trans* masnih kiselina

Već decenijama je gasna hromatografija primarna analitička metoda u analizi masnih kiselina, pre svega zbog mogućnosti razdvajanja veoma velikog broja masnih kiselina (Delmonte & Rader, 2007). U radu James-a i Martin-a (James & Martin, 1952) je gasna hromatografija primenjena u cilju razdvajanja i određivanja masnih kiselina, što predstavlja

prvi od mnogih važnih napredaka u ranom razvoju GC u analitičke svrhe. Od tada, karakterizacija masnokiselinskog sastava zasnovana na esterifikaciju do metilestara masnih kiselina i daljem određivanju gasnom hromatografijom, predstavlja jednu od najrasprostranjenijih metoda u analizi lipida, i nalazi široku primenu u biohemijskim, biomedicinskim, mikrobiološkim, poljoprivrednim i ekološkim istraživanjima (Dodds *et al.*, 2005).

U analizi lipida i danas se najčešće koristi gasna hromatografija uz primenu plameno jonizacionog detektora (flame ionization detector, FID), pri čemu su jedine informacije koje dobijamo retenciono vreme i odziv detektora te se pri analizi metilestara masnih kiselina u kompleksnim uzorcima, u prisustvu kontaminanata ili koeluirajućih komponenti, javljaju greške pri identifikaciji, a samim tim i kvantitativnom određivanju (Dodds *et al.*, 2005). Tako na primer na većini polarnih kolona antioksidant BHT eluira na mestu miristinske kiseline, dok metil levulinat, koji nastaje ukoliko se uzorci sa velikim sadržajem šećera podvrgnu kiselinskoj katalizi na višim temperaturama, eluira iza laurinske kiseline (Palmquist & Jenkins, 2002). Iako su mnogi autori pokušali da doprinesu pouzdanijoj identifikaciji na osnovu retencionog vremena kroz razvoj metoda kao što su predviđanje retencionog vremena, zavisnost retencionog vremena od ekvivalentne dužine lanca metilestara masnih kiselina i zaključavanje retencionog vremena (retention time locking) (David *et al.*, 2002; Toress *et al.*, 2002; Mjøs, 2004), ove metode se uglavnom smatraju pokušajima.

Primena gasne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (mass spectrometry – MS) je u veoma velikoj meri usavršila analizu lipida jer, kao i sve kombinovane tehnike, omogućava mnogo pouzdaniju kvalitativnu analizu uz istovremeno postizanje veće osetljivosti i selektivnosti, te se sve više primenjuje čak i u rutinskim analizama. Kako je ova tehnika primenjena u okviru ovog rada, detaljnije će biti objašnjena u poglavlju 2.6.

Pri određivanju *trans* masnih kiselina neophodno je primeniti dugačke kapilarne kolone sa visokopolarnim stacionarnim fazama kao što su SP-2560, CP-Sil 88 i BPX-70 (Ratnayake *et al.*, 2006; Mjøs, 2005). Još uvek postoje problemi pri određivanju pozicionih *trans* i *cis* izomera jer dolazi do preklapanja *trans* 18:1 pozicionih izomera počevši od $\Delta 12$ (ili $\Delta 13$ u zavisnosti od korišćenih eksperimentalnih uslova) sa $\Delta 6$ - $\Delta 14$ *cis* 18:1 pozicionim izomerima, dok se viši *cis* 18:1 pozicioni izomeri mogu preklapati sa *cis/trans* 18:2 izomerima (Mossoba *et al.*, 2003). Iako se ovaj problem prevazilazi predhodnom separacijom *cis* i *trans* geometrijskih izomera primenom Ag^+ hromatografije, ne preporučuje se kombinacija GC sa ovom tehnikom ukoliko se analiza izvodi u cilju određivanja sadržaja TFA u prehrambenim proizvodima radi deklarisanja sastava zbog kompleksnosti samog postupka i dugog vremena izvođenja analize (Juanéda *et al.*, 2007).

Do sada je validovano devet standardnih metoda za određivanje *trans* masnih kiselina u prehrambenim proizvodima, od kojih tri hromatografske (AOAC 996.06, AOCS Ce 1f-96, CEN EN ISO 15304:2002), pet spektroskopskih (AOAC 994.14, AOCS Cd 14-95, AOAC 965.34, AOCS Cd14d-99, AOAC 2000.10) i jedna kombinovana GC-IR metoda (AOAC 994.15) (Juanéda *et al.*, 2007).

Kako se primenom gasne hromatografije dobijaju podaci o sadržaju pojedinih masnih kiselina, a ne samo *trans* masnih kiselina kao pri primeni spektroskopskih metoda, ova metoda se gotovo isključivo koristi pri rutinskim analizama prahrambenih proizvoda u cilju deklarisanja sastava zasićenih, mononezasićenih, polinezasićenih i *trans* masnih kiselina. Ova metoda obuhvata: prethodnu ekstrakciju lipida iz uzorka, dalju transformaciju analita u pogodne derivate kao što su metilestri i na kraju gasno hromatografsko određivanje. Svaki od ovih koraka uključuje određene kritične operacije, podešavanje parametara i interpretaciju rezultata, tako da su mnogobrojni problemi još uvek prisutni. U cilju što tačnijeg definisanja sastava masnih kiselina u uzorcima hrane analitičarima se nameće zadatak za razvojem brze, tačne, reproduktivne i osetljive metode.

2.4.6.1.1. Priprema uzoraka koji sadrže lipide za gasnu hromatografiju

Da bi se kvalitativno i kvantitativno odredio sastav masnih kiselina u nekom materijalu, masti iz uzorka je potrebno izdvojiti od ostalog medijuma. Ako je sadržaj lipida u materijalu visok, pristupa se ceđenju sirovine i naknadnom presovanju. Kod uzoraka sa manjom količinom masti, izvode se različiti vidovi ekstrakcija, u zavisnosti od zahteva analize. Nakon ekstrakcije neophodna je dalja transformacija analita u lakoisparljive derivate manje polarnosti, kao što su metilestri, i na kraju se pristupa gasnoj hromatografskoj analizi.

Ekstrakcija lipida se tradicionalno izvodi na različite načine uz primenu organskih rastvarača u zavisnosti od karakteristika samog uzorka kao i zahteva same analize. Najčešće primenjivane klasične tehnike ekstrakcije su: metoda po Soxhlet-u, Folch-u, Röse-Gottlieb-u, Werner-Schmid-u, Majonnier-u, Weibull-Berntrop-u i Bligh-Dyer-u (Priego-Capote *et al.*, 2007). Kako je osnovni nedostatak klasičnih ekstrakcionih metoda dugo vreme, ispituju se nove brže metode za ekstrakciju lipida kao što su primena sistema za automatsku hidrolizu i ekstrakciju (Robinson *et al.*, 2008), ekstrakcija fluidima u nadkritičnom stanju (Eller, 1999), ekstrakcija u zatvorenom sistemu na visokoj temperaturi i pritisku (Boselli *et al.*, 2001), ekstrakcija po Soxhlet-u potpomognuta usmerenim mikrotalasima (Priego-Capote *et al.*, 2004; Priego-Capote *et al.*, 2005) i dinamička ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Ruiz-Jimenez & Luque de Castro, 2004; Ruiz-Jimenez *et al.*, 2004).

U poslednje vreme sve veća pažnja se poklanja razvoju metoda za ekstrakciju masti primenom mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu, pre svega zbog njenih prednosti kao što su: znatno kraće vreme ekstrakcije, upotreba malih zapremina rastvarača, jednostavna oprema, znatno manja potrošnja energije, ne zahteva se prethodno sušenje uzorka pri čemu se postižu isti ili veći prinosi u odnosu na klasične ekstrakcione tehnike (Paré & Bélanger, 1997; Elkhori *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2001).

Kako se masne kiseline karakterišu visokom polarnošću, malim naponom pare i visokom tendencijom ka građenju vodononičnih veza veoma teško se direktno određuju gasnom hromatografijom (Carvalho & Malcata, 2005). Stoga GC analizi prethodi derivatizacija masnih kiselina u isparljivije i stabilnije derivate kao što su metil-, etil-, propil-, isopropil- i butilestri (Broncz, 2002). Esterifikacijom se poboljšava konfiguracija pikova, separacija i osetljivost detektora.

Izbor reagensa za esterifikaciju masnih kiselina zavisi, pre svega, od hemijske strukture masne kiseline, dužine ugljovodoničnog lanca i prisustva slobodnih amino i hidroksilnih grupa. Najčešće se masne kiseline derivatizacijom prevode u metilestre. Metode za dobijanje metilestara masnih kiselina dele se uglavnom u tri grupe (Marjanović & Jankoviš, 1983). Prvu grupu sačinjavaju metode interesterifikacije ili transesterifikacije. Pri pogodno odabranim reakcionim uslovima i uz prisustvo odgovarajućeg kiselog ili baznog katalizatora, izvodi se zamena glicerola sa nekim drugim alkoholom, uglavnom metanolom. Kao kiseli katalizatori najčešće se koriste HCl, H₂SO₄ i BF₃; dok se kao bazni katalizatori najčešće koriste NaOCH₃, NaOH i KOH. U drugoj grupi metoda, esterifikacija metanolom se izvodi posle saponifikacije, odnosno metiluju se soli masnih kiselina. U treću grupu metoda spadaju metode u kojima se slobodne masne kiseline esterifikuju pomoću anjonskog izmenjivača jona ili diazometana.

U cilju sprečavanja kontaminacije i razgradnje uzorka tokom hidrolize, ekstrakcije i derivatizacije najbolje bi bilo primeniti metodu koja bi omogućila direktno dobijanje metilestara iz matriksa uzorka. U literaturi je ispitivana mogućnost direktne transesterifikacija iz različitih uzorka primenom kiselih ili alkalnih reagenasa (Golay *et al.*, 2006; Destalitas *et al.*, 2004; Ulberth & Henninger, 1992; Lepage & Roy, 1984).

2.5. Mikrotalasna ekstrakcija (ME)

Pojam magnetron (generator mikrotalasa) prvi put je upotrebljen od strane Hall-a 1921. godine, dok je 1946. utvrđeno da se mikrotalasi mogu koristiti kao izvor toplote (Mitra, 2003). Usledio je razvoj mikrotalasnih pećnica za domaćinstvo koje se pojavljuju na tržištu 1967.

godine. Mikrotalasi su prvi put primenjeni u analitičke svrhe 1975. godine i to za digestiju uzorka koja je prethodila analizi metala (Abu-Samra *et al.*, 1975), dok je ekstrakcija potpomognuta mikrotalasila (Microwave Assisted Extraction) prvi put primenjena 1986. godine i to za ekstrakciju masti i antinutritivenata iz hrane i pesticida iz zemljišta (Ganzler *et al.*, 1986). Agencija za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency – EPA) je 2000. godine usvojila ekstrakciju potpomognutu mikrotalasila za standardnu metodu za ekstrakciju srednje isparljivih i neisparljivih komponenti iz čvrstih uzoraka.

2.5.1. Teorijske osnove

U elektromagnetnom spektru oblast mikrotalasnog zračenja se nalazi između infracrvenog zračenja i radiotalasa, u oblasti frekvencije između 0,3 i 300 GHz, što odgovara talasnim dužinama između 0,1 i 100 cm. Kako većinu frekvencija iz ovog opsega pokrivaju telekomunikacioni i radarski uređaji, da bi se izbegle interferencije sve industrijske i laboratorijske, kao i mikrotalasnne pećnice za domaćinstvo, za rad koriste frekvenciju od 2,45 GHz (Paré & Bélanger, 1997).

Ukoliko se mikrotalasno zračenje primeni na molekule u gasnom stanju dolazi do apsorpcije i promene rotacionog stanja molekula i pojave oštih traka u mikrotalasnom spektru u opsegu od 3 do 60 Hz, što se koristi u mikrotalasnoj spektroskopiji za dobijanje fundamentalnih fizičko-hemijskih podataka o strukturi molekula. Međutim, ukoliko se mikrotalasno zračenje primeni na supstance u tečnom i čvrstom stanju neće doći do nastanka mikrotalasnog spektra jer molekuli neće slobodno rotirati, ali pri određenim uslovima dolazi do njihovog zagrevanja.

Da bi došlo do zagrevanja pod dejstvom mikrotalasnog zračenja potrebno je prvo da reakciona smeša sadrži dipolarne molekule ili jone. Samo zagrevanje je posledica dva mehanizma: dipolarne polarizacije i kondukcije. Dipoli su osetljivi na dejstvo spoljašnjeg električnog polja i pokušavaju da se usklade sa oscilovanjem polja. Polje obezbeđuje energiju, a kretanjem dipoli gube energiju usled trenja, te dolazi do zagrevanja. Stepem zagrevanja zavisi od prirode dipola i frekvencije primenjenog zračenja. Do zagrevanja neće doći ukoliko se primeni niska ili previsoka frekvencija. U slučaju primenjene previsoke frekvencije dipol ne može da prati promene polja i ne dolazi do kretanja, dok pri primenjenoj niskoj frekvenciji dipol idealno prati promene polja, te u oba slučaja ne dolazi do zagrevanja. Pri mikrotalasnom zračenju dipoli mogu da prate polje, ali su promene dovoljno brze tako da se stvara fazna razlika između orijentacije polja i dipola. Ova fazna razlika dovodi do gubitka energije dipola i do zagrevanja.

Zagrevanje kretanjem jona usled mikrotalasnog zračenja je mnogo jače nego što je to pri zagrevanju usled dipolne polarizacije, te se stoga supstance ili reakcione smeše naglo

zagrevaju pod dejstvom mikrotalasnog zračenja. Ovo svojstvo jona se može iskoristiti za poboljšanje zagrevanja nepolarnih rastvarača pod dejstvom mikrotalasa.

Pri poređenju sposobnosti rastvarača za interakciju sa mikrotalasnim zračenjem važna je sposobnost rastvarača da apsorbuje energiju mikrotalasa i da apsorbovanu energiju prevede u toplotnu energiju. Interakcija rastvarača sa mikrotalasnim zračenjem je veoma složena jer zavisi od dielektričnih svojstava rastvarača, koja zavise od temperature rastvarača i frekvencije primenjenog polja, kao i od viskoznosti rastvarača koja je opet funkcija temperature.

Sposobnost supstance da transformiše elektromagnetnu u toplotnu energiju definiše se pomoću tangensa ugla gubitka – $\tan \delta$ koji predstavlja odnos između faktor gubitka – ϵ'' (kvantifikuje efikasnost sa kojom se apsorbovana energija prevodi u toplotnu) i dielektrične konstante – ϵ' koja definiše sposobnost rastvarača da apsorbuje mikrotalasnu energiju (izraza 1).

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad [1]$$

U tabeli 2.4. date su fizičke konstante za pojedine organske rastvarače.

Tabela 2.4. Fizičke konstante najčešće korišćenih rastvarača u mikrotalasnoj ekstrakciji (Mitra, 2003; Mijin & Petrović, 2005)

Rastvarač	Tačka ključanja (°C)	Napon pare (kPa)	ϵ'	$\tan \delta$
Heksan	69	16,0	1,88	-
Hloroform	61	25,8	4,8	0,091
Etilacetat	77	9,74	6,02	0,059
Tetrahidrofuran	66	19,0	7,28	0,047
Metilenhlorid	40	58,2	8,93	0,042
Aceton	56	24,6	20,7	0,054
Etanol	78	-	24,3	0,941
Metanol	65	16,7	32,7	0,640
Dimetilformamid	153	0,36	36,7	0,161
Acetonitril	82	11,9	37,5	0,062
Dimetilsulfoksid	189	0,08	46,7	0,825
Voda	100	101,4	78,3	0,123

Polarni rastvarači, koji imaju više dielektrične konstante, se veoma brzo zagrevaju, dok nepolarni ne mogu apsorbovati mikrotalasno zračenje te se ne zagrevaju. Može se videti da metanol i etanol imaju niže dielektrične konstante od vode ali više vrednosti $\tan \delta$ ukazuju da im je sposobnost transformacije mikrotalasne u toplotnu energiju viša.

2.5.1.1. Mehanizam mikrotalasne ekstrakcije

Proces mikrotalasne ekstrakcije se u osnovi razlikuje od ostalih konvencionalnih ekstrakcionih tehnika. Kod konvencionalnih metoda ekstrakcije rastvaračem prenos mase i toplote se odvija u suprotnim smerovima (prenos mase – iz unutrašnjosti ka spolja, prenos toplote – od spolja ka unutra), dok se kod ME prenos mase i toplote odigrava u istom smeru – iz unutrašnjosti uzorka ka rastvaraču (Viro *et al.*, 2008), tako da je mikrotalasna ekstrakcija jedina ekstrakciona tehnika kod koje dolazi do direkne migracije željenih komponenata iz matriksa u rastvor usled selektivne primene energije direktno na uzorak (Paré & Bélanger, 1997).

Tečna ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima se zasniva na sposobnosti uzorka da apsorbuje mikrotalasnu energiju, dok se izbor rastvarača za ekstrakciju izvodi na osnovu sposobnosti rastvaranja komponenti od interesa i njegove relativne propustljivosti za mikrotalase. U principu, tri sistema se mogu primeniti pri mikrotalasnoj ekstrakciji: rastvarač ili smeša rastvarača sa visokim faktorom gubitka – ϵ'' ; smeša rastvarača sa visokim i niskim ϵ'' i rastvarači sa niskom dielektričnom konstantom u kombinaciji sa uzorkom sa visokim ϵ'' (Mitra, 2003).

U ME se veoma često koriste rastvarači koji imaju malu dielektričnu konstantu, te su relativno propusni za mikrotalase jer pod dejstvom mikrotalasne energije dolazi do selektivnog zagrevanja uzorka, lokalnog povišenja temperature i pritiska, što uslovljava mnogo bržu selektivnu migraciju željenih komponenata iz uzorka u rastvarač (Paré & Bélanger, 1997). Što je veća razlika u dielektričnim karakteristikama uzorka i rastvora postiže se bolja efikasnost mikrotalasne ekstrakcije, uz istovremenu uštedu energije i upotrebu manjih količina rastvora za ekstrakciju.

Jedna od najvažnijih komponenti u pogledu ME, prisutna u gotovo svim prehrambenim proizvodima je voda. Slobodni molekuli vode imaju visoku dielektričnu konstantu i veliku sposobnost apsorpcije mikrotalasnog zračenja. Pod dejstvom mikrotalasa, unutar biljnih i životinjskih ćelija, dolazi do brzog zagrevanja vode i njenog isparavanja, povećava se zapremina ćelija, znatno se povećava pritisak na ćelijske zidove te dolazi do njihovog pucanja čime je omogućeno izlučivanje komponenata iz ćelija u relativno hladan rastvarač u kom se veoma brzo rastvaraju (Mandal *et al.*, 2007).

2.5.2. Instrumentacija

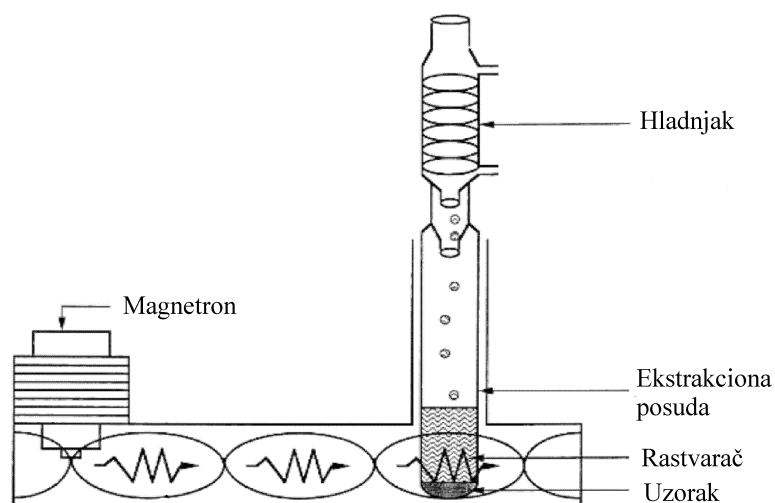
Razlikuju se dva tipa komercijalno dostupnih sistema za mikrotalasnu ekstrakciju: zatvoren i otvoren sistem. Ekstrakcija u zatvorenom sistemu se izvodi pod povišenim pritiskom, dok se ekstrakcija u otvorenom sistemu izvodi pri atmosferskom pritisku.

Osnovne prednosti mikrotalasne ekstrakcije u zatvorenom sistemu u odnosu na mikrotalasnu ekstrakciju u otvorenom sistemu su: mogu se postići više temperature (sa povećanjem pritiska raste tačka ključanja upotrebljenog rastvarača) te se smanjuje vreme ekstrakcije, praktično je u potpunosti sprečen gubitak isparljivih supstanci kao i kontaminacija uzorka, nema potencijalno štetnih isparenja i potrebne su manje količine rastvarača. Nedostaci mikrotalasne ekstrakcije u zatvorenom sistemu su: količina uzorka za ekstrakciju je ograničena, postoji rizik od eksplozije, moraju se koristiti posude odgovarajuće konstrukcije izrađene od posebnih materijala (tetrafluorometoksil polimer – TFM, perfluoroalkoksi – PFA, polieterimid), procedura se izvodi u jednom koraku što isključuje mogućnost dodavanja reagenasa ili rastvarača tokom procesa ekstrakcije i nakon završetka procesa neophodno je sačekati da se posuda za ekstrakciju ohladi kako ne bi došlo do gubitka lakoisparljivih komponenti.

Priprema uzoraka mikrotalasnom ekstrakcijom u otvorenom sistemu, pod atmosferskim pritiskom, može biti mnogo efikasnija od mikrotalasne ekstrakcije u zatvorenom sistemu (Mandal *et al.*, 2007). Rad pri atmosferskom pritisku pruža niz prednosti, neke od njih su: mogu se koristiti veće količine uzorka, moguće je dodati reagense u bilo kom trenutku tokom procesa ekstrakcije, višak rastvarača se sa lakoćom može ukloniti, izbegava se faza hlađenja, niže temperature omogućavaju ekstrakciju termolabilnih komponenti, niska cena instrumentacije i mogućnost potpune automatizacije. Sa druge strane, ne može se izvoditi simultana ekstrakcija više uzoraka i vreme ekstrakcije je duže u odnosu na mikrotalasnu ekstrakciju u zatvorenom sistemu.

Na slici 2.8. dat je šematski prikaz aparature za mikrotalasnu ekstrakciju u otvorenom sistemu.

Iako mikrotalasna ekstrakcija u otvorenom sistemu ima niz prednosti, još uvek nije široko rasprostranjena u analizi lipida. Primenjena je za određivanje sadržaja masti u mesu, mleku, jajima (Paré & Bélanger, 1997) i kakau (Elkhori *et al.*, 2007), kao i pri određivanju masnokiselinskog sastava ribe sa različitim sadržajem masti (Batista *et al.*, 2001).



Slika 2.8. Šematski prikaz aparature za mikrotalasnu ekstrakciju u otvorenom sistemu

2.5.3. Parametri procesa mikrotalasne ekstrakcije

2.5.3.1. Rastvarač

Izbor odgovarajućeg rastvarača je od fundamentalnog značaja za postizanje optimalne ekstrakcije potpomognute mikrotalasima. Izbor rastvarača za ekstrakciju zasniva se na rastvorljivosti analita u njemu, interakciji rastvarača i matriksa uzorka i na kraju od mikrotalasnih apsorbcionih karakteristika rastvarača.

Rastvarač pre svega treba da ima visoku selektivnost ka komponentama od interesa, isključujući neželjene komponente iz matriksa uzorka. Pored toga, poželjna je kompatibilnost rastvarača za ekstrakciju sa daljim hromatografskim analitičkim korakom kako bi se izbegla faza zamene rastvarača. Pokazano je da efikasnost ekstrakcije lipida u najvećoj meri zavisi od primenjenog rastvarača, te je izbor rastvarača jedan od najkritičnijih faktora pri analizi lipida (Garcia-Ayuso *et al.*, 2000). S toga se za mikrotalasnu ekstrakciju lipida najčešće upotrebljava heksan.

Kod konvencionalnih ekstrakcionih metoda efikasnost ekstrakcije se obično povećava što je veći odnos zapremine rastvarača u odnosu na čvrst uzorak, dok kod ME može doći do smanjenja efikasnosti ekstrakcije (Wang & Weller, 2006). U principu pri ME zapremina

rastvarača treba da bude dovoljna kako bi tokom celog procesa ekstrakcije celokupna masa čvrstog uzorka bila potopljena u rastvarač (Mandal *et al.*, 2007; Wang & Weller, 2006).

2.5.3.2. Vreme ekstrakcije

U principu, sa porastom vremena ekstrakcije raste i količina ekstrahovanih analita, međutim dolazi i do dekompozicije termolabilnih komponenti (Mitra, 2003). Obično se maksimalan prinos mikrotalasne ekstrakcije postiže za 10 do 20 minuta, ali i u mnogo kraćem vremenu se mogu postići odlični rezultati ((Mandal *et al.*, 2007). Dielektričke karakteristike rastvarača utiču na vreme ekstrakcije. Rastvarači kao što su voda, etanol i metanol se veoma brzo zagrevaju i sa porastom vremena trajanja ekstrakcije može doći do enormnog zagrevanja i razgradnje termolabilnih komponenti.

2.5.3.3. Mikrotalasna snaga

Mikrotalasna snaga i vreme ekstrakcije predstavljaju dva faktora koja imaju veoma velik međusoban uticaj. Povećanjem mikrotalasne snage smanjuje se vreme trajanja ekstrakcije i obrnuto. Sa povećanjem snage mikrotalasa postižu se više temperature i dolazi do naglog pucanja ćelijskih zidova usled čega i nečistoće zajedno sa željenim analitom prelaze u rastvarač. Visoka snaga u kombinaciji sa dugim vremenom uzrokuje degradaciju termolabilnih komponenti. Rad sa manjom snagom omogućava selektivnu ekstrakciju jer u tom slučaju dolazi do postepenog pucanja ćelijskih zidova.

2.6. Kapilarna gasna hromatografija–masena spektrometrija (GC–MS)

Može se reći da gasna hromatografija–masena spektrometrija predstavlja jednu od najmoćnijih kombinovanih analitičkih tehnika današnjice, nezamenljivu u analizi kompleksnih smeša. Prvi radovi u GC i MS, koji su doveli do današnje realizacije obe tehnike, objavljeni su pedesetih godina XX veka. Krajem sedamdesetih i početkom osamdesetih godina XX veka usledio je veoma brz porast u upotrebi GC–MS u svim oblastima organske analize. U tabeli 2.5. dat je kratak prikaz istorijskog razvoja GC i MS.

Tabela 2.5. Istorijski razvoj GC i MS (Hübschmann, 2001)

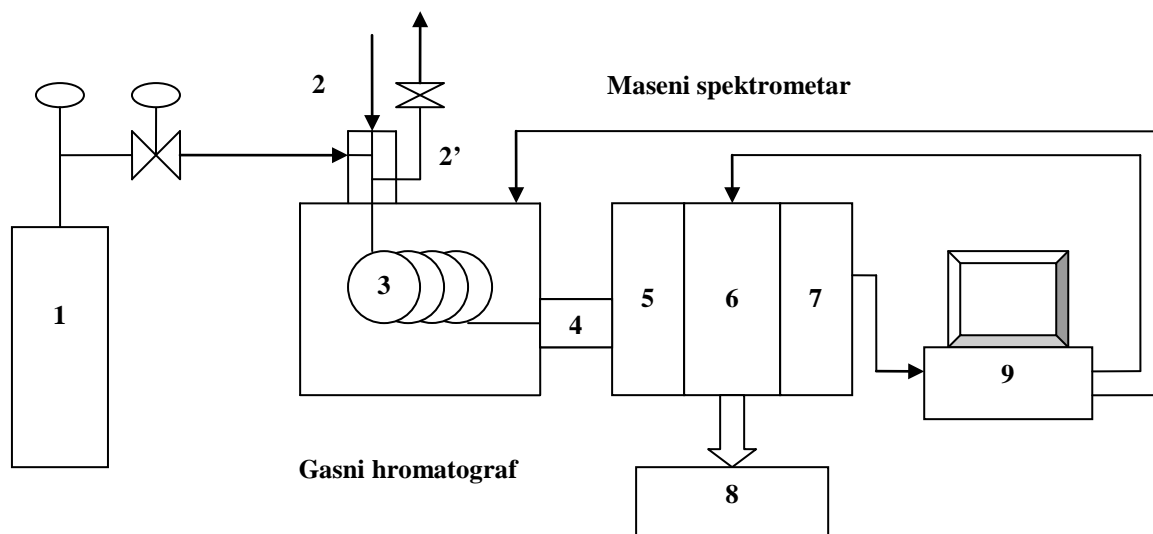
1910.	Thompson razvio prvi MS i utvrdio, po prvi put, postojanje izotopa ^{20}Ne i ^{22}Ne
1918.	Dempster po prvi put upotrebio jonizaciju elektronima
1920.	Aston potvrdio rad Thompsona, utvrdio postojanje izotopa ^{35}Cl i ^{37}Cl na svom MS sa fotopločom kao detektorom
1929.	Bartky i Dempster razvili teoriju za MS analizatore sa dvostrukim fokusiranjem
1938.	Hustrulid objavio prvi maseni spektar benzena
1941.	Martin i Syngge objavili principe gasne podeone hromatografije
1947.	US Nacionalni biro za standarde (NBS) počeo da sakuplja masene spektre kao rezultat upotrebe MS u naftnoj industriji
1950.	Gohlke objavio vezivanje GC (sa punjenim kolonama) sa MS
1952.	Martin i James objavili prve aplikacije gasne podeone hromatografije
1954.	Paul objavio svoj fundamentalni rad na kvadrupolnom masenom analizatoru
1958.	Golay objavio upotrebu kapilarnih kolona u GC
1964.	Prvi komercijalno proizveden kvadrupolni MS
1968.	Prvi komercijalno proizveden kvadrupolni GC–MS za organsku analizu
1978.	Dandenau i Zerenner predstavili stopljene silikatne kapilarne kolone

Kapilarna gasna hromatografija je danas najvažnija tehnika u organskoj hemijskoj analizi za određivanje individualnih komponenti u kompleksnim smešama, pre svega zbog svoje visoke selektivnosti. Sa druge strane, maseni spektar pruža detaljne strukturne informacije te omogućuje veoma uspešnu kvalitativnu analizu. Kombinacija ove dve analitičke tehnike omogućuje istovremeno razdvajanje kompleksnih smeša i kvalitativnu i kvantitativnu analizu, i time značajno podiže nivo instrumentalnih analiza.

Mora se napomenuti da su GC i MS visoko kompatibilne tehnike. Obe tehnike zahtevaju uzorak u gasovitom stanju i koriste iste količine uzorka (tipično manje od 1 ng). Do razvoja kapilarne gasne hromatografije osnovni problem je bio vezivanje MS za GC, jer razdvojene komponente napuštaju GC kao komponente u tragovima u struji gasa nosača na pritisku od oko 1 bar, a MS radi pri visokom vakuumu od oko 10^{-4} – 10^{-6} mbar. O načinu vezivanja GC i MS više je rečeno u poglavlju 2.6.4.

Ručna evaluacija GC–MS analize je praktično nemoguća zbog velikog broja podataka koji se dobija tokom analize, tako da je i razvoj računarskih sistema veoma doprineo ekspanziji GC–MS.

Na slici 2.9. dat je prikaz principijelne šeme aparature za GC–MS.



- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1 – boca sa gasom nosačem | 5 – jonski izvor |
| 2 – injektor | 6 – maseni analizator |
| 2' – razdeljivač | 7 – detektor masenog spektrometra |
| 3 – kapilarna kolona | 8 – vakuum sistem |
| 4 – veza između GC i MS (transferline) | 9 – računar |

Slika 2.9. Principijelna šema aparature za GC–MS

2.6.1. Gas nosač

Kao gasovi nosači koriste se permanentni gasovi. Pored osnovnih zahteva o čistoći, malom viskozitetu, niskoj ceni i hemijskoj inertnosti prema komponentama koje se razdvajaju, njihove osobine tokom strujanja kroz kolonu i detektor moraju ostati konstantne u najvećoj mogućoj meri (Marjanović, 2001). Kao gasovi nosači najčešće se koriste: helijum, vodonik, azot i argon. Efikasnost razdvajanja, kao i vreme trajanja analize, zavise od odabranog gasa nosača i njegove brzine. Određivanje optimalne brzine gasa nosača izvodi se na osnovu Van Deemterove jednačine koja je prikazana jednačinom 2:

$$HETP = A + \frac{B}{U} + C \cdot U \quad [cm] \quad [2]$$

gde je: HETP – visina ekvivalenta teorijskog poda

A – veličina koja definiše uticaj vrtložne difuzije

B – veličina koja definiše uticaj longitudinalne molekulske difuzije

C – veličina koja definiše uticaj otpora prenosa mase u obe faze i

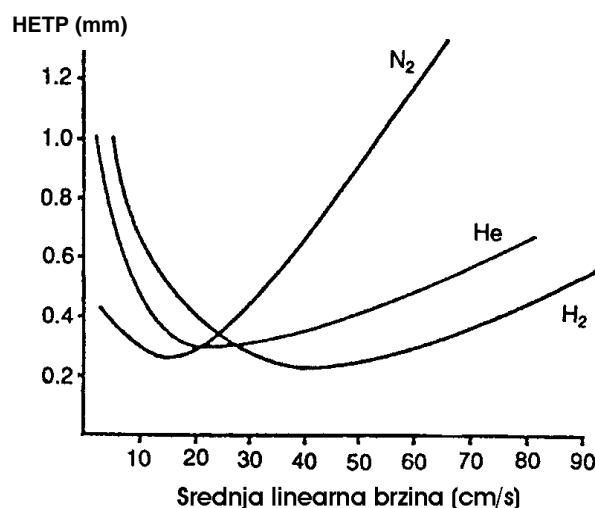
U – linearna brzina gasa nosača.

Optimalna brzina gasa nosača u principu se određuje kao apcisa minimuma krive zavisnosti visine ekvivalenta teorijskog poda od brzine kretanja mobilne faze.

Na slici 2.10. prikazana je zavisnost visine ekvivalenta teorijskog poda (HETP) od linearne brzine (U) za N_2 , He i H_2 . Može se videti da se najbolja efikasnost (najmanja HETP) dobija korišćenjem H_2 i N_2 , ali problem je što je minimum za N_2 veoma uzak tako da sa malim promenama optimalne brzine efikasnost brzo opada. U kombinaciji GC–MS, jonizacijom N_2 nastaje jon kod koga je $m/z = 28$, pa su onemogućena snimanja masenih spektara razdvojenih supstanci ispod ove vrednosti. Takođe se može uočiti da se upotrebom H_2 dobija najširi minimum, te je on najpogodniji kao gas nosač u kapilarnoj gasnoj hromatografiji. Međutim, problem se javlja ako se kao detektor koristi maseni spektrometar jer je tada potrebno postići veći vakuum, što zahteva moćniji sistem pumpi, te se tada kao gas nosač koristi helijum (Hübschmann, 2001). Može se zaključiti da je odlučujući faktor pri izboru gasa nosača tip detektora.

U ovom radu je kao gas nosač korišćen He čistoće 99,999%, a dodatno je uklanjana vlaga i kiseonik pomoću kolone Oxisorb[®].

Pri radu sa GC–MS uobičajeni protoci gasa nosača su: 1–2 ml/min za kvadrupolni analizator, odnosno 3 ml/min (ili veći) za jon trap analizator (Hübschmann, 2001).



Slika 2.10. Zavisnost visine ekvivalenta teorijskog poda (HETP) od srednje linearne brzine za N_2 , He i H_2

2.6.2. Injektor

U kapilarnoj gasnoj hromatografiji injektor, odnosno sistem za unošenje uzorka u kolonu, je od primarnog značaja, što je i opisano citatom Pretorius-a iz 1983. (Pretorius & Bertsch, 1983): „Ako se kolona opisuje kao srce hromatografije, onda se sistem za unošenje uzorka može smatrati Ahilovom petom“.

Osnovni uslov koji mora biti zadovoljen pri unošenju uzorka u kolonu je da se uzorak nanese na sam vrh kolone u što užoj zoni. Širina zone nanošenja principijalno određuje kvalitet hromatografisanja, jer pikovi na kraju hromatograma ne mogu biti oštiji, uži ili simetričniji u odnosu na one na početku. Ostali uslovi koje sistem za unošenje uzorka treba da omogući su: postizanje optimalne efikasnosti kolone, postizanje što višeg odnosa signal/šum (S/N), ne sme doći do kvalitativnih i kvantitativnih promena na uzorku i komponente iz uzorka koje ne isparavaju ne smeju dospeti u kolonu.

Mora se istaći da još uvek nije razvijen univerzalni injekcioni sistem, a verovatno neće ni biti (Sandra, 1985).

Izbor sistema za unošenje uzorka zavisi pre svega od karakteristika hromatografske kolone (unutrašnji prečnik, debljina filma stacionarne faze, kapacitet i dr.) i raznolikosti uzoraka (npr. širok opseg koncentracija pojedinačnih komponenti od veoma isparljivih do slabo isparljivih, različita termalna stabilnost i dr.).

Najčešće korišćeni injekcioni sistemi u kapilarnoj gasnoj hromatografiji su:

- Injektovanje uz razdeljivanje (Split),
- Injektovanje bez razdeljivanja (Splitless),
- Na kolonu (On column),
- Temperaturno programirano isparavanje (Programmed Temperature Vaporizing – PTV).

Sistem injektovanja uz razdeljivanje (split–sistem), koji je korišćen u ovom radu, je prvi razvijeni sistem za kapilarnu gasnu hromatografiju. Osnovni princip rada ovog injektora je uvođenje uzorka mikrošpicem preko septuma u komoru za isparavanje (liner) gde dolazi do momentalnog isparavanja uzorka, nakon čega kroz jedan vod samo mali deo ulazi u kolonu, a ostatak preko drugog voda izlazi u atmosferu. Ovo omogućuje injektovanje uzorka zapremine 0,1–2 μl a da pri tom ne dođe do preopterećenja kapilarne kolone. Na slici 2.11. dat je šematski prikaz split-injektora.

Optimalna količina uzorka koji ulazi u kolonu reguliše se pomoću restriktora (igličasti ventil) koji je postavljen u vod za ispiranje (split izlaz). Odnos razdeljivanja (split ratio – SR) izračunava se na osnovu izraza 3.

$$SR = \frac{Q_{kol} + Q_{s.v.}}{Q_{kol}} \quad [3]$$

gde je: Q_{kol} – protok kroz kolonu i

$Q_{s.v.}$ – protok kroz vod za ispiranje.

Za određivanje protoka kroz kolonu Q_{kol} (koji se određuje indirektno, određivanjem retencionog vremena vazduha, azota) potrebno je prvo odrediti linearnu brzinu U gasa nosača kroz kolonu, koja je definisana izrazom 4.

$$U = \frac{L}{t_m} \quad [4]$$

gde je: U – linearna brzina [cm/s]

L – dužina kolone [cm] i

t_m – retenciono vreme vazduha [s].

Protok gasa nosača se može odrediti na osnovu izraza 5.

$$Q_{kol} = U \cdot A \quad [cm^3/s] \quad [5]$$

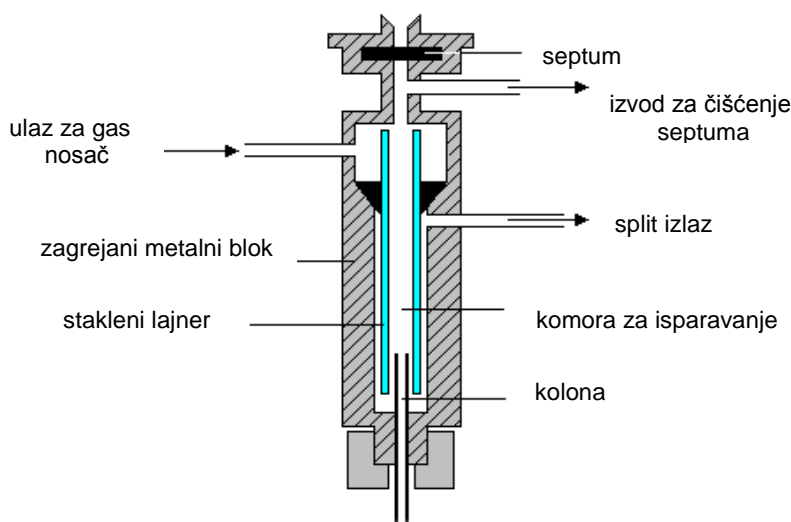
gde je: $A = \frac{D^2 \pi}{4} \quad [cm^2]$ – površina poprečnog preseka kolone

D – prečnik kolone [cm]

Protok kroz vod za ispiranje $Q_{s.v.}$ meri se pomoću uređaja sa sapunskim mehurima i hronometra.

Kod novijih instrumenata moguće je i automatsko podešavanje odnosa razdeljivanja.

Kod kapilarnih kolona sa unutrašnjim prečnikom 0,20–0,32 mm, obično se koristi split odnos od 1:50 do 1:500. Kod kolona sa velikim kapacitetom i/ili tankim filmom koristi se manji split odnos, 1:5 do 1:50, a ukoliko se koriste kolone sa unutrašnjim prečnikom 50–100 μ m split odnos može prelaziti 1:1000 (Hübschmann, 2001).



Slika 2.11. Šematski prikaz split-injektora

Osnovni nedostatak split-injektora je što ukoliko ne dođe do potpunog isparavanja uzorka, što je posebno izraženo pri analizi uzoraka koji sadrže lakše i teže isparljive komponente, količina uzorka koji ulazi u kolonu ne reprezentuje količinu uzorka koja je injektovana. Zato bi trebalo injektovati uvek iste zapremine uzorka (uobičajeno 0,5–2,0 μl) i kvantifikaciju izvoditi metodom unutrašnjeg standarda.

Ne ulazeći u opis ostalih načina injektovanja, u tabeli 2.6. dat je kratak pregled osobina navedenih injekcionih tehnika u zavisnosti od karakteristika uzorka.

Tabela 2.6. Izbor pogodnog injekcionog sistema (Hübschmann, 2001)

Karakteristike uzorka	Split	Splitless	PTV split	PTV splitless	PTV uz eliminaciju rastvarača	Na kolonu
Koncentrovan	+	-	+	-	-	-
Supstance u tragovima	-	+	-	+	+	+
Veoma razblažen	-	-	-	-	+	+
Uzak opseg t_{kij}	+	+	+	+	+	+
Širok opseg t_{kij}	-	≈	+	+	-	+
Isparljive supstance	+	+	+	+	-	-
Neisparljive supstance	-	≈	+	+	+	+
Neisparljiv matriks	+	+	+	+	+	-
Termalno labilne supstance	≈	-	≈	≈	≈	+

+ preporučuje se; ≈ može se koristiti; - ne preporučuje se; t_{kij} – tačka ključanja

2.6.3. Kapilarne kolone

Cevi za kapilarne kolone se prave od nerđajućeg čelika, kvarca i najčešće od stopljene silike (fused silica).

Zbog nedostataka metalnih i kvarcnih kolona, pojava komercijalno dostupnih "fused silica" kapilarnih kolona 1979. godine predstavlja glavni preokret u kapilarnoj gasnoj hromatografiji (Lipsky & McMurray, 1981). Stopljena silika se dobija reakcijom SiCl_4 sa vodenom parom u plamenu, pri čemu nastaje čist SiO_2 koji sadrži oko 0,1% hidroksilnih ili silanolnih grupa na površini i manje od 1 ppm nečistoća (K, Na, Ca). Upravo velika čistoća stopljene silike određuje njenu inertnu hemijsku prirodu, što je i čini tako pogodnom za izradu hromatografskih kolona. Površinska energija stopljene silike dobro odgovara površinskom naponu tečnih stacionarnih faza, tako da one dobro pokrivaju unutrašnjost cevi i rezultat su tanki i uniformni filmovi.

Nedostatak stopljene silike je što je osetljiva na vlagu, te se mora prevući zaštitnim slojem, obično poliimid, koji ne podnosi visoke temperature (do 380°C). Za više radne temperature kolone se prevlače nerđajućim čelikom ili aluminijumom. Neophodno je izvesti površinski tretman stopljene silike kako bi se redukovala katalitička i adsorpciona aktivnost i da bi se pripremila površina za prevlačenje sa odabranom stacionarnom fazom. Uobičajen proces deaktivacije je ispiranje kiselinama radi uklanjanja metalnih jona odgovornih za adsorpciju, a potom silaniziranje radi blokiranja hidroksilnih grupa.

Kapilarne kolone se prevlače slojem likvidne faze na dva načina: dinamički i statički. Kod dinamičkog prevlačenja, u kolonu (dovoljno je da ispuni 10% od dužine kolone) se unosi rastvor stacionarne likvidne faze u lako isparljivom rastvaraču i potiskuje se gasom koji treba da omogući kretanje kroz kolonu brzinom od oko 2–4 mm/s (Scott, 2003). Kod statičkog načina prevlačenja, kolona se napuni rastvorom stacionarne likvidne faze u lako isparljivom rastvaraču, jedan kraj se zatim zatvara a drugi se priključi na vakuum, tako da rastvarač isparava uz zagrevanje, a stacionarna likvidna faza ostaje vezana za zidove kolone.

Bez obzira na način prevlačenja, stabilnost kolone zavisi od stabilnosti filma stacionarne faze, koja zavisi od prirode same stacionarne faze i napona površinskih sila koje je drže na zidovima kolone. Do narušavanja stabilnosti može doći usled povišenja temperature ili prolaskom rastvarača kroz kolonu, usled čega dolazi do pucanja filma. Zato se danas sve više koristi imobilizacija, odnosno hemijsko vezivanje stacionarne faze za zid kolone (Scott, 2003). Imobilizacija podrazumeva reakcije koje će dovesti do formiranja stabilnijeg

makromolekularnog filma. Mora se napomenuti da se polarne stacionarne faze mnogo teže vezuju za stopljenu siliku u odnosu na nepolarne stacionarne faze, tako da im je i efikasnost manja jer se postiže manji broj teorijskih podova.

Prednosti kolona sa hemijski vezanim fazama su: veća stabilnost, podnose više temperature i mogu se ispirati rastvaračima i na taj način regenerisati.

Tipovi kapilarnih kolona su:

- **WCOT** (Wall Coated Open Tubular) – standardne kapilarne kolone sa unutrašnjim zidom prevučeni samo stacionarnom likvidnom fazom. WCOT kolone pružaju visoku efikasnost za veliki broj uzoraka, ali imaju mali kapacitet zbog tankog filma, nisu pogodne za analize supstanci male molekulske mase i inertnih gasova na sobnoj temperaturi.
- **PLOT** (Porous Layer Open Tubular) – kapilarne kolone sa poroznim slojem. Kod ovih kolona unutrašnji zid stopljene silike prevučen je slojem adsorbensa (aluminijum-oksidi/KCl, molekulska sito ili porozni polimer). U najvećoj meri se koriste u analizi gasova i za razdvajanje ugljovodonika malih molekulskih masa. Nedostaci PLOT kolona su: niža efikasnost, manja inertnost i sa vremenom dolazi do problema sa stabilnošću i reproduktivnošću.
- **SCOT** (Supported Coated Open Tubular) – kolone sa unutrašnjim zidom prevučeni stacionarnom likvidnom fazom i spraseni inertnim nosačem. Osnovna prednost ovog tipa kapilarnih kolona je mogućnost vezivanja većeg broja stacionarnih faza za stopljenu siliku, dok je nedostatak problem inertnosti nosača.
- **Mikropakovane kapilarne kolone** – kod kojih je celokupna unutrašnjost ispunjena inertnim nosačem impregniranim stacionarnom likvidnom fazom.

Osnovne karakteristike kapilarnih kolona su: dužina, unutrašnji prečnik (inner diameter – i.d.), vrsta stacionarne faze, polarnost i debljina filma stacionarne faze.

Izbor kolone, odnosno njenih karakteristika, zavisi pre svega od vrste i sastava uzorka, kao i od detektora.

Uobičajena dužina kapilarnih kolona za rad sa CG-MS je 25–60 m, dok se duže primenjuju pri analizu kompleksnih smeša. Dupliranjem dužine kolone povećava se rezolucija za 1,4 ($\sqrt{2}$) puta, a vreme izotermalne analize se udvostručava (retenciono vreme je direktno proporcionalno dužini kolone). Kraće kolone su poželjne za jednostavnije separacije, ali upotreba kratkih kolona je limitirana maksimalnim protokom koji može da se koristi pri radu sa MS.

Po veličini unutrašnjeg prečnika kapilarne kolone se mogu podeliti na:

- „microbore“ kapilarne kolone sa mikro otvorom – i.d. $\leq 0,1$ mm
- „narrowbore“ kapilarne kolone sa uskim otvorom – i.d. 0,18–0,32 mm
- „megabore“ kapilarne kolone sa velikim otvorom – i.d. = 0,53 mm

Za direktno vezivanje GC i MS koriste se kolone unutrašnjeg prečnika do 0,32 mm. „Megabore“ kolone se uglavnom koriste umesto punjenih kolona u specijalno dizajniranim GC.

Unutrašnji prečnik kolone utiče na efikasnost razdvajanja i vreme trajanja analize. U cilju dobijanja što više rezolucije treba koristiti kolone sa manjim unutrašnjim prečnikom, pri čemu se i vreme analize povećava.

2.6.3.1. Stacionarne faze

Najčešće se kao stacionarne likvidne faze koriste visokomolekularna jedinjenja dobijena polimerizacijom, polikondenzacijom ili poliestifikacijom organskih ili silicijumovih jedinjenja, kao i organosilicijumovih jedinjenja (Marjanović, 2001).

Osnovni zahtevi koje treba da zadovolje stacionarne likvidne faze su: nizak napon pare i nizak viskozitet na radnoj temperaturi, hemijska stabilnost na povišenim temperaturama, odgovarajuća rastvorljivost supstanci iz smeše, dobro pokrivanje (adhezija) zidova kolone, dobra rastvorljivost u uobičajenim isparljivim rastvaračima i dobra selektivnost.

Stacionarnih likvidnih faza ima veoma mnogo, ali su one slične i mogu se zamenjivati jedna drugom. Po pravilu se primarni izbor stacionarne likvidne faze izvodi na bazi McReynoldsovih konstanti. Kako se eksperimentalni uslovi razlikuju od onih pri kojima su određivane McReynoldsove konstante, sledi dalji naknadni odabir i optimizacija uslova hromatografskog razdvajanja (Yancey, 1977).

Na kolonama sa stacionarnim likvidnim fazama od polietilenglikola metilestri masnih kiselina sa 4–24 ugljenikova atoma se mogu razdvojiti prema broju C-atoma (dužini ugljovodoničnog niza) i stepenu nezasićenosti, dok se zadovoljavajuće razdvajanje *cis* i *trans* izomera ne može postići. Takođe, problemi se javljaju i kod analize složenih smeša kao što su riblja ulja. Kolone sa stacionarnim likvidnim fazama srednje polarnosti se mogu koristiti za rutinske analize biljnih ulja i životinjskih masti, na primer mlečne masti, kao i proizvoda koji ih sadrže (margarin, puter, namazi i slično).

Kapilarne kolone sa visokopolarnim cijanosilikonskim stacionarnim likvidnim fazama, sa različitim udelom cijanopropil-grupa, omogućuju analizu kompleksnih smeša masnih kiselina i dobro razdvajanje metilestara polinezasićenih omega-3 masnih kiselina, kao i geometrijskih i

pozicionih izomera masnih kiselina, što je uslovljeno jačom interakcijom *cis* izomera sa cijano-dipolom pa se tako *trans* oblici eluiraju pre odgovarajućih *cis* oblika (David *et al.*, 2005).

Za efikasno razdvajanje *cis* i *trans* masnih kiselina, osim kvaliteta stacionarne likvidne faze, važni su i dužina i unutrašnji prečnik kolone i debljina filma stacionarne likvidne faze.

U tabeli 2.7. je dat pregled kolona koje se najčešće koriste pri gasnohromatografskoj analizi metilestara masnih kiselina (fatty acid methyl esters FAMES).

Tabela 2.7. Pregled kolona koje se najčešće koriste u GC analizi metilestara masnih kiselina

Naziv kolone	Stacionarna likvidna faza	Primena	Slične kapilarne kolone drugih proizvođača
nepolarne			
SPB-1	hemijski vezana poli (dimetil-siloksan)	razdvajanje po tačkama ključanja, analiza bakterijskih masnih kiselina	-
srednje polarne			
SUPELCOWAX 10	hemijski vezana polietilenglikolna (PEG)	analiza FAMES razdvajanje po dužini lanca i stepenu nezasićenosti	HP-Wax, HP-INNOWax, DB-WAX, DB-WAXetr, AT-Wax, CP-Wax 52CB, Stabilwax, BP-20; ekvivalentna punjenj koloni CARBOWAX 20M
Omegawax (250, 320, ili 530)	hemijski vezana polietilenglikolna (PEG)	analiza FAMES omega 3 i 6	-
Nukol	hemijski vezana PEG sa inkorporiranim kiselim funkcionalnim grupama – modifikovan nitrotereftalnom kiselinom	analiza FAMES i slobodnih kiselina	HP-FFAP, DB-FFAP, AT-1000, CP-Wax 58CB, Stabilwax-DA, BP-21; ekvivalentna punjenj koloni SP-1000
HP-INNOWax	hemijski vezana PEG	analiza slobodnih masnih kiselina, FAMES i dr.	HP-20M, DB-WAXetr, CP-Wax 52CB, Stabilwax, BP-20, SUPELCOWAX 10
HP-FFAP	hemijski vezana PEG modifikovan nitrotereftalnom kiselinom	analiza isparljivih kiselina, slobodnih masnih kiselina, fenola i dr.	DB-FFAP, AT-1000, CP-Wax 58CB, Stabilwax-DA, BP-21, Nukol
SPB-225	hemijski vezana 50% cijanopropilfenil-metilpolisiloksan	razdvajanje <i>cis</i> i <i>trans</i> FAMES	HP-225, DB-225, AT-225, CP-Sil 43CB, RTx-225, BP-225
DB-225	hemijski vezana (50% cijanopropilfenil)-dimetilpolisiloksan	razdvajanje <i>cis</i> i <i>trans</i> FAMES	AT-225, CP-Sil 43CB, RTx-225, BP-225, SP-2330
visokopolarne			
SP-2330	nevezana poli (80% <i>bis</i> -cijanopropil/20% cijanopropilfenil-siloksan)	razdvajanje geometrijskih izomera FAMES	DB-23, AT-Silar, CP-Sil 84, RTx-2330, BPX-70

Nastavak tabele 2.7.

Naziv kolone	Stacionarna likvidna faza	Primena	Slične kapilarne kolone drugih proizvođača
SP-2380	stabilizovana poli (90% <i>bis</i> -cijanopropil/ 10% cijanopropilfenil-siloksan)	razdvajanje grupe geometrijskih (<i>cis/trans</i>) izomera FAMEs	HP-23, DB-23, CP-Sil 88, RTx-2330
SP-2340	nevezana poli (<i>bis</i> -cijanopropil-siloksan)	razdvajanje geometrijskih izomera FAMEs	CP-Sil 88, RTx-2330
SP-2560	nevezana <i>bis</i> -cijanopropil-polisiloksan	maksimum razdvajanja <i>cis/trans</i> i pozicionih izomera FAMEs	-
BPX-70	hemijski vezana 70% cijanopropil-polisilfenilensiloksan	FAMEs <i>cis/trans</i>	DB-23, CP-Sil 88, RTx-2330, SP-2330, SP-2380
DB-23	hemijski vezana (50% cijanopropil) metilpolisiloksan	FAMEs <i>cis/trans</i>	AT-Silar, CP-Sil 88, RTx-2330, BPX-70, SP-2330, SP-2340
HP-88	(88% cijanopropil)-metilarilpolisiloksan	FAMEs <i>cis/trans</i>	AT-Silar, CP-Sil 88, RTx-2330, BPX-70, SP-2330, SP-2340, SP-2560
<i>punjene kolone</i>			
OV-275	15% OV-275 (dicijanoalil) inertni nosač: 100–120 mesh Chromosorb P AW-DMCS	FAMEs <i>cis/trans</i>	-

Oznake u nazivu kolona upućuju na proizvođača:

SP – SUPELCO, HP/DB – Agilent/J&W, AT – Alltech, CP – Chrompack, RT – Restek, BP – SGE

Danas se za najprogresivnije kolone u analitici TFA smatraju SP-2560, SP-2380, BPX-70 i CP- Sil 88, dužine 100 m.

U ovom radu je korišćena kolona SP-2560, dužine 100 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm i debljine filma stacionarne faze koja nije hemijski vezana za stopljenu siliku, 0,20 μ m. Prema literaturi, ova kolona omogućuje maksimalnu rezoluciju geometrijskih (*cis* i *trans*) i pozicionih izomera masnih kiselina (Juanéda, 2007, Delmonte & Rader 2007, David *et al.*, 2005).

2.6.3.1.1. Debljina filma stacionarne faze

Varijacije debljine filma pri konstantnom unutrašnjem prečniku i dužini kolone pružaju korisniku mogućnost ispunjavanja specijalnih separacionih zahteva.

Debljina sloja stacionarne likvidne faze (d_f) značajno utiče na visinu ekvivalenta teorijskog poda, odnosno na efikasnost hromatografskog razdvajanja. Kako je po Van Deemterovoj jednačini visina ekvivalenta teorijskog poda upravo proporcionalna kvadratu debljine sloja stacionarne likvidne faze, sa smanjenjem d_f dolazi do značajnog povećanja efikasnosti hromatografskog razdvajanja.

Pravilo je da se deblji filmovi koriste za isparljive komponente, a tanji za komponente sa visokom tačkom ključanja. Kolone sa debljinom filma $< 1,0 \mu\text{m}$ koriste se za razdvajanje komponenti sa veoma niskom tačkom ključanja. Za određivanje ostalih komponenti u tragovima GC-MS analizom koriste se kolone sa debljinom filma od oko $0,1\text{--}0,2 \mu\text{m}$. Kolone sa tanjim filmom omogućavaju rad pri višim temperaturnim opsezima bez krvarenja kolone, ali im je kapacitet niži.

2.6.3.2. Kapacitet kolone

Pod kapacitetom kolone se podrazumeva maksimalna količina analita sa kojim faza može da bude ispunjena. Ukoliko se u kolonu unese veća količina uzorka dolazi do pojave asimetričnih i razvučenih pikova. Kapacitet kolone zavisi od: unutrašnjeg prečnika, debljine filma i rastvorljivosti supstance u stacionarnoj fazi. Što je veći unutrašnji prečnik kolone i debljina filma to je veći i kapacitet kolone, ali je efikasnost razdvajanja manja.

2.6.4. Vezivanje GC i MS

Kao što je već napomenuto, osnovni problem pri vezivanju GC i MS bila je velika razlika pritisaka. Dok u MS vlada visoki vakuum, na izlazu iz GC kolone pritisak je nešto iznad atmosferskog. Da bi se ova razlika pritisaka kompenzovala i istovremeno povećala koncentracija analita koji dospevaju u jonski izvor masenog spektrometra, koristili su se separatori. Zadatak separatora je selektivno uklanjanje malih molekula (atoma) gasa nosača iz eluata i propuštanje znatno većih organskih molekula u jonski izvor. Problem je što neminovno dolazi i do gubitka analita i to u visokom procentu (oko $40\text{--}80\%$).

Razvojem kapilarnih kolona omogućeno je direktno vezivanje, odnosno uvođenje analita iz kolone u jonski izvor, tako da separatori danas imaju samo istorijski značaj.

Danas samo GC sistemi koji koriste punjene kolone sa protokom oko 10 ml/min , ili „megabore“ kapilarne kolone (i.d. = $0,53 \text{ mm}$) zahtevaju poseban način vezivanja GC i MS, odnosno takozvano otvoreno split-vezivanje (open split coupling) (Hübschmann, 2001).

Kod direktnog vezivanja, kraj kapilarne kolone se direktno uvodi u jonski izvor masenog spektrometra tako da celokupna količina analita dospeva u MS što je od izuzetnog značaja pri analizi supstanci u tragovima. Osnovni nedostaci direktnog vezivanja su:

- pri zameni kolone mora se isključiti maseni spektrometar,
- protok gasa nosača u jonskom izvoru nije konstantan jer zavisi od primenjenog GC temperaturnog programa kao i od dimenzija kolone,
- ne mogu se direktno porediti retenciona vremena dobijena upotrebom klasičnih detektora i
- izbor kolone (dimenzije), kao i optimalni protok su limitirani na maksimalni protok pri kojem maseni spektrometar može da radi.

2.6.5. Jonski izvor

Osnovna uloga jonskog izvora je obrazovanje jona čiji sastav mora odgovarati sastavu uzorka. Pored toga jonski izvor mora da omogući nastajanje što većeg broja jona iz neutralnih čestica kako bi se povećala osetljivost, odnosno smanjila potrebna količina uzorka; nastali joni moraju imati što uniformniju energiju; jonska struja mora biti stabilna i fon (joni i čestice koji ne potiču iz uzorka) jonskog izvora mora biti što manji (Marsel, 1977).

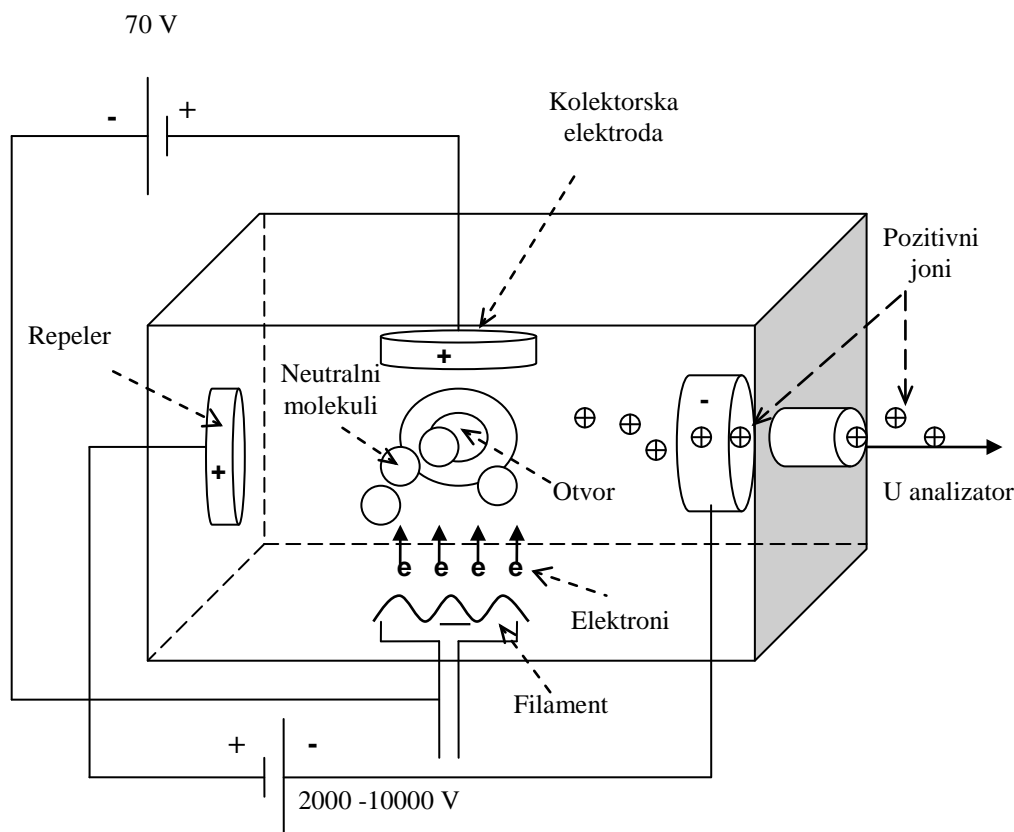
Proces jonizacije je složen zbog viška unutrašnje energije koja se saopštava molekulu uzorka, usled čega dolazi do pojave različitih vrsta jona u masenom spektru kao što su: molekulski joni, fragmentni joni, preuređeni joni, višestruko naelektrisani joni i metastabilni joni. Svaki od nastalih jona u masenom spektru nosi određene informacije o uzorku i time omogućuje kvalitativnu analizu, odnosno identifikaciju nepoznatog jedinjenja.

Postoji velik broj jonizacionih tehnika, neke od njih su:

- Jonizacija elektronima (Electron Impact – EI)
- Hemijska jonizacija (Chemical Ionization – CI)
- Jonizacija u električnom polju (Field Ionization – FI)
- Jonizacija desorpcijom (Field Desorption – FD)
- Jonizacija varnicom (Spark Source – SS)
- Bombardovanje atomima (Fast atom bombardment – FAB)
- Jonizacija potpomognuta laserskom desorpcijom iz matriksa (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – MALDI).

Izbor tehnike jonizacije pre svega zavisi od cilja analize, kao i od vrste uzorka. Ipak, može se reći da je jonizacija elektronima standardna jonizaciona tehnika u GC–MS.

Jonizacija elektronima je najčešće korišćena jonizaciona tehnika. Jonski izvor za jonizaciju elektronima (slika 2.12.) se sastoji iz evakuisane komore na čijoj se jednoj strani nalazi filament – usijano vlakno od volframa ili renijuma (katoda), a na suprotnoj, pozitivno naelektrisana ploča (anoda). Usijana katoda emituje elektrone koje privlači anoda pri čemu je energija elektrona određena razlikom potencijala između elektroda. Koristi se visoka energija elektrona (70 eV) usled čega nastaje veoma velik broj jona. Kako bi se povećala verovatnoća sudara elektrona i molekula u jonski izvor se postavlja permanentni magnet čije je magnetno polje upravno na električno. Rezultantno električno i magnetno polje uzrokuje helikoidalnu putanju elektrona, čime se povećava verovatnoća nastajanja molekulskih jona. Obrazovani joni se potiskuju iz jonskog izvora i na putu ka masenom analizatoru nailaze na uzani razrez. Između jonske komore i razreza postoji potencijalna razlika od 2000–10000 V, usled čega se joni ubrzavaju i ulaze u maseni analizator.



Slika 2.12. Jonizacija elektronima

Jonizacija elektronima spada u takozvane „teške“ jonizacione tehnike jer zbog visoke primenjene energije nastaje veoma velik broj jona. Molekulski jon je obično slabog intenziteta i teško se uočava, ali zato prisustvo velikog broja ostalih jona omogućava ispitivanje strukture

molekula. Sve komercijalno dostupne baze podataka (biblioteke) sadrže masene spektre dobijene jonizacijom elektronima (Hübschmann, 2001).

Za dobijanje ujednačenih masenih spektara neophodan je korektan rad jonskog izvora, te on mora biti čist i temperaturno uravnotežen. Promene protoka gasa nosača takođe utiču na rad jonskog izvora.

Pri određivanju masnih kiselina GC–MS gotovo isključivo se primenjuje jonizacija elektronima, pri čemu je osnovni problem nemogućnost razlikovanja masenih spektara pozicionih i geometrijskih izomera metilestara mono- i polinezasićenih masnih kiselina. Upotrebom specifičnih kapilarnih kolona, na kojima se može postići razdvajanje pozicionih i geometrijskih izomera, ovaj problem se prevazilazi.

2.6.6. Maseni analizator

Osnovni zadatak masenog analizatora je da jone nastale u jonskom izvoru razdvoji na osnovu njihovog odnosa mase i naelektrisanja (m/z), tako da on predstavlja najznačajniji deo masenog spektrometra. Kada je reč o kombinaciji GC–MS, najčešće korišćeni maseni analizatori su:

- Kvadrupolni analizator,
- Jon trap analizator (IT),
- Analizator na bazi vremena preleta (Time Of Flight – TOF),
- Analizator sa dvostrukim fokusiranjem i
- Magnetni analizator.

Izbor masenog analizatora zavisi pre svega od njegovih karakteristika: rezolucije (moći razdvajanja), opsega masa koji može biti analiziran i brzine snimanja masenog spektra.

Značajnija karakteristika masenog analizatora je njegova rezolucija (R) koja je teoretski definisana kao najmanja razlika masa koje se još mogu razdvojiti. Maseni analizatori se dele na one sa visokom rezolucijom ($R > 10000$) i sa niskom rezolucijom (razdvajanje na osnovu nominalnih masa, jedinična masena rezolucija).

Određivanje rezolucije nekog masenog spektrometra u praksi se izvodi na osnovu dimenzija snimljenog signala (pika). Rezolucija se izračunava po izrazu 6:

$$R = \frac{x}{b_{1/2}} \cdot \frac{m}{\Delta m} \quad [6]$$

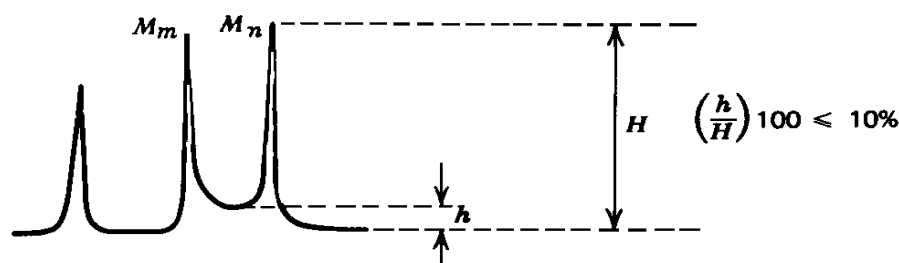
gde je: m – nominalna masa merenog pika

Δm – razlika masa između dva pika

x – rastojanje između maksimuma pikova i

$b_{1/2}$ – širina pika na polovini visine.

Ipak u praksi se mnogo češće koristi manje tačna definicija za rezoluciju, odnosno takozvana definicija udoline (Marsel, 1977), po kojoj su dva susedna pika razdvojena ukoliko je visina doline između njih manja od 10% (slika 2.13.).



Slika 2.13. Određivanje rezolucije po definiciji udoline

Za kvalitativna i kvantitavna određivanja primenom GC–MS, potrebna je rezolucija od 200 do 1000, odnosno maseni spektrometar niske rezolucije, dok je za određivanje tačnih masa jona neophodno koristiti MS visoke rezolucije koja se obično postiže sa masenim analizatorom sa dvostrukim fokusiranjem.

Kvadrupolni maseni analizator se najčešće koristi pri kombinaciji kapilarne gasne hromatografije i masene spektrometrije. Ovaj tip analizatora je korišćen i u ovom radu, te je detaljnije opisan.

Kvadrupolni maseni analizator (filtar) je najzastupljeniji pre svega zbog sledećih karakteristika:

- radi pri relativno niskom vakuumu (10^{-4} mbar),
- brzina skeniranja je velika,
- visoka osetljivost (velik broj jona nastalih u jonskom izvoru stiže do detektora),
- rutinske analize se izvode u opsegu do vrednosti $m/z = 500\text{--}3000$, što predstavlja oblast ispitivanja praktično svih proteina i biomolekula,
- male dimenzije i
- relativno niska cena.

Može se reći da je zbog navedenih karakteristika ovaj tip analizatora idealan za vezivanje sa gasnim hromatografom.

Kvadrupolni analizator (slika 2.14.) se sastoji od četiri paralelne elektrode (dužine 10–25 cm) kojima se saopštava osnovni potencijal koji se sastoji od dc – jednosmernog i ac – naizmjeničnog potencijala (izraz 7):

$$\pm\Phi = U + V \cos \omega t \quad [7]$$

gde je: Φ – osnovni potencijal

U – jednosmerni potencijal

V – amplituda naizmjeničnog potencijala,

ω – frekvencija naizmjeničnog potencijala i

t – vreme.

Osnovni potencijal dve susedne elektrode razlikuje se samo po predznaku ($+\Phi$ i $-\Phi$). Za zadate vrednosti U , V i ω samo joni određene m/z vrednosti imaju stabilnu putanju (kreću se stojećim trodimenzionalnim talasom) i prolaze kroz kvadrupolni filter, dok ostali bivaju razelektrisani na elektrodama.

Naime, joni pod dejstvom kvadrupolnog polja osciluju u pravcu x i y ose, i kako poseduju neku početnu brzinu zbog potiskivanja iz jonskog izvora oni će oscilovati u pravcu z ose duž elektroda do detektora (kolektora). Da bi joni stigli na kolektor moraju oscilovati duž pravca z takvom amplitudom da ne budu privučeni od strane elektroda.

Praktično pod dejstvom radiofrekventnog potencijala joni određenog odnosa m/z bivaju naizmjenično fokusirani u različitim ravnima. U prvoj polovini radiofrekventnog ciklusa gornja i donja elektroda su na pozitivnom potencijalu, dok su leva i desna na negativnom potencijalu, usled čega joni bivaju potisnuti u horizontalnu ravan. U drugoj polovini ciklusa polarnost elektroda je obrnuta, što menja električno polje i fokusira jone u vertikalnoj ravni.

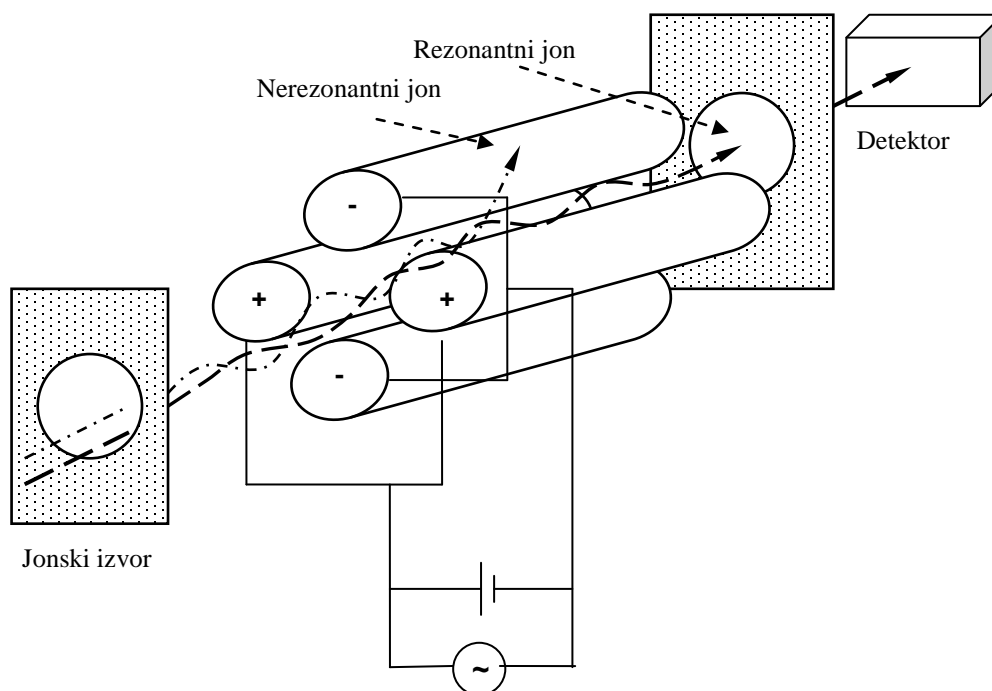
Usled ovakvog dejstva kvadrupolnog polja dolazi do složenog kretanja jona, odnosno nastaje trodimenzionalni talas. Amplituda trodimenzionalnog talasa zavisi od odnosa m/z datog jona, primenjenog potencijala i frekvencije naizmjeničnog potencijala, te kvadrupolno polje propušta samo određene jone.

Izborom odgovarajuće frekvencije radiofrekventnog polja i potencijala, kvadrupolni analizator deluje kao filter za veće jone. Joni većeg odnosa m/z prolaze kroz analizator (stižu do detektora), dok joni manjih odnosa m/z imaju veće ubrzanje pa im je amplituda talasa veća, te bivaju privučeni od strane elektroda. Jednosmerni napon, koji se takođe saopštava elektrodama, u kombinaciji sa naizmjeničnim deluje kao filter za propuštanje manjih jona. S obzirom da oni

brzo reaguju na promene radiofrekventnog polja, kretanje jona sa manjim odnosom m/z je dominantnije sa promenom ovog polja, jer se brže refokusiraju sa promenom polariteta, tako da jednosmerni napon ne utiče značajno na ove jone. Joni većeg odnosa m/z se ne refokusiraju tom brzinom tokom radiofrekventnog ciklusa, tako da jednosmerni potencijal ima mnogo veći uticaj na njihovu putanju, polako se usmeravaju dalje od centra kvadrupola, tako da pri kraju analizatora bivaju privučeni od strane elektroda.

Snimanje masenog spektra se izvodi promenom jednosmerne i naizmjenične komponente napona, pri čemu je njihov odnos konstantan (Silverstein & Webster, 1997).

Kvadrupolni analizator spada u analizatore niske rezolucije. Rezolucija kod ovih instrumenata zavisi pre svega od položaja i radijalne brzine jona koji stižu u analizator, kao i od geometrije i položaja elektroda koja mora biti vrlo precizna, a sama površina elektroda dobro provodljiva (već tragovi ulja od pumpi, onečišćenja iz GC kolone ili uzorka na površini mogu poremetiti simetriju električnih polja i time uticati na performanse spektrometra). Za postizanje visoke rezolucije bile bi potrebne uniformne i paralelne elektrode od više metara sa tolerancijom od nekoliko mikrometara.



Slika 2.14. Kvadrupolni analizator

2.6.7. Detektori masenih spektrometara

Nakon razdvajanja jonskih vrsta u masenom analizatoru, njihovo prisustvo je potrebno detektovati, a količinu izmeriti. Detekcija se najčešće izvodi električnim putem, merenjem ukupne jonske struje (abundance). Dva najčešće korišćena detektora su: elektronmultiplikator (electron multiplier) i fotomultiplikator (photomultiplier conversion dynode).

Princip rada elektronmultiplikatora zasniva se na upotrebi više uzastopnih „Faradejevih kapa“, dinoda (8–20) sa rastućim potencijalom. Jonski zrak iz masenog analizatora (sa energijom 4000–8000 eV) pada na elektrodu („Faradejeva kapa“) multiplikatora i izbija elektrone (obično 1–2 elektrona po jonu). Oni se ubrzavaju prema sledećoj „Faradejevoj kapi“ koja je na višem pozitivnom potencijalu u odnosu na prethodnu, usled čega dolazi do emisije još većeg broja elektrona, i tako redom. Elektronmultiplikator ostvaruje pojačanje ulaznog signala do 10^{12} , što mu obezbeđuje visoku osetljivost. Najveća osetljivost se postiže pri maksimalnom naponu od 3000 V, ali rad na ovako visokom naponu znatno smanjuje vek trajanja samog detektora.

Za razliku od elektronmultiplikatora, kod fotomultiplikatora joni koji izlaze iz masenog analizatora bivaju prevedeni u fotone i potom detektovani. Fotomultiplikator ima duži vek trajanja u odnosu na elektronmultiplikator, ali manju osetljivost.

2.6.8. Vakuumski sistem

Svi maseni spektrometri rade pri visokom vakuumu, kako bi se redukovala mogućnost sudara jona nastalih u jonskom izvoru sa drugim molekulima u masenom analizatoru.

Svaki sudar bi mogao uzrokovati dalje reakcije jona, usled čega bi se dobijali neadekvatni maseni spektri, odnosno interferencije bi bile velike. U zavisnosti od geometrije samog uređaja neophodno je obezbediti vakuum, odnosno pritisak reda veličine 10^{-2} – 10^{-7} mbar, zbog čega je neophodno korišćenje dve pumpe: predpumpe i osnovne pumpe. Mehanička predpumpa smanjuje pritisak na 10^{-3} mbar, nakon čega se uključuje druga pumpa. Kao osnovne pumpe se koriste difuzione ili turbomolekularne pumpe. Osnovna prednost turbomolekularnih pumpi je da ne sadrže ulje, tako da ne dolazi do kontaminacije masenog analizatora. Stoga novije generacije GC–MS instrumenata koriste turbomolekularne pumpe.

2.6.9. Uloga računara u GC–MS analizi

Računar, koji se nalazi u sklopu sistema GC–MS, ima dvostruku ulogu:

1. kontrole rada GC i MS i
2. prikupljanja i obrade podataka.

Računar u GC–MS analizi ima sledeće zadatke: kontrola i vođenje rada instrumenata; snimanje i primarna obrada spektara; interpretacija, katalogizacija i prepoznavanje spektara; teorijska interpretacija i prikazivanje spektara i hromatograma i numeričko računanje vezano za primenu MS i kvantifikaciju hromatograma od integracije do računanja sadržaja različitim metodama.

Pri tome računar mora „preduzeti“ sledeće korake:

- da igra ulogu „inteligentnog“ sistema za registrovanje, sortiranje i obradu spektara i hromatograma,
- da u izvesnoj meri zameni ili barem pojednostavi "posluživanje" MS (automatska regulacija),
- da preuzme velikim delom interpretaciju dobijenih spektara i
- da preuzme velikim delom interpretaciju dobijenih hromatograma.

Da bi se sve to moglo ostvariti, računaru su pored podataka iz MS potrebni i drugi izvori informacija (dokumentacija, komercijalne i sopstvene banke podataka).

S obzirom na veliki broj podataka koji se dobija tokom GC–MS analize, veoma bitna karakteristika računara je velika brzina zapisivanja podataka, tako da je razvoj računarskih sistema veoma doprineo razvoju i ekspanziji GC–MS.

2.6.10. Kalibracija masenog spektrometra

Maseni spektrometar je spreman za rad nakon uravnoteženja, odnosno postizanja stabilne temperature i pritiska. Minimalno potrebno vreme za uravnoteženje MS je 4 časa (HP59970 MS ChemStation Handbook, 1998), ali u praksi se najčešće uravnoteženje izvodi tokom 24 časa.

U cilju postizanja optimalnih rezultata GC–MS analizom neophodno je izvesti kalibraciju masenog spektrometra nakon njegovog uravnoteženja. Proces kalibracije je neophodan da bi se mogla izvoditi pouzdana kvalitativna analiza, odnosno poređenje dobijenog masenog spektra sa masenim spektrima u biblioteci, odnosno bazi podataka (Hübschmann, 2001).

Kao referentna supstanca za kalibraciju kvadrupolnih i ion trap instrumenata najčešće se koristi perfluorotributilamin – PFTBA (Hübschmann, 2001).

Tokom kalibracije dolazi do podešavanja brojnih parametara masenog spektrometra kao što su napon ili struja u jonskom izvoru, masenom analizatoru i detektoru (elektronmultiplikatoru), u cilju podešavanja same „masene“ skale. Kalibracija se najčešće izvodi automatski, odnosno korišćenjem programa proizvođača opreme (autotune).

Tokom kalibracije najčešće dolazi do podešavanja i optimizacije parametara sledećih delova masenog spektrometra (HP59970 MS ChemStation Handbook, 1998):

Jonski izvor

- Repeler – u cilju postizanja optimalne osetljivosti i rezolucije podešava se optimalni napon repelera. Naime, ukoliko je napon repelera nizak mali broj jona će izlaziti iz jonskog izvora i ulaziti u analizator, tako da će osetljivost biti mala. Sa druge strane, ukoliko je napon previsok, veliki broj jona velikom brzinom izlazi iz jonskog izvora u analizator usled čega će rezolucija biti loša.
- Fokusrajuće sočivo (ion focus lens) – koristi se u cilju postizanja iste osetljivosti za jone različitih masa. Povećanjem napona raste osetljivost za jone sa manjom masom, a smanjenjem raste osetljivosti za jone većih masa.
- Izlazno sočivo iz jonskog izvora, odnosno ulazno u analizator, (entrance lens) – ima dva različita parametra. Entrance lens gain – primenjuje se varirajući napon u zavisnosti od mase jona. Entrance lens offset – primenjuje se konstantan napon koji u stvari limitira prethodni parametar. Sa povećanjem ovog napona dolazi do povećanja abundance jona sa manjim masama, ali ne dolazi do smanjenja abundance jona sa većim masama.

Maseni analizator

- AMU gain – utiče na odnos jednosmernog i radiofrekventnog napona, odnosno kontroliše širinu masenog pika. Što je veća vrednost ovog parametra maseni pikovi su uži. Promene ovog parametra mnogo više utiču na pikove jona sa većim masama.

- AMU offset – ovaj parametar takođe utiče na odnos jednosmernog i radiofrekventnog napona, odnosno kontroliše širinu masenog pika, s tom razlikom što promene ovog parametra podjednako utiču na širinu pika (bez obzira na njegovu masu).
- Širina pika mase 219 – ovaj parametar dovodi do malih promena širine pika mase 219 električnim putem. Kada se ovaj signal promeni dolazi do ponovnog podešavanja AMU gain i AMU offset parametara.

Detektor

- Napon elektronmultiplikatora – kreće se u intervalu od 1200 do 3000 V. Optimalna vrednost zavisi od broja dinoda, a najčešće je 1500–1800 V.

Tokom kalibracije prikupljaju se svi podaci i bivaju sačuvani u vidu tabele (izveštaja), na osnovu čega analitičar koristeći dijagnostičke kriterijume zaključuje u kakvom stanju se nalazi maseni spektrometar.

Promene temperature jonskog izvora u velikoj meri utiču na kalibraciju (Hübschmann, 2001). Temperaturne promene su česte dok se ne postigne visoka stabilnost, što može trajati nedeljama. Zato je neophodno izvoditi kalibraciju masenog spektrometra svakodnevno.

2.6.11. Merne tehnike u GC–MS analizi

Pri radu sa kvadrupolnim masenim spektrometrom moguća su dva načina prikupljanja podataka tokom hromatografske analize:

1. SCAN – snimanje kompletnog masenog spektra i
2. SIM (Selected Ion Monitoring) – praćenje određenih jona.

SCAN tehnika podrazumeva snimanje kompletnog masenog spektara, odnosno praćenje masa u određenom opsegu (npr. m/z 30–500) uz simultano praćenje retencionog vremena što omogućuje identifikaciju analita na osnovu masenog spektra i retencionog vremena. Ova tehnika se prvenstveno koristi za kvalitativnu anлізу.

Osetljivost koja se postiže SCAN tehnikom u kvantitativnoj analizi zavisi od efikasnosti jonskog izvora, stanja analizatora i najviše od vremena praćenja jona (dwell time). Kod SCAN tehnike vreme praćenja pojedinačne mase je određeno zadatim masenim opsegom (npr. m/z 50–

550) i brzinom skeniranja (npr. 500 ms). Tokom jednog ciklusa svaka masa iz zadatog opsega se registruje samo jednom, a ciklusi se ponavljaju tokom hromatografisanja.

Tipična osetljivost kvadrupolnih masenih spektrometara je oko 1 ng za većinu supstanci (Hübschmann, 2001). U praksi se najčešće koristi brzina skeniranja od 0,5–1 scan/s.

Ukupne abundance sabrane tokom analize, prikazane u funkciji vremena predstavljaju totalni jonski hromatogram (TIC), koji kao i svi hromatogrami dobijeni tehnikom pri konstantnoj dužini, sadrži podatke o kvalitetu (retenciona vremena) i podatke o kvantitetu (površina zahvaćena pikom). Svaka tačka u TIC predstavlja zbir abundanci svih detektovanih jona, a istovremeno u memoriji računara (najčešće na hard disku) za svaku tačku postoji ceo maseni spektar dobijen SCAN tehnikom. Na bazi ovih podataka moguće je prikazati i jonski hromatogram (IC). Upotrebom IC znatno se povećava selektivnost, čak i kod pikova koji se preklapaju u velikoj meri, ukoliko su karakteristični joni posmatranih komponenti različiti.

SIM tehnika – detektuju se samo m/z vrednosti jona reprezentativnih za određeni molekul, tako da se povećava vreme praćenja određenog jona, a samim tim i osetljivost za 100 do 1000 puta, tako da se SIM tehnika prvenstveno koristi za kvantitativna određivanja i to elemenata u tragovima.

Pre izvođenja analize SIM tehnikom neophodno je izvesti analizu SCAN tehnikom koja je osnov za optimizaciju uslova SIM tehnike. Karakteristične veličine koje treba odabrati su: karakteristični joni za pojedinačne komponente, vreme početka snimanja jona (start time) i vreme praćenja jona (dwell time), tako da je neophodno poznavati izgled masenog spektra i samog hromatografskog pika za svaku posmatranu komponentu.

Pri određivanju komponenti u tragovima SIM tehnika se koristi i za kvalitativno određivanje. S obzirom da identifikacija nije moguća poređenjem masenih spektara osnovna kvalitativna karakteristika je retenciono vreme, a za potvrdu se koriste relativni intenziteti odabranih jona i masa molekulskog jona, naravno ako je različita od mase ostalih molekulskih jona određivanih komponenti.

Pri određivanju masnih kiselina SIM tehnika se veoma retko koristi. Pojedini autori preporučuju primenu ove tehnike za pouzdano određivanje masnih kiselina koje se javljaju u malim količinama (ispod 1%) kao što su razgranate masne kiseline (Thurnhofer & Vetter, 2005; Thurnhofer *et al.*, 2008). Međutim, nedostatak SIM tehnike je to što se jednom razvijena metoda ne može u potpunosti preneti na drugi instrument zbog različitih parametara kao što su dizajn jonskog izvora i njegova temperatura. Metoda razvijena na jednom instrumentu ne može se primenjivati duži vremenski period jer se stanje jonskog izvora menja sa vremenom, što za posledicu ima promenu relativnih intenziteta odabranih jona.

2.6.12. PBM (Probability Based Matching) sistem

Pri identifikaciji komponenata, u okviru masene spektrometrije izvedene SCAN tehnikom, često se koristi postupak vrednovanja na bazi verovatnoće, koji je zasnovan na McLafferty-jevom algoritmu (McLafferty, 1980). PBM identifikacija se zasniva na poređenju nepoznatih spektara sa referentnim spektrima, koji se nalaze u postojećoj ili ranije formiranoj bazi podataka.

Dve karakteristike bitno razlikuju PBM sistem od ostalih sistema pretraživanja:

- PBM sistem ističe značaj vrednovanja kako mase, tako i abundance pri odabiru najznačajnijih pikova referentnog masenog spektra i
- PBM sistem primenjuje reversnu metodu pretraživanja, što omogućava upoređivanje celokupnog sadržaja biblioteke sa nepoznatim spektrom.

Reversnim pretraživanjem se utvrđuje da li su pikovi u referentnom masenom spektru prisutni u masenom spektru analita (HP59970 MS ChemStation Handbook, 1998). Višak pikova u nepoznatom spektru se ignoriše, što znači da maseni spektri smeše komponenata mogu biti analizirani.

Za razliku od PBM sistema, većina drugih sistema primenjuje metodu pretraživanja unapred, koja podrazumeva poređenje nepoznatog masenog spektra sa bibliotekom poznatih spektara.

U praksi, procenat verovatnoće koji se dobija PBM pretraživanjem u velikoj meri zavisi od kvaliteta masenog spektra koji zavisi od uslova pod kojima je analiza izvedena, izbora masenog spektra sa pika (uzlazni deo, maksimum ili silazni deo), koncentracije analita, kao i tipa masenog spektrometra. Zbog toga se u komercijalnim bazama podataka nalazi veći broj masenih spektara istog jedinjenja. I pored toga, moguće su greške u identifikaciji ukoliko se koristi samo komercijalna baza podataka, naročito u slučajevima kada se ispitivano jedinjenje ne nalazi u korišćenoj biblioteci. Zbog toga je komercijalne baze podataka najbolje dopuniti sopstvenim eksperimentalnim podacima, odnosno masenim spektrima dobijenim analizom standardnih supstanci i uzoraka.

3. Eksperimentalni deo

3.1. Aparatura

U radu je korišćena sledeća aparatura:

1. Gasni hromatograf Hewlett Packard (HP) 5890, serija, A sa pratećom opremom
2. Kapilarna kolona: SP-2560, dužina×unutrašnji prečnik: 100 m × 0,25 mm, materijal Fused Silica, debljina filma stacionarne likvidne faze 0,20 μm, hemijski nevezana faza visoke polarности, *bis*-cijanopropil-polisiloksan
3. Maseni detektor Hewlett Packard 5971A, sa pratećom opremom
4. Mikrošpricevi
 - 4.1. mikrošpric Hamilton 7000.5, V = 0,5 μl
 - 4.2. mikrošpric Hamilton 7001, V = 1 μl
5. Modifikovana mikrotalasna pećnica za domaćinstvo LG 800W
6. Aparatura za ekstrakciju po Soxhlet-u
7. Vakuum uparivač

3.2. Hemikalije, reagensi i standardi

1. *n*-heksan, Centrohem, Stara Pazova
2. Kalijum-hidroksid, Zorka, Šabac
3. Hlorovodonična kiselina, Zorka, Šabac
4. Metanol, Zorka, Šabac
5. Natrijum-sulfat bezvodni, Merck
6. rastvor 2 mol/dm³ KOH u metanolu

7. rastvor 1 mol/dm³ HCl u metanolu
8. FAME Mix RM-1, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA, Cat. No. 07006-1AMP: Methyl Palmitate, Methyl Stearate, *cis*-9-Oleic Methyl Ester, Methyl Linoleate, Methyl Linolenate, Methyl Arachidate
9. Grain Fatty Acid Methyl Ester Mix, Catalog No. 47801, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA, 10 mg/cm³ FAME standardne smeše u metilenhloridu:

1. Caprylic Acid Methyl Ester (C8:0)	1,9 %
2. Capric Acid Methyl Ester (C10:0)	3,2 %
3. Lauric Acid Methyl Ester (C12:0)	6,4 %
4. Tridecanoic Acid Methyl Ester (C13:0)	3,2 %
5. Myristic Acid Methyl Ester (C14:0)	3,2 %
6. Myristoleic Acid Methyl Ester (C14:1n9 <i>c</i>)	1,9 %
7. Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:0)	1,9 %
8. Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0)	13,0 %
9. Palmitoleic Acid Methyl Ester (C16:1n9 <i>c</i>)	6,4 %
10. Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0)	3,2 %
11. Stearic Acid Methyl Ester (C18:0)	6,5 %
12. Elaidic Acid Methyl Ester (C18:1n9 <i>t</i>)	2,6 %
13. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1n9 <i>c</i>)	19,6 %
14. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2n6 <i>c</i>)	13,0 %
15. Arahidic Acid Methyl Ester (C20:0)	1,9 %
16. <i>cis</i> -11-Eicosenoic Acid Methyl Ester (C20:1)	1,9 %
17. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:3n3)	6,4 %
18. Behenic Acid Methyl Ester (C22:0)	1,9 %
19. Erucic Acid Methyl Ester (C22:1n9)	1,9 %

10. Supelco 37 Component FAME Mix, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA, 10 mg/cm³ total, u metilenhloridu, Cat. No. 47885-U:

1. Butyric Acid Methyl Ester (C4:0)	4 %
2. Caproic Acid Methyl Ester (C6:0)	4 %
3. Caprylic Acid Methyl Ester (C8:0)	4 %
4. Capric Acid Methyl Ester (C10:0)	4 %
5. Undecanoic Acid Methyl Ester (C11:0)	2 %
6. Lauric Acid Methyl Ester (C12:0)	4 %
7. Tridecanoic Acid Methyl Ester (C13:0)	2 %
8. Myristic Acid Methyl Ester (C14:0)	4 %
9. Myristoleic Acid Methyl Ester (C14:1)	2 %
10. Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:0)	2 %

11. <i>cis</i> -10-Pentadecenoic Acid Methyl Ester (C15:1)	2 %
12. Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0)	6 %
13. Palmitoleic Acid Methyl Ester (C16:1)	2 %
14. Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0)	2 %
15. <i>cis</i> -10-Heptadecenoic Acid Methyl Ester (C17:1)	2 %
16. Stearic Acid Methyl Ester (C18:0)	4 %
17. Elaidic Acid Methyl Ester (C18:1n9 <i>t</i>)	2 %
18. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1n9 <i>c</i>)	4 %
19. Linolelaidic Acid Methyl Ester (C18:2n6 <i>t</i>)	2 %
20. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2n6 <i>c</i>)	2 %
21. Arachidic Acid Methyl Ester (C20:0)	4 %
22. γ -Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n6)	2 %
23. <i>cis</i> -11-Eicosenoic Acid Methyl Ester (C20:1)	2 %
24. Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n3)	2 %
25. Heneicosanoic Acid Methyl Ester (C21:0)	2 %
26. <i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester (C20:2)	2 %
27. Behenic Acid Methyl Ester (C22:0)	4 %
28. <i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n6)	2 %
29. Erucic Acid Methyl Ester (C22:1n9)	2 %
30. <i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n3)	2 %
31. Arachidonic Acid Methyl Ester (C20:4n6)	2 %
32. Tricosanoic Acid Methyl Ester (C23:0)	2 %
33. <i>cis</i> -13,16-Docosadienoic Acid Methyl Ester (C22:2)	2 %
34. Lignoceric Acid Methyl Ester (C24:0)	4 %
35. <i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester (C20:5n3)	2 %
36. Nervonic Acid Methyl Ester (C24:1)	2 %
37. <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid Methyl Ester (C22:6n3)	2 %

3.3. Uzorci

U okviru ovog rada analizirano je 273 uzoraka prikupljenih u periodu od juna 2006. do juna 2009. godine. Odabrani su uzorci u kojima se očekivalo prisustvo *trans* masnih kiselina, odnosno oni uzorci koji uobičajeno sadrže parcijalno hidrogenovana ulja i masti. Uzorci su dobijeni direktno od proizvođača, ili su uzeti sa tržišta iz različitih marketa na području Novog Sada. Svi uzorci su čuvani pri deklarisanim uslovima i analizirani su pre isteka roka trajanja.

Uzorci su podeljeni u sledeće grupe: jestiva ulja, namenske masti, masna punjenja, industrijski margarini, margarini za domaćinstvo, jestivi margarini, mlečni proizvodi i

konditorski proizvodi koji su obuhvatali slano trajno pecivo, čajno pecivo, tvrdi keks, vafel proizvode, čokoladne proizvode i karamele.

U tabeli 3.1. dat je prikaz vrste uzoraka po grupama, dok je u tabeli 3.2. dat pregled broja uzoraka po grupama korišćenih u ovom radu uz naznaku proizvođača.

Tabela 3.1. Pregled vrste uzoraka po grupama

Grupa uzoraka	Vrsta uzoraka
Ulja	suncokretovo, maslinovo, palmino i kokosovo ulje
Jestivi margarin	dobro jutro margarini: mlečni, dijet, lite, omegol i sa medom; rastimo, softi, laki, prijatno, rama classic, rama joghurt, sunce soft, sunce sendvič, polimark: extra i krem
Margarini za domaćinstvo	stoni margarini: classic, dijavit, panorama, margavita light, margavita sa aromom slatke pavlake; tečni margarin
Industrijski margarini	margarini za listnata testa: alfa, alfa+, aristo primure, aloha croissant i argenta croissant hydro free; margarini za kvasna listnata testa vita; margarini za konditorsku industriju: condy, gama, argenta pastry, argenta pastry HF i argenta pastry FF hydro fats; idustrijski margarini bez naznake upotrebe: biopek, unipek, liveni stoni margarin i liveni stoni M margarin
Namenske masti	jestive rafinisane biljne masti tačke topljenja 28–30°C, 30–32°C, 32–34°C, 34–36°C, 36–38°C i 38–40°C; jestive rafinisane biljne masti C, K, KM, S1, S2, S2V, SSH-EM, EK, SSH 34, SSH 34-E, SM, P, V, vitalpek i vitalina; palmstearin; rafinisana i hidrogenizovana kokosova mast i rafinisana palmina mast
Masna punjenja	bono, pionir, efekt: 03, 03LT, 40LT i 60LT
Mlečni proizvodi	punomasno mleko u prahu, maslac, krem maslac, krem sir, feta sir i biljni sir
Slano trajno pecivo	JOŠ: ugličići, perece, ribice i mix; Mc cracker: krekeri sa susamom i krekeri sa makom i lanom; Pardon: slani krompir crisps i originalne slane perece; Trik: krekeri, krekeri sa makom i ribice; Prima: slani štapići i štapići punjeni kikirikijem; Tak: slani kreker, ring slani kreker i ribice
Čajno pecivo	Mill's digestive; Wellness integralni keks: sa lešnikom, sa suvim grožđem, sa ovsenim pahuljicama i sa komadićima čokolade; plazma keks; mlevena plazma; mlevena plazma sa medom i cerealijama; čoko plazma; noblice; Kolo keks punjen čokoladom; mlečni keks; YOD'ORO spekulaas
Tvrđi keks	Zlatni pek; zlatni pek sa kakaom prelivom
Vafel proizvodi	YOD'ORO: napolitanke sa lešnikom i mlekom, kockice prelivene kakaom prelivom-jagoda, balans vafel sa kakaom i balans vafel sa jabukom i cimetom; Čoko vafel-proizvod sa kakaom prelivom; kockice vafela-prelivene
Čokoladni proizvodi	Čokolada: YOYO riža, Bungee sa mlekom, Bungee sa nugat punjenjem, bancia, JUHU mlečna, poslastina i mlečna; kokos vita – čokoladni desert sa kokos punjenjem, Scarlet – fondan proizvod sa čokoladnim prelivom; Praline classic – čokoladom preliveni fondan desert
Karamele	Kakao i mlečne karamele

Tabela 3.2. Pregled broja uzoraka po grupama uz naznaku proizvođača

Grupa uzoraka	Broj uzoraka	Proizvođač
Ulja	9	Polimark Zemun, Beograd
Jestivi margarin	28	Vital a.d., Fabrika ulja i biljnih masti, Vrbas
Margarini za domaćinstvo	15	Dijamant a.d., Industrija ulja, Zrenjanin
Industrijski margarini	27	Sunce a.d., Fabrika ulja i biljnih masti, Sombor
Namenske masti	76	
Masna punjenja	6	Pionir d.o.o., Privredno društvo za proizvodnju čokolade, bombona i peciva, Subotica Bunge Z.T. Kruzsvica, Poljska
Mlečni proizvodi	9	AD Mlekara, Subotica Novosadska mlekara AD, Novi Sad Somboled d.o.o., Sombor
Konditorski proizvodi		Bambi a.d., Požarevac AD Kompanija Fidelinka, Subotica Marbo d.o.o., Laktaši
Slano trajno pecivo	20	Banini AD, preduzeće za proizvodnju konditorskih proizvoda, Kikinda
Čajno pecivo	34	AD za proizvodnju konditorskih proizvoda Soko-
Tvrđi keks	9	Nada Štark, Beograd
Vafel proizvodi	19	Jaffa AD, Crvenka
Čokoladni proizvodi	17	Banat Konditorska industrija, Vršac
Karamele	4	

3.3.1. Priprema uzoraka

3.3.1.1. Određivanje sadržaja masti

Određivanje sadržaja ukupne masti u ispitivanim uzorcima je izvedeno u cilju izražavanja sadržaja masnih kiselina po 100 g proizvoda.

Određivanje sadržaja ukupne masti izvedeno je u Laboratoriji za ispitivanje prehrambenih proizvoda Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu primenom standardnih akreditovanih metoda (www.ats.rs/upload/dl/REGISTAR/LAB_ZA_ISPITIVANJE/01-059.pdf):

Ulja, masti i srodni proizvodi: Metoda SRPS E.K8.050:1997

Konditorski proizvodi: Metoda 4103 – Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama vršenja hemijskih i fizičkih analiza kakao-zrna, kakao-proizvoda, proizvoda sličnih čokoladi, bonbonskih proizvoda, krem proizvoda, keksa i proizvoda srodnih keksu, Službeni list SFRJ br. 41/87)

Mleko i mlečni proizvodi: Metoda 5.1. – Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mleka i proizvoda od mleka, (Službeni list SFRJ br. 32/1983).

3.3.1.2. Ekstrakcija lipida

Uzorci iz grupe ulja, namenskih masti, industrijskih margarina, margarina za domaćinstvo i jestivih margarina su bez prethodne ekstrakcije direktno prevedeni u metilestre. Uzorci iz grupe namenskih masti, industrijskih margarina, margarina za domaćinstvo i jestivih margarina su prethodno otopljeni u sušnici na 50–60°C. Za analizu uzoraka svih tipova margarina je uzeta gornja masna faza iz koje je po potrebi uklanjana voda bezvodnim natrijum-sulfatom. Svi ostali uzorci su homogenizovani u laboratorijskom avanu te je izvedena ekstrakcija lipida primenom metode po Soxhlet-u i/ili mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu.

3.3.1.2.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u

Za ekstrakciju po Soxhlet-u odmereno je 5 g prethodno homogenizovanog uzorka, a kao rastvarač korišćen je *n*-heksan u zapremini od 150 cm³. Vreme ekstrakcije je iznosilo oko 3,5 h (30–40 ciklusa/h), nakon čega je rastvarač uparen u vakuum uparivaču. Ukupno vreme trajanja ekstrakcije i uparavanja iznosilo je oko 4 h.

3.3.1.2.2. Mikrotalasna ekstrakcija u otvorenom sistemu

Postupak mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu u cilju daljeg određivanja metilestara masnih kiselina GC–MS je razvijen u okviru ovog rada, što je opisano u četvrtom poglavlju „Rezultati i diskusija“.

U ekstrakcionu posudu zapremine 60 cm³ odmereno je 1,5 g prethodno homogenizovanog uzorka i dodato je 5 cm³ *n*-heksana. Ekstrakciona posuda je postavljena u modifikovanu mikrotalasnu pećnicu za domaćinstvo, te je izvođena ekstrakcija tokom 5 min, pri konstantnoj snazi mikrotalasa od 800 W. Nakon toga ekstrakciona posuda je vađena iz mikrotalasne pećnice i nakon fazne separacije za dalju pripremu metilestara uziman je alikvot od 2,4 cm³.

3.3.1.3. Priprema metilestara masnih kiselina

Priprema metilestara masnih kiselina je izvedena brzom modifikovanom metodom (Kravić *et al.*, 2006). U epruvetu sa čepom pomoću staklenog štapića stavlja se 5 kapi (~ 150 mg) ekstrahovane masti iz uzorka i doda se 2,4 cm³ *n*-heksana i mućka dok se masti ne rastvore. Nakon primene mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu uzima se alikvot *n*-heksanske faze zapremine 2,4 cm³. Dalji postupak pripreme metilestara masnih kiselina je isti, doda se 0,6 cm³ 2 mol/dm³ KOH u metanolu i mućka 20 s. Potom se začepljena epruveta uranja u vodeno kupatilo zagrejano na 70 °C i drži 1 min; vreme se meri od momenta kada rastvor u epruveti počne da ključa. Epruveta se zatim mućka još 20 s. Doda se 1,2 cm³ 1 mol/dm³ HCl u metanolu, blago promućka i sačeka se da se sadržaj u epruveti rasloji. Pre nego što se dekantuje, doda se 3 cm³ *n*-heksana, a zatim, metilestri koji se nalaze u gornjem sloju dekantuju se u čistu epruvetu i razblaže *n*-heksanom do ukupne zapremine od oko 5 cm³.

3.3.1.4. Simultana mikrotalasna ekstrakcija i esterifikacija u otvorenom sistemu

Postupak izvođenja simultane mikrotalasne ekstrakcije i esterifikacije (SMEE) u otvorenom sistemu u cilju daljeg određivanja metilestara masnih kiselina GC–MS je razvijen u okviru ovog rada, što je opisano u okviru poglavlja „Rezultati i diskusija“.

U ekstrakcionu posude zapremine 60 cm³ odmereno je 1,5 g prethodno homogenizovanog uzorka i dodato 5 cm³ *n*-heksana i 1,2 cm³ rastvora KOH u metanolu koncentracije 2 mol/dm³. Ekstrakciona posuda je postavljena u modifikovanu mikrotalasnu pećnicu za domaćinstvo te je izvedna ekstrakcija u toku 5 min pri konstantnoj snazi mikrotalasa od 800 W. Nakon toga ekstrakciona posuda je vađena iz mikrotalasne pećnice i u nju je dodavano 2,4 cm³ 1 mol/dm³ HCl uz blago mešanje. Nakon fazne separacije gornji sloj u kom se nalaze metilestri je dekantovan u čistu epruvetu. Priprema uzorka za GC–MS analizu ukupno je trajala oko 10 min.

3.3.2. Analiza metilestara masnih kiselina gasnom hromatografijom–masenom spektrometrijom

U okviru ovog rada razvijena je GC–MS metoda koja se može primeniti u analizi sirovina, poluproizvoda i prehrambenih proizvoda u cilju definisanja sadržaja masnih kiselina,

uključujući i *trans* izomere masnih kiselina, što je opisano u okviru 4. poglavlja „Rezultati i diskusija“.

Za gasno hromatografsku analizu korišćena je zapremina uzorka od 1 µl pri čemu je odnos razdeljivanja iznosio 1:40. Za razdvajanje metilestara masnih kiselina korišćena je kapilarna kolona SP-2560 (Supelco), dužine 100 m, unutrašnjeg prečnika 0,25 mm, sa slojem stacionarne likvidne faze od 0,20 µm. Kao gas nosač korišćen je helijum, a odgovarajući protok iznosio je 0,58 cm³/min. Maseni spektri su snimani SCAN tehnikom, u intervalu *m/z* 40–400 a.m.u. (a.m.u. – atomic mass unit, jedinica atomske mase). Vreme kašnjenja zbog rastvarača (Solvent delay time) je iznosilo 12 min. Temperatura masenog spektrometra iznosila je 180°C, a temperatura injektora 230°C.

Analize su izvedene primenom sledećih temperaturnih programa:

Temperaturni program 1: početna temperatura kolone od 100°C održavana je 5 min, nakon čega je sledio porast temperature brzinom od 10°C/min do konačne temperature od 240°C koja je održavana narednih 10 min, ukupno vreme trajanja analize 30 min.

Temperaturni program 2: početna temperatura kolone od 100°C održavana je 5 min, nakon čega je sledio porast temperature brzinom od 6°C/min do konačne temperature od 240°C koja je održavana narednih 20 min, ukupno vreme trajanja analize 50 min.

3.3.3. Kvalitativno i kvantitativno određivanje

Kvalitativno određivanje je izvedeno na osnovu masenih spektara i retencionih vremena, pri čemu je korišćena sopstvena baza podataka „FAMES“, kao i komercijalna baza podataka „WILEY“.

Kvantitativno određivanje izvedeno je primenom modifikovane metode 100% (AOAC, 2000).

Relativni udeli pojedinih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima prehrambenih proizvoda su računati na osnovu izraza 8.

$$m_{u,i} = \frac{F'_i \cdot A_{u,i}}{\sum F'_i \cdot A_{u,i}} \cdot 100 (\%) \quad [8]$$

gde je: $A_{u,i}$ – površina zahvaćena pikom metilestra masne kiseline i u uzorku

F_i' – relativan korekcionni faktor za metilestar masne kiseline i , sveden na palmitinsku kiselinu

Relativni korekcionni faktori F_i' svedeni na palmitinsku kiselinu su računati na osnovu izraza 9, a korekcionni faktori F_i na osnovu izraza 10.

$$F_i' = \frac{F_i}{F_{16:0}} \quad [9]$$

gde je: $F_{16:0}$ – korekcionni faktor palmitinske kiseline

$$F_i = \frac{m_{s,i}}{a_{s,i}} \quad [10]$$

gde je: $m_{s,i}$ – maseni udeo komponenti u smeši standarda

$a_{s,i}$ – površinski udeo komponenti u smeši standarda

4. Rezultati i diskusija

4.1. Optimizacija uslova GC–MS analize

4.1.1. Definisane protoka gasa nosača kroz kolonu

Određivanje odgovarajućeg protoka gasa nosača, Q_{kol} , izvedeno je indirektno, određivanjem retencionog vremena vazduha na način opisan u poglavlju 2.6.2.

Injektovana zapremina vazduha iznosila je $V_{vz} = 1,0 \mu\text{l}$. Merenja su izvedena u 10 ponavljanja i dobijeno je prosečno retenciono vreme vazduha $t_m = 8,457 \text{ min}$, a kako su dimenzije korišćene kolone $L = 100 \text{ m}$, $D = 0,2 \text{ mm}$, iz izraza navedenih u poglavlju 2.6.2. dobija se da je $U = 19,67 \text{ cm/s}$, odnosno $Q_{kol} = 0,58 \text{ cm}^3/\text{min}$.

4.1.2. Definisane odnosa razdeljivanja

Odnos razdeljivanja je računat po izrazu navedenom u poglavlju 2.6.2. Merenje protoka u razdeljivaču ($Q_{s.v.}$) izvedeno je pomoću uređaja sa sapunskim mehurom i hronometra koji je ugrađen u gasni hromatograf. Srednja vrednost ovog protoka, kao rezultat više ponovljenih merenja, iznosila je $Q_v = 22,45 \text{ cm}^3/\text{min}$, tako da je ostvaren $SR = 39,71$.

4.1.3. Podešavanje rada masenog spektrometra

Za podešavanje rada masenog spektrometra korišćen je kompjuterski program proizvođača (autotune) i standardna supstanca perfluortributilamin.

Rezultujuće optimalne vrednosti karakterističnih veličina autotune-a date su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Primer „autotune“ izveštaja

Misc Info: Perfluorotributylamine							
Instrument: 5971							
EMVolts	2150	Filament	2	DC pol	NEG	Samples	16
X-Ray	144	Repeler	15,0	AmuOffs	67	Averages	1
MSTemp	183	IonFocus	86,0	AmuGain	299	StepSize	0,05
Vacuum	68	EntLens	46,0	219Width	-0,04	MassOffs	24
Emission	ON	EntOffs	0,0	TTI	OFF	MassGain	-253
PFTBA	OPEN						
Mass	Abund	Rel Abund	Iso Mass	Iso Abund	Iso Ratio		
69,00	1953280	100,00	70,00	23432	1,20		
219,00	1396224	71,48	220,00	61280	4,39		
502,00	98488	5,04	503,00	11543	11,72		

Prema dijagnostičkim kriterijumima napon detektora (elektronmultiplikatora) ukazuje na stanje celog masenog spektrometra, pri čemu je, kao što je navedeno u teorijskom delu (poglavlje 2.6.10.), optimalna vrednost ovog napona 1500–1800 V. Iz tabele 4.1. se vidi da je napon elektronmultiplikatora iznosio 2150 V što je blisko optimalnim vrednostima te ukazuje da se MS nalazio u dobrom stanju. Ostali podaci koji takođe govore o stanju MS su veoma dobri. Mase jona koji se posmatraju pri kalibraciji (69, 219 i 502) ne odstupaju od ovih vrednosti za više od $\pm 0,2$ (HP59970 MS ChemStation Handbook, 1998). Relativne abundance ovih jona takođe odgovaraju dijagnostičkim kriterijumima, odnosno abundanca jona mase 69 je najviša (relativna abundanca = 100%), a relativne abundance pikova mase 219 i 502 su veće od 35%, odnosno 1%. Izotopski odnosi (Iso Ratio) pikova mase 70, 220 i 503 takođe zadovoljavaju dijagnostičke kriterijume, odnosno vrednosti su im veoma bliske 1%, 4% i 10%, redom.

4.1.4. Optimizacija temperaturnog programa

Poteškoće u analizi *trans* masnih kiselina gasnom hromatografijom–masenom spektrometrijom se javljaju pri određivanju položaja i geometrije dvostrukih veza metilestra mono- i polinezasićenih masnih kiselina.

Metilestri zasićenih masnih kiselina se mogu lako identifikovati (Fritsche & Steinhart, 1998). Masene spektre metilestara zasićenih masnih kiselina karakteriše prisustvo molekulskog jona (M^+), jona $m/z = M-31$ (gubitak metanola) i $M-43$ (nastaje kao rezultat kompleksnog preuređenja usled gubitka C2, C3 i C4) kao i serija jona opšte formule $[(CH_2)_nCO_2CH_3]^+$ koji nastaju gubitkom neutralnih alifatičnih radikala, od kojih su obično najintenzivniji joni m/z 87, 143 i 199. Dominantan, a ujedno i osnovni, jon u masenim spektrima metilestara zasićenih

masnih kiselina je $[\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$, m/z 74, čiji nastanak je izazvan McLafferty-jevim premeštanjem (Christie, 1989).

Joni nastali fragmentacijom metilestara nezaćenih masnih kiselina ne ukazuju jasno na položaj i geometriju dvostruke veze. Najzastupljeniji joni u masenim spektrima metilestara mononezasićenih masnih kiselina su $[\text{C}_n\text{H}_{2n-1}]^+$, dok je osnovni jon m/z 55 $[\text{C}_4\text{H}_7]$. Masene spektre metilestara masnih kiselina sa dve dvostruke veze karakteriše prisustvo jona molekulske mase $[\text{C}_n\text{H}_{2n-3}]^+$, gde je m/z 67 obično osnovni jon. U masenim spektrima metilestara masnih kiselina sa tri ili više dvostrukih veza javlja se serija jona $[\text{C}_n\text{H}_{2n-5}]^+$, dok je osnovni jon m/z 79 $[\text{C}_6\text{H}_7]$ (Mjos & Pettersen, 2003). Sa porastom broja dvostrukih veza u lancu polinezasićenih masnih kiselina dolazi do opadanja intenziteta molekuskog jona, tako da se on najčešće i ne pojavljuje u masenim spektrima masnih kiselina sa tri i više dvostrukih veza.

Položaji dvostrukih veza se mogu odrediti ukoliko se nezasićene masne kiseline prevedu u odgovarajuće derivate kod kojih se naelektrisanje molekuskog jona lokalizuje dalje od dvostrukih veza (McDonald & Mossoba, 1997). Tako se na primer za GC-MS određivanje masnih kiselina sa različitim funkcionalnim grupama preporučuje transformacija masnih kiselina u pirolidin, pikolinil i 4,4-dimetiloksazolin (DMOX) derivate (Priegoto-Capote *et al.*, 2007). Kod pirolidin, pikolinil i 4,4-dimetiloksazolin derivata naelektrisanje se lokalizuje uglavnom na atomu azota ovih funkcionalnih grupa, te jonizacijom elektronima nastaju maseni spektri sa jasnim fragmentacionim jonima na osnovu kojih se položaj dvostrukih veza može veoma lako odrediti. Međutim prevođenje u navedene derivate je veoma dugotrajno, reakcija traje od 30 min, u slučaju formiranja pikolinil derivata, do 3 sata za DMOX derivate. Pri formiranju pikolinil i DMOX derivata neophodno je sadržaj vlage svesti na minimum, što uslovljava uvođenje još jednog koraka u pripremi uzoraka za analizu, dok reakcija formiranja pirolidin derivata zahteva visoke temperature, 100°C ili više (Christie, 1989). Pored toga, na kolonama od stopljene silike prevučeni polarnim i nepolarnim fazama pikolinil estri eluiraju na temperaturama za 5°C višim od odgovarajućih pirolidina, koji opet eluiraju na temperaturama za 40–50°C višim nego metilestri (Christie, 1989). Za određivanje pozicionih i geometrijskih izomera nezasićenih masnih kiselina GC-MS mogu se alternativno primeniti hemijske degradacione metode kao što je ozonizacija, što zahteva dodatnu opremu za ozonizaciju (Seppänen-Laakso *et al.*, 1996).

Uzimajući u obzir nedostatke alternativnih metoda derivatizacije masnih kiselina i imajući u vidu činjenicu da je cilj ovoga rada bio razvoj metode koja bi se mogla koristiti kao rutinska metoda za određivanje sastava masnih kiselina (uključujući i *trans* izomere) u prehrambenim proizvodima, odlučeno je da se masne kiseline prevedu u metilestre, te da se upotrebi specifična kapilarna kolona na kojoj se može postići njihovo razdvajanje. Ovaj postupak je mnogo kraći i jeftiniji, radni uslovi su znatno blaži u odnosu na druge

derivatizacione postupke, a razvijena metoda bi se mogla primeniti i za rad sa gasnim hromatografom sa FID detektorom.

S obzirom na usvojenu metodu, neophodno je bilo posebnu pažnju posvetiti optimizaciji uslova hromatografskog razdvajanja metilestara masnih kiselina, odnosno definisanju optimalnog temperaturnog programa, u cilju dobijanja potpuno razdvojenih pikova. Kao kriterijum za definisanje razdvajanja metil-oleata i metil-elaidata korišćen je faktor razdvajanja (R). Prema standardnim metodama AOAC 985.21 i AOCS Cd 17-85, za određivanje ukupnih *trans* izomera masnih kiselina u margarinima gasnom hromatografijom, faktor razdvajanja metil-elaidata i metil-oleata treba da bude $R \geq 0,5$ (AOAC, 2000; AOCS, 1999), dok po standardnoj metodi AOCS Ce 1c-89, za određivanje sastava masnih kiselina hidrogenovanih i nehidrogenovanih biljnih masti i ulja gasnom hromatografijom, faktor razdvajanja metil-elaidata i metil-oleata treba da bude $R \geq 0,8$ (AOCS, 1999).

Osnova za optimizaciju temperaturnog programa bila su prethodna istraživanja, odnosno prethodno definisan temperaturni program za određivanje sastava masnih kiselina, ne uključujući *trans* izomere masnih kiselina (Mirković, 2001):

- temperatura injektora: 250°C,
- početna temperatura: 100°C (2 min),
- porast temperature: 10°C/min i
- krajnja temperatura: 230°C (15 min).

Optimizacija temperaturnog programa je izvedena korišćenjem standardnih smeša metilestara masnih kiselina, sa 6 (RM-1), 19 (Grain Fatty Acid Methyl Ester Mix, 19FAMEMix) i 37 (37FAMEMix) komponenata. Standardna smeša RM-1 je korišćena za određivanje retencionih vremena metil-palmitata, metil-stearata, metil-oleata, metil-linoleata, metil-linolenata i metil-arahidata. Dobijena retencionna vremena su korišćena kao osnova pri nalaženju položaja ostalih metilestara na hromatogramima sa 19, a potom i sa 37 pikova dobijenih analizom navedenih standarda sa 19 i 37 komponenti.

Analize su izvedene SCAN tehnikom pri sledećim uslovima:

- vreme kašnjenja zbog rastvarača (Solvent delay time): 12 min,
- vreme uravnoteženja uslova rada gasnog hromatografa između analiza: 0,30 min,
- raspon snimanih masa: 40–400 a.m.u.,
- brzina skeniranja: 1,19 scan/s,
- temperatura masenog spektrometra: 180°C i
- temperatura injektora: 230°C.

Ispitivanjem različitih temperaturnih programa, ustanovljeno je da se dobro razdvajanje masnih kiselina iz smeše sa 19 komponenata, uključujući *cis* i *trans* izomere, dobija primenom sledećeg temperaturnog programa:

- početna temperatura: 100°C (5 min),
- porast temperature: 10°C/min,
- krajnja temperatura: 240°C (10 min) i
- vreme trajanja analize: 30 min.

Pri ovim uslovima postignuto je dobro razdvajanje metil-elaidata i metil-oleata. Faktor razdvajanja je iznosio oko 2, što ukazuje da je postignuto daleko bolje razdvajanje *cis* i *trans* izomera od zahteva koje postavljaju standardne metode. Stoga je navedni temperaturni program usvojen kao optimalan temperaturni program 1.

Na slici 4.1. je prikazan originalan zapis totalnog jonskog hromatograma (TIC) dobijenog analizom standardne smeše sa 19 komponenti (Grain Fatty Acid Methyl Ester Mix, 19FAMEMix) pri definisanom temperaturnom programu 1 i uveličani deo TIC ($t > 25$ min) na kome se vide pikovi metil-elaidata i metil-oleata.

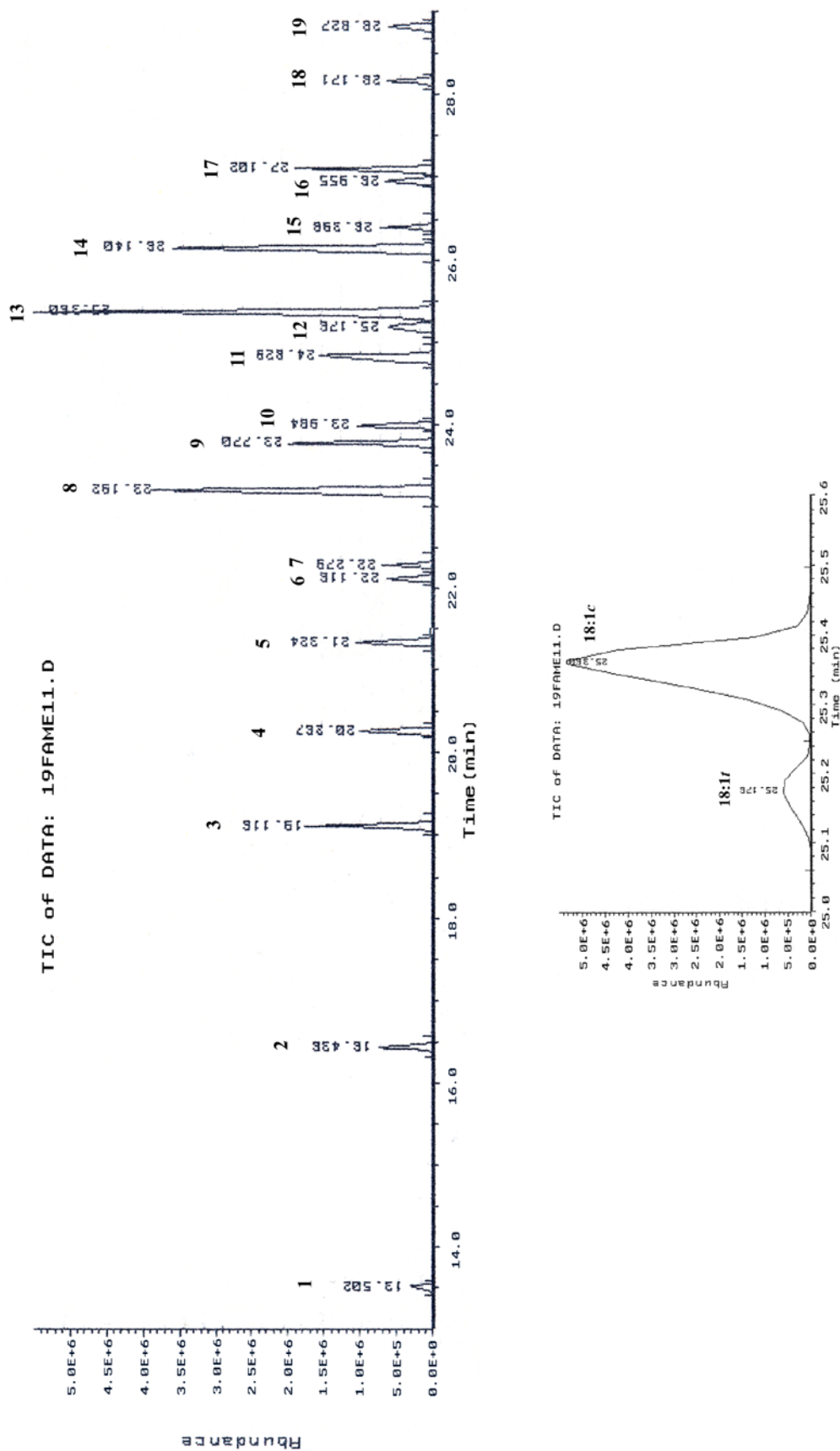
Primenom definisanog temperaturnog programa 1 analizirana je standardna smeša sa 37 komponenata. Iako je postignuto razdvajanje metil-elaidata i metil-oleata dolazilo je do preklapanja pikova sledećih masnih kiselina: C15:1 i C16:0; C18:3n6 i C20:1; C18:3n3 i C21:0; C20:3n6 i C22:1n9; C20:3n3 i C20:4n6; C20:5n3 i C24:1.

U cilju rešavanja nastalog problema usledila su dalja ispitivanja nakon kojih je usvojen temperaturni program 2:

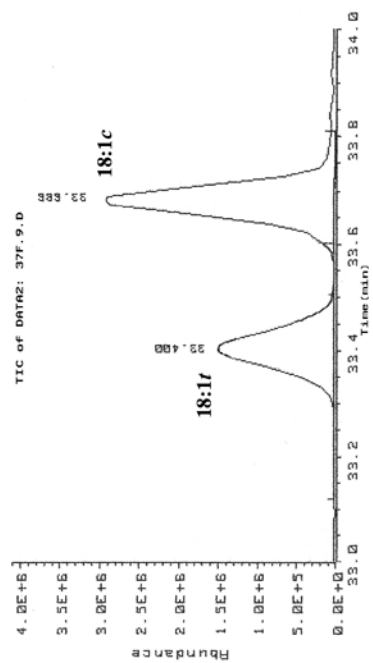
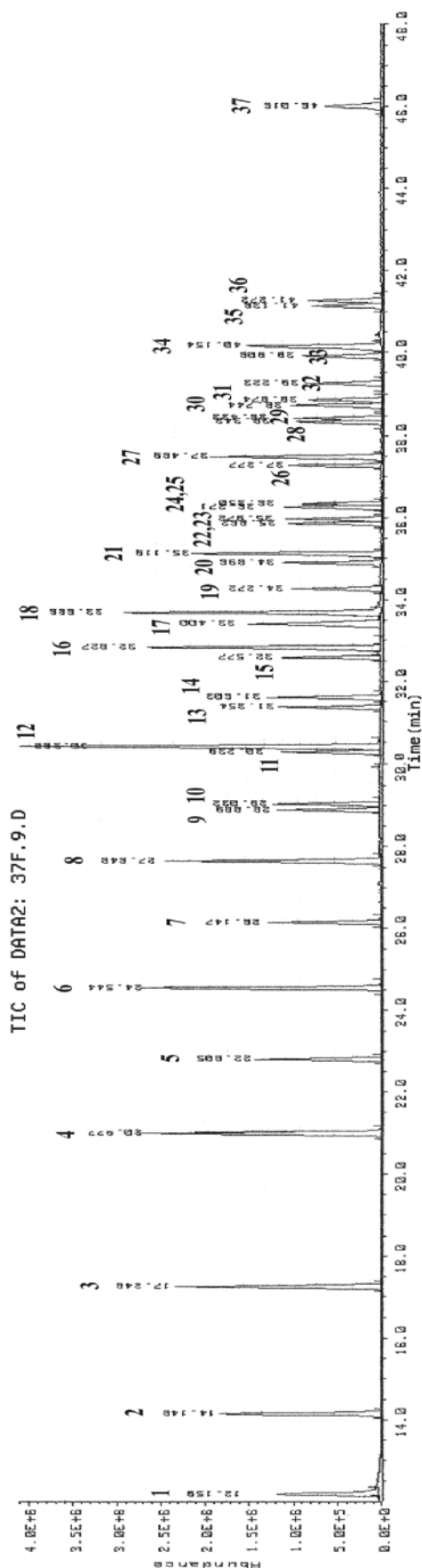
- početna temperatura: 100°C (5 min),
- porast temperature: 6°C/min,
- krajnja temperatura: 240°C (20 min) i
- vreme trajanja analize: 50 min.

Pri ovim uslovima postignuto je dobro razdvajanje svih 37 metilestara masnih kiselina uz istovremeno poboljšanje razdvajanje metil-elaidata i metil-oleata, faktor razdvajanja je iznosio oko 4.

Na slici 4.2. prikazan je originalan zapis totalnog jonskog hromatograma dobijenog analizom standardne smeše sa 37 komponenti (37FAMEMix) pri definisanom temperaturnom programu 2 i uveličani deo TIC na kome se vide pikovi metil-elaidata i metil-oleata..



Slika 4.1. Originalan zapis TIC standardne smeše 19FAME11.D; 1-C8:0, 2-C10:0, 3-C12:0, 4-C13:0, 5-C14:0, 6-C14:1n9c, 7-C15:0, 8-C16:0, 9-C16:1n9c, 10-C17:0, 11-C18:0, 12-C18:1n9f, 13-C18:1n9c, 14-C18:2n6c, 15-C20:0, 16-C20:1, 17-C18:3n3, 18-C22:0, 19-C22:1n9



Slika 4.2. Originalan zapis TIC standardne smeše 37FAMEMIX; 1-C4:0, 2-C6:0, 3-C8:0, 4-C10:0, 5-C11:0, 6-C12:0, 7-C13:0, 8-C14:0, 9-C14:1, 10-C15:0, 11-C15:1, 12-C16:0, 13-C16:1, 14-C17:0, 15-C17:1, 16-C18:0, 17-C18:1r, 18-C18:1c, 19-C18:2n6r, 20-C18:2n6c, 21-C20:0, 22-C18:3n6, 23-C20:1, 24-C21:0, 25-C18:3n3, 26-C20:2, 27-C22:0, 28-C20:3n6, 29-C22:1n9, 30-C23:0, 31-C20:3n3, 32-C20:4n6, 33-C22:2, 34-C24:0, 35-20:5n3, 36-C24:1, 37-C22:6n3

S obzirom da sastav masnih kiselina u većini biljnih ulja i masti odgovara sastavu korišćenog standarda sa 19 komponenti (19FAMEMix) usvojeni temperaturni program 1 može se primeniti pri analizi ovih i sličnih proizvoda, dok se za proizvode sa složenijim sastavom masnih kiselina (npr. mleko i mlečni proizvodi, konditorski proizvodi i dr.) mora primeniti temperaturni program 2. Kako se primenom temperaturnog programa 1 smanjuje vreme trajanja analize za 20 min u odnosu na temperaturni program 2, oba temperaturna programa su usvojena i korišćena u daljim ispitivanjima, odnosno analizi uzoraka prehrambenih proizvoda.

Tokom definisanja optimalnog temperaturnog programa identifikacija metilestara masnih kiselina je izvedena korišćenjem komercijalne baze podataka „WILEY“ i prethodno formirane sopstvene baze podataka „FAMES“ (Mirković, 2001). Tokom procesa identifikacije i daljim pretraživanjem biblioteke „WILEY“ utvrđeno je da se u njoj ne nalaze maseni spektri nekoliko komponenti prisutnih u korišćenim standardnim smešama 19FAMEMix i 37FAMEMix. Baza podataka „WILEY“ nije sadržala masene spektre metilestara masnih kiselina: C14:1, C15:1, C17:1, C22:2, C20:5n3 i C22:6n3. Stoga je identifikacija navedenih komponenti izvedena korišćenjem baze podataka sa Interneta (http://lipidlibrary.aocs.org/ms/arch_me/index.htm) i tumačenjem masenih spektara, te je potom sopstvena baza podataka „FAMES“ dopunjena masenim spektrima pomenutih metilestara masnih kiselina kao i masenim spektrima ostalih komponenti iz upotrebljenih standardnih smeša. Na ovaj način pripremljena je baza podataka za upotrebu pri definisanju sastava masnih kiselina u prehrambenim proizvodima.

4.2. Definisanje korekcionih faktora

U GC–MS se ne preporučuje primena metode 100% za kvantitativno određivanje jer odziv detektora nije isti za sve metilestre masnih kiselina, te konstante proporcionalnosti mase i površine zahvaćene pikovima nisu iste za sve metilestre masnih kiselina. Stoga je u okviru ovog rada kvantitativno određivanje izvedeno primenom modifikovane metode 100% (AOAC, 2000), što je zahtevalo definisanje relativnih korekcionih faktora.

Pri definisanim odgovarajućim uslovima analize hromatografisane su standardne smeše 19FAMEMix i 37FAMEMix, te su izračunati korekcionni faktori F_i a zatim i relativni korekcionni faktori F_i' svedeni na palmitinsku kiselinu za svaku masnu kiselinu na osnovu izraza datih u poglavlju 3.3.3. Analize su izvedene u pet ponavljanja, te je izračunata srednja vrednost relativnih korekcionih faktora za svaku masnu kiselinu.

U tabelama 4.2. i 4.3. dati su relativni korekcionni faktori definisani za 37 (37FAMEMix) i 19 komponenti (19FAMEMix), kao i prosečna retenciona vremena (RT) i interval verovatnog apsolutnog odstupanja, određeni za 5 ponavljanja uz 95% verovatnoću.

Tabela 4.2. Relativni korekcionni faktori (F_i'), srednja retenciona vremena (RT) i intervali verovatnog apsolutnog odstupanja ($\Delta\mu$, $n = 5$, $P = 95\%$) definisani za 37 masnih kiselina (37FAMEMix)

Masna kiselina	F_i'	RT (min)	$\Delta\mu$ (min)
C4:0	2,427	12,205	0,063
C6:0	1,466	14,176	0,047
C8:0	1,129	17,257	0,025
C10:0	1,026	20,969	0,018
C11:0	1,022	22,794	0,019
C12:0	1,032	24,529	0,019
C13:0	1,105	26,131	0,022
C14:0	1,139	27,633	0,022
C14:1	1,266	28,871	0,024
C15:0	1,283	29,014	0,025
C15:1	1,193	30,224	0,021
C16:0	1,000	30,360	0,028
C16:1	1,438	31,336	0,025
C17:0	1,387	31,583	0,026
C17:1	1,476	32,557	0,025
C18:0	1,142	32,798	0,032
C18:1n9t	0,872	33,376	0,028
C18:1n9c	1,025	33,656	0,032
C18:2n6t	1,821	34,247	0,031
C18:2n6c	1,532	34,874	0,028
C20:0	1,686	35,090	0,033
C18:3n6	1,719	35,837	0,031
C20:1	1,900	35,947	0,030
C21:0	1,791	36,237	0,036
C18:3n3	1,921	36,329	0,029
C20:2	1,938	37,248	0,032
C22:0	1,844	37,450	0,042
C20:3n6	1,875	38,311	0,033
C22:1n9	2,170	38,395	0,039
C23:0	1,966	38,704	0,044
C20:3n3	2,232	38,840	0,037
C20:4n6	2,124	39,191	0,036
C22:2	2,043	39,869	0,043
C24:0	1,938	40,101	0,055
C20:5n3	2,074	41,099	0,039
C24:1	2,317	41,220	0,053
C22:6n3	2,029	45,963	0,056

Tabela 4.3. Relativni korekcionni faktori (F_i'), srednja retenciona vremena (RT) i intervali verovatnog apsolutnog odstupanja ($\Delta\mu$, $n = 5$, $P = 95\%$) definisani za 19 masnih kiselina (19FAMEMix)

Masna kiselina	F_i'	RT (min)	$\Delta\mu$ (min)
C8:0	1,923	13,488	$\pm 0,019$
C10:0	1,407	16,429	$\pm 0,011$
C12:0	1,220	19,116	$\pm 0,009$
C13:0	1,131	20,266	$\pm 0,010$
C14:0	1,049	21,328	$\pm 0,006$
C14:1n9c	1,202	22,117	$\pm 0,009$
C15:0	1,068	22,280	$\pm 0,006$
C16:0	1,000	23,195	$\pm 0,007$
C16:1n9c	1,091	23,776	$\pm 0,005$
C17:0	1,128	23,991	$\pm 0,006$
C18:0	1,041	24,835	$\pm 0,015$
C18:1n9t	1,099	25,185	$\pm 0,012$
C18:1n9c	1,001	25,369	$\pm 0,011$
C18:2n6c	1,127	26,147	$\pm 0,010$
C20:0	1,036	26,404	$\pm 0,008$
C20:1	1,134	26,964	$\pm 0,007$
C18:3n3	1,199	27,107	$\pm 0,007$
C22:0	1,059	28,178	$\pm 0,010$
C22:1n9	1,129	28,835	$\pm 0,009$

4.3. Definisane postupka pripreme uzoraka

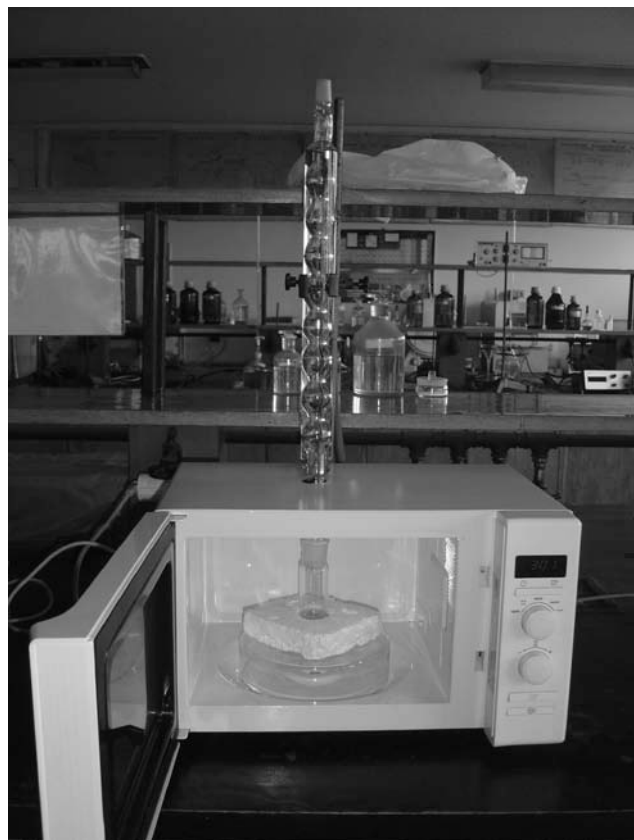
Analitička procedura određivanja masnih kiselina u prehrambenim proizvodima praktično obuhvata tri koraka: ekstrakciju masti, derivatizaciju i GC–MS analizu. Sam proces izvođenja GC–MS analize, ne uključujući vreme potrebno za obradu podataka, pri definisanim optimalnim uslovima u okviru ovog rada iznosi 30, odnosno 50 min, u zavisnosti od primenjenog temperaturnog programa 1 ili 2. Ukoliko se ekstrakcija lipida iz uzorka izvodi nekom od klasičnih ekstrakcionih tehnika, ukupno vreme trajanja analize se produžava za nekoliko sati. Kako svaki korak u okviru primenjene analitičke procedure uključuje određene kritične operacije, povećava mogućnost kontaminacije i gubitaka, najbolje bi bilo primeniti metodu koja bi omogućila direktno dobijanje metilestara iz matriksa uzorka. Stoga je u okviru ovog rada ispitana mogućnost primene simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije u otvorenom sistemu.

Pregledom literature ustanovljeno je da su različite metode mikrotalasne ekstrakcije primenjivane u cilju određivanja sadržaja masti u različitim vrstama uzoraka (Virot *et al.*, 2007;

Virov *et al.*, 2008; Elkhori *et al.*, 2007; García-Ayso *et al.*, 2000; Mahesar *et al.*, 2008) ili određivanja sastava masnih kiselina (Priego-Capote *et al.*, 2007; Ruiz-Jiménez *et al.*, 2006; Pérez-Serradilla *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2001), ali nisu nađeni podaci o primeni metoda zasnovanih na simultanoj mikrotalasnoj ekstrakciji–derivatizaciji u cilju određivanja sastava masnih kiselina, uključujući i *trans* masne kiseline.

Mikrotalasna ekstrakcija je izvedena u komercijalnoj mikrotalasnoj pećnici za domaćinstvo LG 800 W, koja je prethodno modifikovana (Slika 4.3.).

Kako bi se omogućilo povezivanje ekstrakcione posude koja se nalazi unutar mikrotalasne pećnice sa Allihn-ovim hladnjakom koji ne sme biti u zoni dejstva mikrotalasa, na gornjem delu mikrotalasne pećnice napravljen je otvor prečnika 30 mm. Kroz otvor je provučen donji deo Allihn-ovog hladnjaka, te je povezan sa ekstrakcionom posudom. Umesto rotirajućeg postolja, u mikrotalasnu pećnicu je postavljena Petri ploča (D = 190 mm, H = 45 mm). Kao pomoćni držač ekstrakcione posude korišćeno je kućište od stiropora.



Slika 4.3. Aparatura za mikrotalasnu ekstrakciju u otvorenom sistemu

4.3.1. Optimizacija simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije

S obzirom da su simultanom mikrotalasnom ekstrakcijom–esterifikacijom obuhvaćena dva koraka, u cilju definisanja uticaja primenjene energije mikrotalasnog zračenja na obe faze procesa, ekstrakciju i esterifikaciju, prvo je izvedena optimizacija procesa mikrotalasne ekstrakcije, nakon čega je sledila priprema metilestara po postupku opisanom u poglavlju 3.3.1.3. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim nakon ekstrakcije po Soxhlet-u, praćene istim postupkom esterifikacije.

Za optimizaciju uslova mikrotalasne ekstrakcije korišćeni su različiti prehrambeni proizvodi iz grupe konditorskih proizvoda.

Parametri koji imaju najveći uticaj na proces mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu su: priroda rastvarača, vreme ekstrakcije i snaga mikrotalasa. Kao što je već rečeno u poglavlju 2.5.3.1., rastvarač za mikrotalasnu ekstrakciju treba birati na osnovu: rastvorljivosti analita u njemu, interakcije rastvarača i matriksa uzorka, mikrotalasnih apsorpcionih karakteristika rastvarača i mogućnosti njegove primene u hromatografskom analitičkom koraku. Efekat mikrotalasnog zračenja veoma zavisi od prirode primenjenog rastvarača i matriksa uzorka, tako da se proces ekstrakcije uz dejstvo mikrotalasa odigrava različitim mehanizmima.

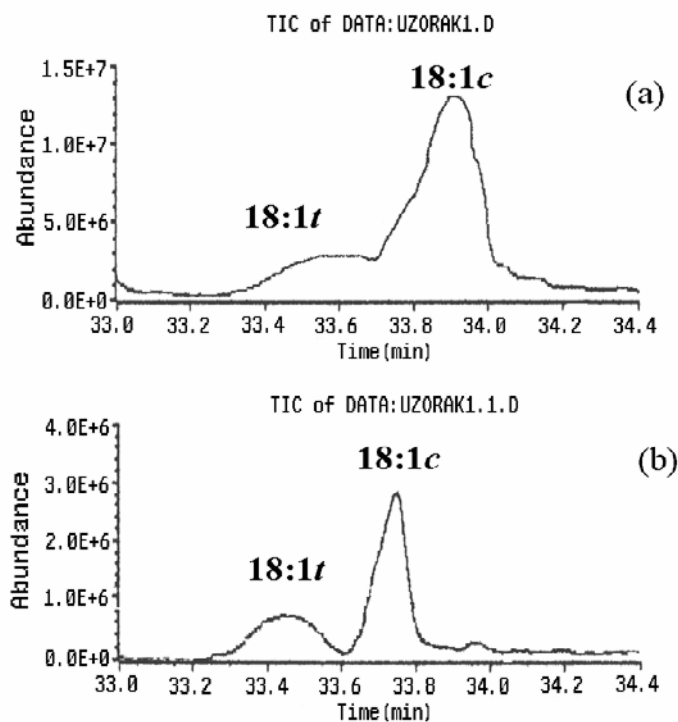
S obzirom da je pokazano da efikasnost ekstrakcije lipida u najvećoj meri zavisi od primenjenog rastvarača, i da izbor rastvarača predstavlja jedan od najkritičnijih faktora pri analizi lipida (Garcia-Ayuso *et al.*, 2000), u okviru ovog rada je u skladu sa preporukama ISO 659-1988 (E) metode (ISO, 1998) korišćen *n*-heksan. Iako je *n*-heksan veoma pogodan rastvarač za ekstrakciju lipida i dalje primenjenu analitičku tehniku, GC–MS, on veoma slabo apsorbuje mikrotalasno zračenje. Stoga se za mikrotalasnu ekstrakciju *n*-heksan, kao i ostali slabo polarni rastvarači, može primeniti u kombinaciji sa rastvaračem ili matriksom uzorka koji imaju veliku dielektričnu konstantu.

Voda, koja je prisutna u gotovo svim prehrambenim proizvodima, predstavlja jednu od najvažnijih komponenti matriksa u pogledu ekstrakcije potpomognute mikrotalasima jer slobodni molekuli vode imaju veliku vrednost dielektrične konstante i veliku sposobnost apsorpcije mikrotalasnog zračenja. S toga pod dejstvom mikrotalasne energije dolazi do selektivnog zagrevanja uzorka, voda se veoma brzo zagreva usled čega dolazi do lokalnog povišenja temperature i pritiska, što uslovljava mnogo bržu selektivnu migraciju željenih komponenta iz uzorka u rastvarač (Paré & Bélanger, 1997). Ukoliko primenjeni rastvarač veoma malo apsorbuje mikrotalasno zračenje on ostaje relativno hladan, te se željene komponente iz uzorka u njemu veoma brzo rastvaraju (Mandal *et al.*, 2007). Oslanjajući se na

literaturne podatke, pretpostavljeno je da će voda prisutna u prehrambenim proizvodima omogućiti dovoljno efikasnu i brzu mikrotalasnu ekstrakciju uz primenu *n*-heksana kao rastvarača.

Preliminarna ispitivanja su pokazala da se najbolje razdvajanje metil-elaidata i metil-oleata postiže ukoliko je signal detektora, odnosno ukupna jonska stuja (abundanca) reda veličine od $3 \cdot 10^6$ do $6 \cdot 10^6$ internih jedinica. Ovaj signal detektora se postiže ukoliko se u kolonu unese 1 μ l rastvora sadržaja oko 30 mg/cm³, pri definisanim optimalnim uslovima GC–MS analize, uz SR \approx 40. Imajući u vidu postupak pripreme metilestara, ovaj sadržaj se postiže ukoliko se za pripremu metilestara odmeri oko 150 mg prethodno ekstrahovane masti iz uzorka.

Na slici 4.4. je prikazan uticaj količine uzorka na razdvajanje metil-elaidata i metil-oleata pripremljenog od \approx 300 mg (a) i \approx 150 mg (b) prethodno ekstrahovane masti iz uzorka.



Slika 4.4. Uticaj količine uzorka na rezoluciju metil-elaidata i metil-oleata; količina prethodno ekstrahovane masti iz uzorka uzeta za pripremu metilestara iznosila je a) \approx 300 mg i b) \approx 150 mg.

U cilju dobijanja ekstrakta koji bi se direktno mogao analizirati GC–MS, a imajući u vidu uticaj količine uzorka na efikasnost hromatografskog razdvajanja, količina uzorka koju je potrebno uzeti za analizu i zapremina rastvarača je izračunata u odnosu na sadržaj masti u analiziranim uzorcima, tako da se dobije ekstrakt u kom je sadržaj masti oko 30 mg/cm³. Kako

je prosečan sadržaj masti u korišćenim uzorcima iznosio oko 20%, za mikrotalasnu ekstrakciju je korišćena količina uzorka od 1,5 g i zapremina rastvarača od 5 cm³.

U cilju postizanja efikasne mikrotalasne ekstrakcije, u što kraćem vremenu, usledila su dalja ispitivanja kako bi se odredila odgovarajuća snaga mikrotalasnog zračenja i vreme trajanja ekstrakcije. Imajući u vidu činjenicu da vreme trajanja ekstrakcije i primenjena snaga mikrotalasa predstavljaju faktore koji imaju veoma izražen međusoban uticaj, pretpostavljeno je da će se efikasna ekstrakcija u najkraćem vremenu postići pri primenjenoj maksimalnoj snazi mikrotalasa. S obzirom da je mikrotalasnoj ekstrakciji podvrgnut sistem u kojem voda, kao sastavni deo matriksa uzoraka ima veliku sposobnost apsorpcije mikrotalasnog zračenja, a rastvarač veoma slabo apsorbuje mikrotalasno zračenje, izvedena je serija eksperimenata kako bi se utvrdilo da li se može postići efikasna ekstrakcija ukoliko se proces zaustavi pre početka intenzivnog klučanja (burna reakcija), kao i da se ispita uticaj snage mikrotalasa na intenzitet reakcije.

Proces mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu je izveden pri različitoj snazi mikrotalasa (160, 480, 640 i 800 W) pri čemu je mereno vreme koje je potrebno da reakciona smeša počne da ključa. U tabeli 4.4. su prikazani dobijeni rezultati. Može se videti da vreme početka ključanja reakcione smeše opada sa povećanjem snage mikrotalasa. Utvrđeno je da ključanje reakcione smeše započinje veoma burno, bez obzira na primenu snagu mikrotalasa, a potom se reakcija nastavlja umerenim intenzitetom, što je posledica selektivnog zagrevanja uzorka i lokalnog povišenja temperature i pritiska.

Tabela 4.4. Uticaj snage mikrotalasa na vreme započinjanja klučanja reakcione smeše

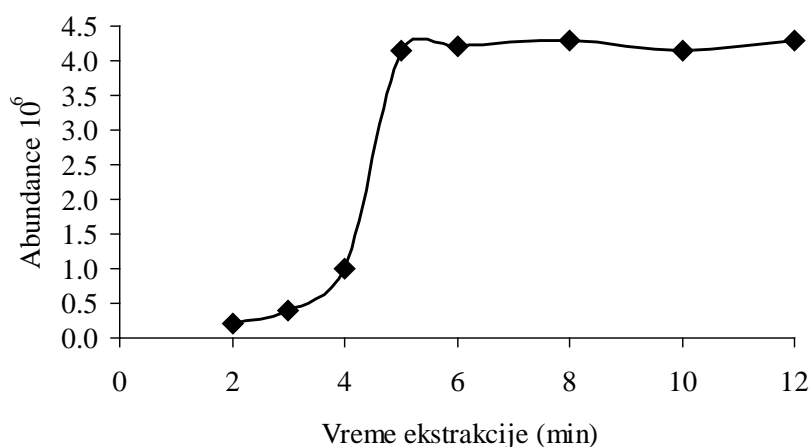
Snaga mikrotalasa (W)	Vreme početka ključanja reakcione smeše (min)
160	12
480	6
640	4
800	1,5

Kada je utvrđeno vreme početka intenzivnog ključanja, izvedena je ponovna mikrotalasna ekstrakcija pri čemu je vreme trajanja procesa bilo za 0,5 min kraće od potrebnog za početak ključanja reakcione smeše pri primenjenoj snazi mikrotalasa. Pripremljeni metilestri su potom analizirani GC-MS. Odziv detektora je bio veoma mali, abundanca se kretala u opsegu od $2 \cdot 10^5$ do $4 \cdot 10^5$, što je ukazalo da se efikasna mikrotalasna ekstrakcije ne može postići ukoliko se proces zaustavi pre početka intenzivnog ključanja reakcione smeše.

S obzirom da se pokazalo da intenzitet ključanja reakcione smeše ne zavisi od primenjene snage mikrotalasa, u cilju postizanja efikasnije ekstrakcije tokom što kraćeg vremena, kao optimalna, usvojena je maksimalna snaga mikrotalasa od 800 W.

U cilju određivanja optimalnog vremena mikrotalasnog ekstrakcije izvedene su ekstrakcije pri kojima je vreme ekstrakcije iznosilo: 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 i 12 minuta. Rezultati su pokazali (Slika 4.5.) da sa porastom vremena ekstrakcije do 5 min raste analitički signal, odnosno količina ekstrahovane masti, a dalje nema znatnih promena.

U skladu sa dobijenim rezultatima, vreme od 5 min je usvojeno kao odgovarajuće vreme mikrotalasnog ekstrakcije u otvorenom sistemu.



Slika 4.5. Zavisnost prosečnog analitičkog signala od vremena ekstrakcije

Simultana mikrotalasna ekstrakcija–esterifikacija je izvedena pri usvojenim odgovarajućim uslovima mikrotalasnog ekstrakcije (Tabela 4.5.) s tim što je u ekstrakcionu posudu pored uzorka i rastvarača dodato i 1,2 cm³ metanolnog rastvora KOH koncentracije 2 mol/dm³. Nakon procesa simultane mikrotalasnog ekstrakcije–esterifikacije u ekstrakcionu posudu je dodato 2,4 cm³ metanolnog rastvora HCl koncentracije 1 mol/dm³ i blago promešano, te je nakon fazne separacije gornji sloj u kom se nalaze metilestri dekantovan u čistu epruvetu i analiziran GC–MS.

Tabela 4.5. Usvojeni uslovi mikrotalasnog ekstrakcije u otvorenom sistemu

Količina uzorka	1,5 g
Zapremina rastvarača	5 cm ³
Vreme ekstrakcije	5 min
Snaga mikrotalasa	800 W

4.3.2. Poređenje sastava ekstrakata dobijenih primenom različitih metoda

U cilju poređenja sastava ekstrakata dobijenih primenom mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu, praćene esterifikacijom (ME) i simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije (SMEE), sa referentnom metodom ekstrakcijom po Soxhlet-u (SE), dobijeni ekstrakti su analizirani gasnom hromatografijom–masenom spektrometrijom pri istim, predhodno definisanim uslovima. Analize su izvedene u tri ponavljanja. Dobijeni rezultati su prikazani u tabelama 4.6. i 4.7.

Srednje vrednosti sadržaja masnih kiselina dobijene nakon pripreme uzoraka navedenim postupcima upoređene su primenom Studentovog *t*-testa uparenih vrednosti uz 95% verovatnoću.

Nulta hipoteza je bila da obe primenjene metode za pripremu uzoraka (mikrotalasna ekstrakcija u otvorenom sistemu i simultana mikrotalasna ekstrakcija–esterifikacija) daju iste rezultate kao i referentna metoda, odnosno da razlike između posmatranih metoda nisu značajne. Izračunate *t*-vrednosti su upoređene sa teorijskim vrednostima $t_{\alpha=0,05}$ i odgovarajućim brojem stepeni slobode. Kako su izračunate *t*-vrednosti bile manje od teorijskih vrednosti, nulta hipoteza je prihvaćena, te je zaključeno da su razlike između sadržaja masnih kiselina dobijenih nakon primene navedenih metoda u okviru eksperimentalne greške uz 95% verovatnoću.

Standardna devijacija dobijenih rezultata se kretala u opsegu od 0,00% do 1,80% (Tabele 4.6. i 4.7.), a prosečna vrednost je iznosila 0,16%. Srednja vrednost standardne devijacije rezultata dobijenih nakon ekstrakcije po Soxhlet-u iznosila je 0,18%, nakon mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu 0,15%, a nakon procesa simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije 0,14%. Na osnovu iznetog može se zaključiti da se nešto bolji rezultati u smislu reproduktivnosti postižu primenom procesa simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije.

Iz tabela 4.6. i 4.7. se može videti da je nakon primenom mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu kao i simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije u uzorcima broj 2, 3, 4, 5, 7 i 10 određen sadržaj većeg broja masnih kiselina u odnosu na ekstrakciju po Soxhlet-u. Na primer, u uzorku broj 7 je nakon primene mikrotalasne ekstrakcije i simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije, za razliku od ekstrakcije po Soxhlet-u, detektovano prisustvo masnih kiselina C6:0, C15:0, C17:0, C22:0 i C18:3 u količinama manjim od 0,3%.

Tabela 4.6. Sadržaj zasićenih masnih kiselina izražen u % u odnosu na ukupne masne kiseline dobijen nakon primene ekstrakcije po Soxhlet-u (SE), mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu (ME) i simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije (SMEE), (rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja \pm SD)

		Masna kiselina										
Broj uzorka	Metoda	6:0	8:0	10:0	12:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0
1	SE	0,87 \pm 0,07	3,62 \pm 0,13	3,96 \pm 0,05	27,19 \pm 0,00	12,60 \pm 0,19	0,61 \pm 0,03	17,56 \pm 0,14	0,40 \pm 0,04	15,86 \pm 0,30	0,23 \pm 0,01	
	ME	0,96 \pm 0,05	3,77 \pm 0,19	3,95 \pm 0,09	28,46 \pm 0,24	12,61 \pm 0,15	0,46 \pm 0,03	17,48 \pm 0,00	0,34 \pm 0,04	15,94 \pm 0,20	0,26 \pm 0,02	
	SMEE	1,15 \pm 0,04	4,03 \pm 0,20	3,87 \pm 0,07	28,91 \pm 0,11	12,76 \pm 0,18	0,53 \pm 0,05	17,56 \pm 0,19	0,34 \pm 0,03	15,19 \pm 0,29	0,19 \pm 0,00	
2	SE	1,65 \pm 0,11	1,17 \pm 0,01	1,17 \pm 0,01	8,11 \pm 0,36	2,85 \pm 0,06		19,50 \pm 0,32		7,38 \pm 0,10	0,44 \pm 0,02	0,36 \pm 0,04
	ME	1,15 \pm 0,10	0,80 \pm 0,03	0,80 \pm 0,03	6,62 \pm 0,26	2,61 \pm 0,09		18,26 \pm 0,23		7,52 \pm 0,12	0,36 \pm 0,02	0,36 \pm 0,01
	SMEE	0,89 \pm 0,02	0,66 \pm 0,03	0,66 \pm 0,03	6,82 \pm 0,14	2,35 \pm 0,03		18,91 \pm 0,25		7,73 \pm 0,14	0,40 \pm 0,03	0,39 \pm 0,01
3	SE	2,65 \pm 0,12	3,42 \pm 0,03	3,42 \pm 0,03	9,14 \pm 0,20	10,05 \pm 0,10	0,93 \pm 0,07	32,48 \pm 0,36	0,58 \pm 0,02	7,38 \pm 0,04		
	ME	2,68 \pm 0,09	3,33 \pm 0,07	3,33 \pm 0,07	8,72 \pm 0,21	9,66 \pm 0,50	0,94 \pm 0,02	32,13 \pm 0,16	0,59 \pm 0,03	7,44 \pm 0,08	0,24 \pm 0,02	
	SMEE	2,60 \pm 0,05	3,50 \pm 0,04	3,50 \pm 0,04	8,76 \pm 0,19	9,81 \pm 0,23	1,04 \pm 0,02	32,03 \pm 0,25	0,54 \pm 0,03	8,05 \pm 0,04	0,20 \pm 0,02	
4	SE	3,00 \pm 0,03	2,13 \pm 0,09	2,13 \pm 0,09	13,76 \pm 0,23	5,65 \pm 0,01		31,77 \pm 0,02		5,19 \pm 0,03	0,31 \pm 0,03	
	ME	3,38 \pm 0,11	2,21 \pm 0,03	2,21 \pm 0,03	13,01 \pm 0,45	5,58 \pm 0,03		31,59 \pm 0,11		5,19 \pm 0,05	0,32 \pm 0,02	
	SMEE	3,73 \pm 0,12	2,31 \pm 0,02	2,31 \pm 0,02	13,56 \pm 0,54	5,58 \pm 0,03		31,31 \pm 0,16		4,92 \pm 0,07	0,32 \pm 0,01	
5	SE	2,16 \pm 0,14	1,49 \pm 0,06	1,49 \pm 0,06	10,17 \pm 0,15	4,33 \pm 0,28		25,61 \pm 0,14		4,09 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02	
	ME	2,65 \pm 0,18	1,75 \pm 0,10	1,75 \pm 0,10	10,45 \pm 0,12	4,31 \pm 0,06		26,22 \pm 0,09		4,12 \pm 0,03	0,26 \pm 0,01	
	SMEE	2,31 \pm 0,11	1,60 \pm 0,03	1,60 \pm 0,03	10,06 \pm 0,11	4,22 \pm 0,02		26,56 \pm 0,10		4,22 \pm 0,03	0,27 \pm 0,02	

Nastavak tabele 4.6.

		Masna kiselina										
Broj uzorka	Metoda	6:0	8:0	10:0	12:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0
6	SE		3,21 ±0,00	2,41 ±0,11	14,09 ±0,15	5,27 ±0,10		31,68 ±0,03		3,73 ±0,01	0,30 ±0,01	
	ME		3,84 ±0,05	2,60 ±0,12	14,25 ±0,21	5,16 ±0,08		31,22 ±0,25		3,66 ±0,16	0,27 ±0,03	
	SMEE		3,40 ±0,07	2,60 ±0,17	14,05 ±0,29	4,64 ±0,06		31,95 ±0,39		3,71 ±0,15	0,22 ±0,03	
7	SE		1,97 ±0,01	1,52 ±0,04	8,98 ±0,02	4,39 ±0,11		30,48 ±0,11		17,82 ±0,12	0,61 ±0,03	
	ME	0,22 ±0,01	1,83 ±0,05	1,43 ±0,06	7,52 ±0,06	3,97 ±0,13	0,12 ±0,01	29,92 ±0,39	0,25 ±0,01	19,52 ±0,14	0,66 ±0,06	0,15 ±0,01
	SMEE	0,28 ±0,02	2,21 ±0,01	1,68 ±0,03	8,84 ±0,14	4,46 ±0,14	0,16 ±0,00	29,86 ±0,04	0,23 ±0,00	18,34 ±0,24	0,58 ±0,05	0,08 ±0,00
8	SE				0,56 ±0,02	1,37 ±0,05		45,13 ±0,84	0,17 ±0,02	5,35 ±0,20	0,40 ±0,03	0,11 ±0,01
	ME				0,52 ±0,01	1,40 ±0,02		43,20 ±0,11	0,13 ±0,00	6,47 ±0,00	0,45 ±0,03	0,11 ±0,01
	SMEE				0,53 ±0,00	1,29 ±0,07		43,14 ±0,24	0,14 ±0,00	6,53 ±0,10	0,39 ±0,03	0,13 ±0,00
9	SE		9,32 ±0,41	5,20 ±0,46	29,25 ±1,17	9,05 ±0,33		14,20 ±0,87		16,62 ±0,82	0,55 ±0,05	
	ME		9,64 ±0,10	5,26 ±0,48	30,09 ±1,80	9,18 ±0,21		14,42 ±1,30		14,39 ±0,98	0,56 ±0,01	
	SMEE		9,17 ±0,50	5,34 ±0,04	30,77 ±1,76	9,16 ±0,28		14,29 ±0,35		14,07 ±0,82	0,52 ±0,00	
10	SE				0,33 ±0,03	0,91 ±0,06		15,76 ±1,19		10,61 ±0,21	0,48 ±0,04	0,28 ±0,01
	ME			0,41 ±0,04	0,46 ±0,02	1,11 ±0,02		17,58 ±0,15		9,72 ±0,15	0,40 ±0,00	0,21 ±0,00
	SMEE			0,71 ±0,04	0,67 ±0,01	1,77 ±0,02		18,68 ±0,35		9,85 ±0,06	0,41 ±0,02	0,18 ±0,02
11	SE		1,71 ±0,04	1,60 ±0,01	17,67 ±0,07	5,96 ±0,11		30,68 ±0,91		4,28 ±0,21	0,32 ±0,02	
	ME		1,88 ±0,01	1,53 ±0,02	17,01 ±0,08	5,66 ±0,10		30,68 ±0,95		4,11 ±0,17	0,30 ±0,03	
	SMEE		1,92 ±0,01	1,70 ±0,02	17,21 ±0,07	5,92 ±0,08		30,55 ±0,87		4,32 ±0,14	0,27 ±0,03	

Tabela 4.7. Sadržaj nezasićenih masnih kiselina izražen u % u odnosu na ukupne masne kiseline dobijen nakon primene ekstrakcije po Soxhlet-u (SE), mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu (ME) i simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije (SMEE), (rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja \pm SD)

		Masna kiselina							
Broj uzorka	Metoda	14:1	16:1	18:1t	18:1c	18:2t	18:2c	20:1	18:3
1	SE	0,40 \pm 0,00	0,79 \pm 0,00	1,88 \pm 0,02	9,92 \pm 0,26		3,82 \pm 0,02		0,29 \pm 0,01
	ME	0,40 \pm 0,02	0,69 \pm 0,04	1,77 \pm 0,02	9,23 \pm 0,03		3,46 \pm 0,02		0,22 \pm 0,01
	SMEE	0,35 \pm 0,02	0,74 \pm 0,04	1,84 \pm 0,03	8,59 \pm 0,12		3,71 \pm 0,09		0,24 \pm 0,00
2	SE		18,36 \pm 0,08	29,59 \pm 0,71	1,70 \pm 0,12	8,89 \pm 0,13			
	ME		18,26 \pm 0,18	31,22 \pm 0,01	1,80 \pm 0,04	10,74 \pm 0,15	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
	SMEE		18,22 \pm 0,15	31,39 \pm 0,27	1,85 \pm 0,07	10,03 \pm 0,05	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02
3	SE	0,63 \pm 0,05	1,33 \pm 0,10	1,19 \pm 0,08	22,37 \pm 0,11		7,42 \pm 0,01		0,43 \pm 0,04
	ME	0,67 \pm 0,00	1,42 \pm 0,08	1,24 \pm 0,04	22,74 \pm 0,78		7,75 \pm 0,18		0,45 \pm 0,02
	SMEE	0,67 \pm 0,01	1,25 \pm 0,06	1,09 \pm 0,07	21,64 \pm 0,39		8,39 \pm 0,17		0,43 \pm 0,03
4	SE		0,46 \pm 0,03	29,05 \pm 0,32			8,68 \pm 0,06		
	ME		0,33 \pm 0,02	29,57 \pm 0,51			8,66 \pm 0,16		0,16 \pm 0,01
	SMEE		0,34 \pm 0,01	28,74 \pm 0,41			8,98 \pm 0,12		0,21 \pm 0,02
5	SE			40,53 \pm 0,16			11,39 \pm 0,05		
	ME		0,13 \pm 0,01	38,61 \pm 0,77			11,10 \pm 0,03	0,17 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02
	SMEE		0,16 \pm 0,01	38,46 \pm 0,16			11,66 \pm 0,04	0,22 \pm 0,02	0,26 \pm 0,02

Nastavak tabele 4.7.

Masna kiselina									
Broj uzorka	Metoda	14:1	16:1	18:1t	18:1c	18:2t	18:2c	20:1	18:3
6	SE			25,64 ±0,13		13,67 ±0,19			
	ME			25,10 ±0,25		13,90 ±0,57			
	SMEE			25,90 ±0,88		13,53 ±0,43			
7	SE		0,22 ±0,00	27,91 ±0,05		6,10 ±0,01			
	ME		0,29 ±0,01	28,34 ±0,06		5,63 ±0,11		0,15 ±0,01	
	SMEE		0,28 ±0,00	26,82 ±0,06		5,98 ±0,05		0,20 ±0,01	
8	SE		0,17 ±0,05	2,15 ±0,10	31,97 ±0,54	12,28 ±0,24	0,15 ±0,02	0,19 ±0,02	
	ME		0,12 ±0,00	2,13 ±0,02	31,81 ±0,02	13,34 ±0,06	0,13 ±0,02	0,19 ±0,02	
	SMEE		0,11 ±0,00	2,00 ±0,03	31,05 ±0,03	14,33 ±0,12	0,14 ±0,00	0,22 ±0,02	
9	SE			1,05 ±0,08	13,70 ±1,36	1,06 ±0,19			
	ME			1,16 ±0,11	14,30 ±0,94	1,00 ±0,13			
	SMEE			1,10 ±0,11	14,44 ±1,08	1,14 ±0,13			
10	SE			41,65 ±0,89	29,31 ±1,48	0,67 ±0,02			
	ME			36,31 ±0,65	32,28 ±0,08	1,52 ±0,09			
	SMEE			34,94 ±0,66	31,03 ±1,04	1,76 ±0,07			
11	SE			28,04 ±1,03		9,74 ±0,07			
	ME			28,72 ±0,46		10,11 ±0,08			
	SMEE			28,36 ±0,37		9,75 ±0,07			

Može se zaključiti da se metodama zasnovanim na primeni mikrotalasnog zračenja postiže nešto bolja efikasnost u odnosu na referentnu metodu. Pored toga, dobro slaganje rezultata u pogledu sadržaja *trans* masnih kiselina ukazuje da pod dejstvom mikrotalasnog zračenja ne dolazi do promena u strukturi masnih kiselina, odnosno konverzije *cis* u *trans* izomere.

Poređenja radi, u tabeli 4.8. su dati optimalni uslovi simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacija i ekstrakcije po Soxhlet-u koja je korišćena kao referentna metoda. Jasno se mogu uočiti prednosti simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije:

- znatno skraćenje vremena pripreme uzorka za analizu, usled čega se značajno smanjuje potrošnja električne energije i zagađenje životne sredine (10 min/240 min)
- upotreba manjih količina rastvarača, što je veoma značajno u pogledu zaštite životne sredine
- manja potrebna količina uzorka i
- priprema uzorka za GC–MS analizu se obavlja u jednom koraku tako da je mogućnost gubitaka i kontaminacije svedena na minimum.

Kako je ustanovljeno da se primenom simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije postiže ista ili veća efikasnost u odnosu na ekstrakciju po Soxhlet-u, za mnogo kraće vreme, uz upotrebu manje količine rastvarača, uštedu električne energije i smanjeni štetni uticaj na životnu sredinu, može se zaključiti da se ova metoda može primeniti umesto uobičajeno korišćene ekstrakcije po Soxhlet-u u rutinskim analizama za određivanje sastava masnih kiselina, uključujući i *trans* izomere, u prehrambenim proizvodima.

Tabela 4.8. Poređenje optimalnih uslova simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacija (SMEE) sa referentnom metodom (Soxhlet ekstrakcija)

Metoda	Soxhlet ekstrakcija	SMEE
Masa uzorka (g)	5	1,5
Zapremina rastvarača (cm ³)	150	5
Vreme ekstrakcije (min)	≈ 220	5
Vreme uparavanja rastvarača (min)	≈ 10	-
Vreme pripreme metil estara (min)	≈ 10	-
Vreme fazne separacije (min)	-	≈ 5
Ukupno vreme pripreme uzorka za GC–MS analizu (min)	≈ 240	≈ 10

4.4. Određivanje sadržaja *trans* masnih kiselina u prehrambenim proizvodima

Po definisanju optimalnih uslova za izvođenje GC–MS analize, i razvijanju postupka pripreme uzoraka, usledilo je određivanje sastava masnih kiselina, sa posebnim akcentom na *trans* masne kiseline, u različitim proizvodima sa našeg tržišta (Tabela 3.2.) u cilju određivanja njihovih funkcionalnih osobina, odnosno njihove nutritivne vrednosti.

Analize uzoraka su izvedene u tri ponavljanja i određeni sadržaji masnih kiselina su prikazani u tabelama od 4.9. do 4.30.

Sadržaj masnih kiselina u analiziranim uzorcima ulja prikazan je u tabeli 4.9. i izražen je kao procentualni udeo u odnosu na ukupne masne kiseline. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standardna devijacija (RSD) kretala se u opsegu od 0,05% do 7,28 %.

Određen sastav masnih kiselina u uljima je očekivan, i u skladu je sa literaturnim podacima, odnosno odgovara sastavu masnih kiselina u odgovarajućem tipu ulja u drugim zemljama (Baylin *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2000; Dubois *et al.*, 2007; Aro *et al.*, 1998b; Ribarova *et al.*, 2003; Tavella *et al.*, 2000).

Prirodna biljna ulja ne sadrže *trans* masne kiseline. Do izomerizacije može doći tokom poslednjeg stupnja rafinacije biljnih ulja (deodorizacije), pri čemu najčešće dolazi do nastanka većih količina *trans* polinezasićenih masnih kiselina (Siew, 1989; Denecke, 1995). Međutim, u ispitivanim uzorcima ulja nisu detekovane značajne količine TFA. U samo dva uzorka je detektovano prisustvo *trans* izomera u količinama od 0,5% i 1,5% u odnosu na ukupne masne kiseline.

Masnokiselinski profil analiziranih uzoraka može ukazati na njihovo poreklo, odnosno dominantno biljno ulje ukoliko se radi o mešanom biljnom ulju. U uzorcima označenim brojem 1 i 6 dominira palmitinska kiselina čiji sadržaj prelazi 40%, što ukazuje na palmino ulje. Na osnovu visokog sadržaja linolne kiseline (oko 60%) u uzorcima broj 3, 4 i 5 može se zaključiti da se radi o suncokretovom ulju, dok visok sadržaj oleinske kiseline (oko 65%) u uzorcima 7, 8 i 9 ukazuje da se radi o maslinovom ili suncokretovom ulju oleinskog tipa. Na osnovu visokog sadržaja zasićenih masnih kiselina sa 8, 10, 12 i 14 ugljenikovih atoma u uzorku broj 2 može se zaključiti da se radi o kokosovom ulju.

Tabela 4.9. Sadržaj masnih kiselina u uljima (n = 3; RSD = 0,05–7,28 %)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
8:0		12,5							
10:0		8,2							
12:0	0,3	49,4				0,2			
14:0	1,4	15,1				1,5			
16:0	47,2	6,9	7,2	8,8	9,8	43,2	14,8	14,8	12,9
16:1							1,1	1,0	1,1
18:0	4,4	2,1	3,9	5,1	4,9	4,7	3,6	4,2	4,8
18:1t					0,5				
18:1c	36,5	4,9	23,4	25,0	24,4	38,2	66,2	69,6	63,8
18:2t				1,5					
18:2c	9,9	0,9	64,7	58,9	59,5	12,2	12,7	9,0	15,4
20:0	0,3		0,2		0,3		0,7	0,5	0,8
18:3							0,9	0,9	1,2
22:0			0,6	0,7	0,6				
SFA	53,6	94,2	11,9	14,6	15,6	49,6	19,1	19,5	18,5
MUFA	36,5	4,9	23,4	25,0	24,9	38,2	67,3	70,6	64,9
PUFA	9,9	0,9	64,7	60,4	59,5	12,2	13,6	9,9	16,6
TFA				1,5	0,5				

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim uzorcima jestivih („soft“) margarina proizvedenih 2006–2007. i 2008–2009. godine prikazan je u tabelama 4.10. i 4.11. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standarna devijacija se kretala u opsegu 0,09–11,52%.

Rezultati su pokazali da je sastav masnih kiselina u jestivim margarinima u posmatranim periodima veoma sličan. Dominantne masne kiseline bile su: linolna, oleinska i palmitinska. Prosečne vrednosti sadržaja linolne, oleinske i palmitinske kiseline u periodu 2006–2007. godine iznosile su 42,1; 42,5 i 15,3% redom, a u periodu od 2008–2009. godine 41,0; 24,6 i 17,3%. Visok sadržaj linolne kiseline ukazuje da se za proizvodnju jestivih margarina najviše koristi suncokretovo ulje.

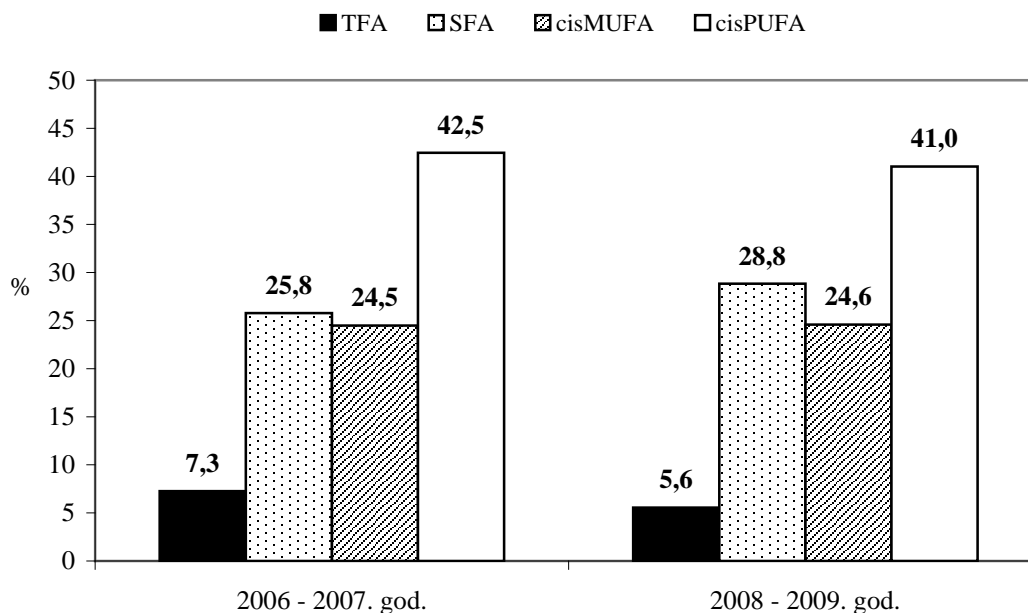
U 12 od 15 ispitivanih uzoraka u periodu od 2006–2007. godine detektovano je prisustvo *trans* masnih kiselina u količini od 2,8 do 15,8% u odnosu na ukupne masne kiseline, a u periodu od 2008–2009. godine sadržaj TFA u 9 od 13 ispitivanih uzoraka se kretao u intervalu 2,2–15,0%. Sadržaj *trans* masnih kiselina u jestivim margarinima sa našeg tržišta je sličan sadržaju TFA u Turskoj (Tekin *et al.*, 2002; Karabult & Turan, 2006), Švajcarskoj (Richter *et al.*, 2009) i Češkoj (Brat & Pokorny, 2000) dok je nešto viši u odnosu na austrijske (Wagner *et al.*, 2000) i portugalske proizvode (Torres *et al.*, 2002). Od ukupno 28 analiziranih

uzoraka jestivih margarina sedam zadovoljava dansku zakonsku regulativu u pogledu sadržaja TFA (www.tfx.org.uk/page116.html), odnosno sadrži manje od 2% *trans* masnih kiselina.

Sadržaj zasićenih masnih kiselina se kretao u intervalu od 16,5 do 36,1% u periodu 2006–2007. godine, odnosno od 18,1 do 46,5% u periodu 2008–2009. godine. Uočeno je da sa smanjenjem udela *trans* masnih kiselina u jestivim margarinima dolazi do porasta sadržaja, takođe aterogenih, ukupnih zasićenih masnih kiselina. Sadržaj zasićenih masnih kiselina sa 12, 14 i 16 ugljenikovih atoma se kretao u intervalu 9,5–29,0% (prosek 18,9%), u 2006–2007., odnosno od 12,2–40,1% (prosek 21,6%) u 2008–2009. godini.

Poređenja radi, na slici 4.6. dat je uporedni prikaz prosečnih sadržaja *trans*, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u jestivim margarinima u periodima 2006–2007. i 2008–2009. godine. Može se videti da je sadržaj TFA sa prosečnih 7,3% u 2006–2007. godini smanjen na 5,6% u 2008–2009. godini, dok je prosečan sadržaj zasićenih masnih kiselina nešto povećan, tako da je suma sadržaja nepoželjnih, *trans* i zasićenih masnih kiselina, praktično ista, iznosila je 33,1% u 2006–2007. i 34,4 % u 2008–2009. godini.

U cilju dobijanja zdravstveno ispravnijeg proizvoda proces proizvodnje margarina bi trebalo voditi u smeru smanjenja udela kako *trans*, tako i zasićenih masnih kiselina sa 12, 14 i 16 ugljenikovih atoma, uz povećanje sadržaja nezasićenih masti i stearinske kiseline, koja ne utiče na nivo holesterola u krvi (Van Poppel *et al.*, 1998.), a naravno pri tom postići odgovarajući kvalitet proizvoda, i odgovarajuću cenu.



Slika 4.6. Prosečan sadržaj *trans* (TFA), zasićenih (SFA), *cis*-mononezasićenih (*cis*MUFA) i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina (*cis*PUFA) u jestivim margarinima proizvedenim u 2006–2007. i 2008–2009. godini

Tabela 4.10. Sadržaj masnih kiselina u jestivim margarinima u 2006–2007. godini (n = 3; RSD = 0,09–9,52%.)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
12:0					8,8	7,9				6,5	7,5	7,9	7,1		
14:0		0,3			1,1					2,2	2,7	2,4		0,2	
16:0	16,4	22,1	9,5	17,1	22,2	14,3	10,1	12,9	13,2	14,7	18,8	10,1	10,8	19,6	17,3
18:0	5,9	5,3	7,0	5,1	5,1	5,0	7,5	7,3	6,6	9,4	7,1	7,5	10,7	6,8	5,8
18:1t	8,1	3,2	8,1	2,8	3,3	11,2	11,4	12,4	9,3			11,4		15,8	11,8
18:1c	25,6	24,9	24,9	39,6	25,1	23,7	23,9	26,3	21,9	17,9	17,8	23,9	16,0	28,4	27,3
18:2c	44,0	43,8	50,5	29,5	44,3	35,9	39,2	41,1	49,0	49,3	46,1	39,2	53,0	29,4	37,1
20:0		0,4													0,3
18:3				5,9											
22:0															0,2
SFA	22,3	28,1	16,5	22,2	27,3	29,2	25,4	20,2	19,8	32,8	36,1	25,4	31,0	26,4	23,8
MUFA	33,7	28,1	33,0	42,4	28,4	34,9	35,4	38,7	31,2	17,9	17,8	35,4	16,0	44,2	39,1
PUFA	44,0	43,8	50,5	35,4	44,3	35,9	39,2	41,1	49,0	49,3	46,1	39,2	53,0	29,4	37,1
TFA	8,1	3,2	8,1	2,8	3,3	11,2	11,4	12,4	9,3			11,4		15,8	11,8
Sadržaj masti (g/100 g)	80,8	61,2	24,8	58,1	57,6	80,6	61,2	26,0	81,1	60,3	47,7	26,5	25,5	82,1	61,0
SFA (g/100 g marg)	18,0	17,2	4,1	12,9	15,7	23,6	15,6	5,3	16,1	19,8	17,2	6,7	7,9	21,7	14,5
MUFA (g/100 g marg)	27,2	17,2	8,2	24,7	16,4	28,1	21,7	10,1	25,3	10,8	8,5	9,4	4,1	36,3	23,8
PUFA (g/100 g marg)	35,5	26,8	12,5	20,6	25,5	28,8	24,0	10,7	39,7	29,7	22,0	10,4	13,5	24,2	22,7
TFA (g/100 g marg)	6,5	2,0	2,0	1,7	1,9	9,0	7,0	3,2	7,5			3,0		12,9	7,2

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Tabela 4.11. Sadržaj masnih kiselina u jestivim margarinima u 2008–2009. godini (n = 3; RSD = 0,19–11,52%.)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
8:0			0,8		0,1		0,2	3,5			0,8		
10:0			0,6		0,2		0,2	2,0			0,5		
12:0	4,8	3,5	4,1		3,2		3,3	9,4			5,6	0,4	7,7
14:0	1,5	1,5	1,8	0,3	1,1	0,2	1,2	2,6			1,5	0,5	1,6
16:0	18,9	21,7	23,5	12,6	11,6	12,2	11,2	22,9	12,2	40,1	10,6	15,2	12,0
17:0					0,1								
18:0	5,0	4,5	4,7	8,6	8,1	7,2	8,3	4,1	5,9	6,4	6,2	5,7	5,1
18:1t				12,0	14,4	8,4	13,2		3,9	4,4	7,8	2,2	4,6
18:1c	21,7	25,9	23,8	26,1	28,5	26,6	28,4	20,4	24,6	29,8	21,3	21,7	20,7
18:2t				0,3	0,6		0,4						
18:2c	48,1	42,9	39,9	38,6	31,0	44,4	32,3	35,1	53,4	19,3	45,7	54,3	48,3
20:0			0,3	0,4	0,3	0,3	0,3						
20:1								0,1					
22:0			0,5	0,8	0,6	0,6	0,7						
24:0				0,3	0,2	0,1	0,2						
SFA	30,2	31,2	36,3	23,0	25,5	20,6	25,6	44,5	18,1	46,5	25,2	21,8	26,4
MUFA	21,7	25,9	23,8	38,1	42,9	35,0	41,7	20,4	28,5	34,2	29,1	23,9	25,3
PUFA	48,1	42,9	39,9	38,9	31,6	44,4	32,7	35,1	53,4	19,3	45,7	54,3	48,3
TFA				12,3	15,0	8,4	13,6		3,9	4,4	7,8	2,2	4,6
Sadržaj masti (g/100 g)	25,5	61,3	81,2	60,7	80,2	81,1	26,2	81,9	81,0	78,7	60,2	25,3	54,0
SFA (g/100 g marg)	7,7	19,1	29,5	14,0	20,5	16,7	6,7	36,5	14,7	36,6	15,2	5,5	14,3
MUFA (g/100 g marg)	5,5	15,9	19,3	23,1	34,4	28,4	10,9	16,7	23,1	26,9	17,5	6,1	13,7
PUFA (g/100 g marg)	12,3	26,3	32,4	23,6	25,4	36,0	8,6	28,8	43,3	15,2	27,5	13,8	26,1
TFA (g/100 g marg)				7,5	12,0	6,8	3,6	3,2	3,5	4,7	0,6	2,5	

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiselin

Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim uzorcima margarina za domaćinstvo prikazan je u tabeli 4.12. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standardna devijacija se kretala u opsegu od 0,50% do 9,02%.

Kao što se iz tabele 4.12. može videti, u margarinima za domaćinstvo dominirale su četiri masne kiseline: oleinska, linolna, elaidinska i palmitinska. Udeo oleinske kiseline bio je najviši i kretao se u intervalu od 16,0 do 34,8%, dok su prosečne vrednost udela linolne, elaidinske i palmitinske kiseline iznosile 21,8; 20,4 i 15,7% redom.

Laurinska i miristinska kiselina, koje se smatraju mogućim aterogenim faktorom rizika, nisu detektovane u pet uzorka margarina za domaćinstvo, dok je u ostalim uzorcima sadržaj ovih kiselina iznosio 0,4–20,1%, odnosno 0,3–4,4%, što je više u odnosu na literaturne podatke po kojima je udeo laurinske oko 2 %, a miristinske kiseline približno 1% (Precht & Molquentin, 2000b; Brat & Pokorny, 2000).

U 14 od 15 ispitivanih uzoraka detektovano je prisustvo *trans* masnih kiselina u količini od 1,5 do 32,3% u odnosu na ukupne masne kiseline što je u skladu sa literaturnim podacima za ovu vrstu proizvoda (Aro *et al.*, 1998b; Precht & Molquentin, 2000b; Brat & Pokorny, 2000; Tekin *et al.*, 2002). Dominantan *trans* izomer bio je C18:1*t*, kao što je i očekivano s obzirom da se kao osnovna komponenta za proizvodnju margarina koriste hidrogenovana biljna ulja, dok je u 8 uzoraka detektovano i prisustvo *trans* izomera linolne kiseline. Sadržaj *trans* izomera linolne kiseline kretao se u opsegu od 0,8% do 3,4%.

Samo tri ispitivana uzoraka zadovoljavaju dansku zakonsku regulativu u pogledu sadržaja TFA (www.tfx.org.uk/page116.html), odnosno sadrže manje od 5% *trans* masnih kiselina.

Sadržaja zasićenih masnih kiselina se kretao u intervalu od 16,0 do 58,0%, pri čemu je najviši sadržaj određen u uzorku broj 5 koji ne sadrži *trans* izomere, što je uočeno i u drugim studijama (Aro *et al.*, 1998b; Brat & Pokorny, 2000; Tekin *et al.*, 2002) koje su pokazale da sa smanjenjem udela *trans* masnih kiselina u margarinima za domaćinstvo dolazi do porasta sadržaja, takođe aterogenih, ukupnih zasićenih masnih kiselina.

Masti, kao jedan od osnovnih sastojaka prehrambenih proizvoda utiču na ukus, konzistenciju, teksturu i ostale fizičke osobine proizvoda koji ih sadrže. Funkcionalna uloga masti u prehrambenim tehnologijama, pre svega u tehnologiji pekarskih i konditorskih proizvoda, je višestruka (O'Brien, 2003; Timms, 2003). Masti određuju fizičke, senzorne i reološke karakteristike samog proizvoda, utiču na teksturu i punoću ukusa, imaju pozitivan efekat na svežinu proizvoda (Timms, 2003; Zoulias *et al.*, 2002). U tehnologijama konditorskih i pekarskih proizvoda, kao jedna od sirovina koriste se industrijski margarini i različite vrste namenskih masti, pri čemu je u nekim proizvodima udeo masti značajan (30–40%). Stoga masti

Tabela 4.12. Sadržaj masnih kiselina u margarinima za domaćinstvo (n = 3; RSD = 0,50–9,02%)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
8:0							0,2	0,3	0,3	0,3		0,4			0,5
10:0							0,2	0,3	0,2	0,2		0,3			0,5
12:0			16,9	8,1	20,1		0,4	2,8	4,2	3,8		4,7	0,4	7,7	
14:0			4,4	2,0	3,3		0,3	1,1	1,5	1,4		1,8	0,4	2,8	
16:0	20,6	20,4	14,7	18,1	24,2	19,7	12,4	13,8	12,6	13,2	8,2	15,8	14,9	18,6	8,8
17:0									0,1	0,1					
18:0	8,4	7,3	8,3	6,7	10,4	7,9	10,1	9,5	10,6	10,0	5,9	11,5	11,5	12,5	6,0
18:1t	22,4	19,0	15,2	20,5		18,5	28,5	27,3	27,2	30,4	2,8	23,3	26,5	20,7	1,5
18:1c	29,2	34,8	24,4	33,1	16,0	26,7	31,6	31,7	28,5	27,7	24,1	23,5	24,9	21,0	23,2
18:2t				0,8			2,0	1,8	1,3	1,9		2,2	3,4	0,9	
18:2c	19,4	18,5	16,1	10,4	26,0	27,2	13,5	10,6	12,2	9,9	56,9	15,3	17,0	14,3	59,3
20:0				0,2			0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,5	
20:1									0,1	0,1					
20:2															
22:0				0,1			0,6	0,4	0,5	0,5	1,5	0,6	0,5		1,2
24:0							0,1	0,2	0,1	0,1	0,2				
SFA	29,0	27,7	44,3	35,2	58,0	27,6	24,4	28,6	30,6	30,0	16,2	35,7	28,2	43,1	16,0
MUFA	51,6	53,8	39,6	53,6	16,0	45,2	60,1	59,0	55,8	58,2	26,9	46,8	51,4	41,7	24,7
PUFA	19,4	18,5	16,1	11,2	26,0	27,2	15,5	12,4	13,6	11,8	56,9	17,5	20,4	15,2	59,3
TFA	22,4	19,0	15,2	21,3		19,5	30,5	29,1	28,5	32,3	2,8	25,5	29,9	21,6	1,5
Sadržaj masti (g/100g)	81,1	80,2	82,2	79,8	81,0	80,7	71,2	80,3	80,8	81,5	81,5	80,7	72,2	82,2	81,8
SFA (g/100g marg)	23,5	22,2	36,4	28,1	47,0	22,3	17,4	23,0	24,7	24,4	13,2	28,8	20,4	35,4	13,1
MUFA (g/100g marg)	42,0	43,2	32,5	42,8	13,0	38,1	42,8	47,4	45,1	47,4	21,9	37,8	37,1	34,3	20,2
PUFA (g/100g marg)	15,7	14,8	13,2	8,9	21,1	22,8	11,0	10,0	11,0	9,6	46,4	14,1	14,7	12,5	48,5
TFA (g/100g marg)	18,2	15,3	12,5	17,0		15,7	21,7	23,4	23,0	26,3	2,3	20,6	21,6	17,8	1,2

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

korišćene pri proizvodnji pekarskih i konditorskih proizvoda u značajnoj meri utiču na sadržaj *trans* masnih kiselina u finalnom proizvodu, a samim tim i na njegovu nutritivnu vrednost. S toga je u okviru ovog rada određivan i sastav masnih kiselina u industrijskim margarinima, namenskim mastima i masnim punjenjima koji se koriste pri proizvodnji pekarskih i konditorskih proizvoda.

Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim uzorcima industrijskih margarina proizvedenih 2006–2007., 2008. i 2009. godine prikazan je u tabelama 4.13., 4.14. i 4.15. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standarna devijacija se kretala u opsegu 0,33–10,23 %

Tabela 4.13. Sadržaj masnih kiselina u industrijskim margarinima proizvedenim 2006–2007. godine (n = 3; RSD = 0,53–9,11%)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10:0										0,5
12:0	0,1	0,2					0,6		0,5	8,8
14:0	1,5	1,6	1,2	1,6	3,3	1,0	1,9		2,1	2,7
16:0	41,3	43,8	43,6	47,1	47,8	42,5	51,8	18,8	43,1	20,4
18:0	6,4	5,4	7,3	6,8	3,7	4,7	4,2	6,2	4,5	9,5
18:1t	11,0	9,2	6,8	6,3	2,1	5,6	7,0	30,3	2,5	
18:1c	25,2	25,3	26,8	25,2	29,8	30,5	24,7	41,9	29,9	19,0
18:2c	13,6	14,1	14,0	12,8	13,3	15,7	9,5	2,8	17,1	38,9
20:0	0,4	0,3	0,3	0,2			0,3		0,3	0,2
18:3	0,1	0,1								
22:0	0,4									
SFA	50,1	51,3	52,4	55,7	54,8	48,2	58,8	25,0	50,5	42,1
MUFA	36,2	34,5	33,6	31,5	31,9	36,1	31,7	72,2	32,4	19,0
PUFA	13,7	14,2	14,0	12,8	13,3	15,7	9,5	2,8	17,1	38,9
TFA	11,0	9,2	6,8	6,3	2,1	5,6	7,0	30,3	2,5	
Sadržaj masti (g/100g)	81,2	82,3	80,0	80,9	82,4	84,6	83,1	81,5	80,5	81,2
SFA (g/100g marg)	40,7	42,2	41,9	45,1	45,2	40,7	48,9	20,5	40,6	34,2
MUFA (g/100g marg)	29,4	28,4	26,9	25,5	26,3	30,5	26,3	58,8	26,0	15,4
PUFA (g/100g marg)	11,2	11,7	11,2	10,3	11,0	13,3	7,9	2,2	13,8	31,6
TFA (g/100g marg)	8,9	7,6	5,4	5,1	1,8	4,7	5,8	24,7	2,1	

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da se po sastavu masnih kiselina industrijski margarini proizvedeni u periodu 2006–2007. godine nešto razlikuju u odnosu na proizvode iz 2008. i 2009. godine koji su veoma slični.

Dominantne masne kiseline u industrijskim margarinima proizvedenim 2006–2007. godine bile su palmitinska, oleinska i linolna sa prosečnim udelom 40,0%; 27,8% i 15,2%

redom, dok su u 2008. i 2009. godini u industrijskim margarinima bile najzastupljenije palmitinska, oleinska i elaidinska kiselina. Prosečne vrednosti sadržaja palmitinske, oleinske i elaidinske kiselina u 2008. godine su iznosile 36,0; 29,9 i 23,4% redom, a u 2009. godini 30,3; 25,7 i 21,2%.

Prosečan sadržaj *trans* masnih kiselina u 2006–2007. godini iznosio je 8,1% u odnosu na ukupne masti, u 2008. 9,6%, a u 2009. 12,7%. Poredeći prosečnu vrednost sadržaja TFA u industrijskim margarinima sa našeg tržišta sa literaturnim podacima utvrđeno je da su naši proizvodi slični grčkim (10,0%) (Kafatos *et al.*, 1994), ali sadrže više TFA u odnosu na danske (3,0%) (Ovesen *et al.*, 1996) i francuske (3,8%) (Bayard & Wolff, 1995) industrijske margarine. Sa druge strane sadržaj TFA u analiziranim industrijskim margarinima je niži u odnosu na margarine iz Turske (24,2%) (Arici *et al.*, 2002) i Pakistana (13,1%) (Anwar *et al.*, 2006).

Tabela 4.14. Sadržaj masnih kiselina u industrijskim margarinima u 2008. godini (n = 3; RSD = 0,33–10,08%)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8:0	1,5								1,1	
10:0	1,3								0,9	
12:0	9,6	1,0	0,8			0,3	0,4	0,5	11,1	
14:0	2,2		2,3	1,6	1,2	1,4	1,3	1,3	3,7	1,3
16:0	15,8	17,6	52,8	47,9	38,4	42,6	39,4	48,7	11,5	45,3
16:1						0,2	0,2			
17:0						0,1	0,1		0,1	
18:0	8,5	9,4	4,7	4,8	4,6	6,3	5,9	5,9	9,3	7,5
18:1t	28,3	38,7							22,9	3,5
18:1c	23,5	24,3	26,5	34,4	32,2	31,8	32,7	31,7	27,4	34,2
18:2t	0,6					0,3	0,3	0,2	1,1	
18:2c	8,7	9,0	12,9	10,0	23,6	15,9	18,7	11,2	10,1	8,2
20:0				0,3		0,5	0,4	0,5	0,3	
20:1						0,2	0,2			
18:3				1,0		0,1	0,2			
22:0						0,2	0,2		0,4	
24:0						0,1			0,1	
SFA	38,9	28,0	60,6	54,6	44,2	51,5	47,7	56,9	38,5	54,1
MUFA	51,8	63,0	26,5	34,4	32,2	32,2	33,1	31,7	50,3	37,7
PUFA	9,3	9,0	12,9	11,0	23,6	16,3	19,2	11,4	11,2	8,2
TFA	28,9	38,7				0,3	0,3	0,2	24,0	3,5
Sadržaj masti (g/100g)	81,1	82,0	81,1	82,1	80,1	81,1	82,1	81,1	80,1	82,1
SFA (g/100g marg)	47,6	23,0	49,1	44,9	35,4	41,8	39,2	46,2	30,8	44,4
MUFA (g/100g marg)	42,0	51,7	21,5	28,3	25,8	26,1	27,2	25,7	40,3	30,9
PUFA (g/100g marg)	7,5	7,4	10,5	9,0	18,9	13,2	15,8	9,2	9,0	6,7
TFA (g/100g marg)	23,4	31,7				0,2	0,2	0,2	19,2	2,9

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Od ukupno 27 analiziranih uzoraka industrijskih margarina 13 zadovoljava dansku zakonsku regulativu u pogledu sadržaja TFA (www.tfx.org.uk/page116.html), odnosno sadrže manje od 5% *trans* masnih kiselina.

Sadržaj zasićenih masnih kiselina kretao se u intervalu 25,1–58,8% u 2006–2007. godini, 28,0–60,6% u 2008. i 25,8–60,9% u 2009. godini. Kao i u slučaju jestivih i margarina za domaćinstvo, uočen je trend porasta sadržaja zasićenih masnih kiselina sa smanjenjem sadržaja *trans* masnih kiselina, posebno palmitinske kiseline. Jedino u uzorku broj 10 iz 2006–2007. godine (Tabela 4.13.) koji ne sadrži TFA, nije povećan sadržaj palmitinske kiseline nego linolne kiseline.

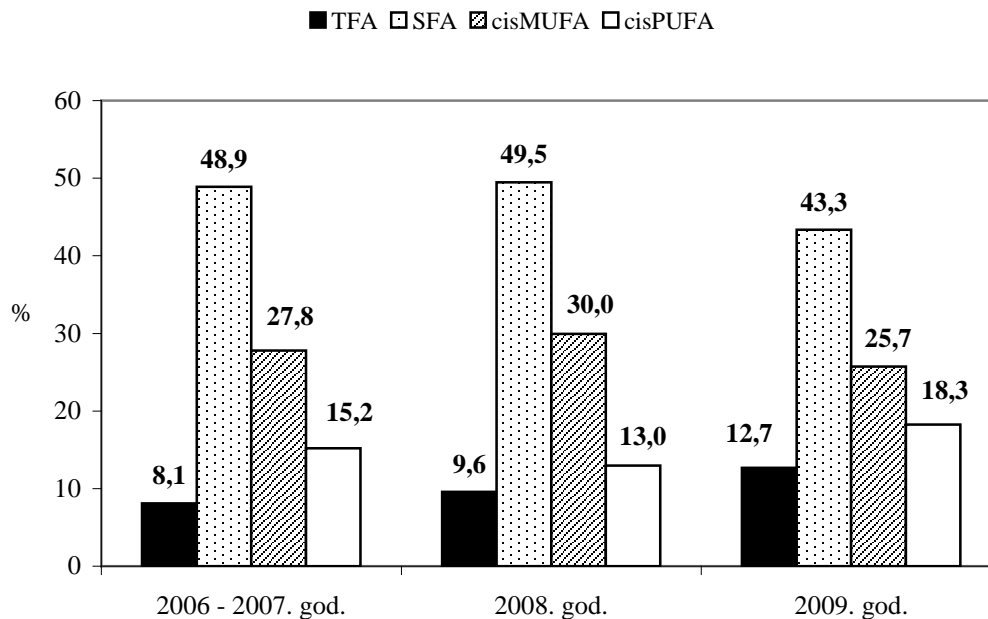
Tabela 4.15. Sadržaj masnih kiselina u industrijskim margarinima u 2009. godini (n = 3; RSD = 0,42–10,23 %)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka						
	1	2	3	4	5	6	7
8:0				0,7			
10:0				0,4			
12:0		0,2	0,7	6,3	0,2		0,6
14:0	1,7	0,6	0,4	1,9	0,3	1,5	2,1
16:0	46,5	22,9	11,5	19,3	14,9	55,2	42,1
18:0	4,2	16,2	11,8	12,1	13,9	4,2	6,6
18:1t		19,6	19,8	22,5	22,7		
18:1c	27,7	21,5	23,1	21,8	29,5	27,2	29,2
18:2t			0,8	1,1	2,3		
18:2c	19,9	18,0	30,5	13,9	14,8	11,9	18,8
20:0		0,5	0,6		0,7		0,6
22:0		0,5	0,8		0,7		
SFA	52,4	40,9	25,8	40,7	30,7	60,9	52,0
MUFA	27,7	41,1	42,9	44,3	52,2	27,2	29,2
PUFA	19,9	18,0	31,3	15,0	17,1	11,9	18,8
TFA		19,6	20,6	23,6	25,0		
Sadržaj masti (g/100g)	80,2	80,3	81,2	81,4	80,9	82,3	82,1
SFA (g/100g marg)	42,0	32,9	20,9	33,1	24,8	50,1	42,7
MUFA (g/100g marg)	22,2	33,0	34,8	36,1	42,3	22,4	24,0
PUFA (g/100g marg)	16,0	14,5	25,4	12,2	13,8	9,8	15,4
TFA (g/100g marg)		15,7	16,7	19,2	20,2		

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Poređenja radi, na slici 4.7. je dat uporedni prikaz prosečnih sadržaja *trans*, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u industrijskim margarinima u 2006–2007., 2008. i 2009. godini.

Ukoliko bi se posmatrao samo sadržaj TFA u industrijskim margarinima moglo bi se zaključiti da se njihova nutritivna vrednost smanjuje od 2006. do 2009. godine. Iako je prosečan sadržaj TFA u industrijskim margarinima proizvedenim u 2009. godini najviši, sadržaj zasićenih masnih kiselina je smanjen, a udeo *cis*-polinezasićenih masnih kiselina je povećan, tako da se može zaključiti da je nutritivna vrednost industrijskih margarina tokom posmatranog vremenskog perioda konstantna.



Slika 4.7. Prosečan sadržaj *trans* (TFA), zasićenih (SFA), *cis*-mononezasićenih (*cis*MUFA) i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina (*cis*PUFA) u industrijskim margarinima u 2006–2007., 2008. i 2009. godini

Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim uzorcima namenskih masti dat je u tabelama 4.16., 4.17., 4.18. i 4.19. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost od tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standardna devijacija se kretala u opsegu od 0,23–7,34 %.

U tabelama 4.16., 4.17. i 4.18. dat je sastav masnih kiselina namenskih masti jednog proizvođača (dodeljena mu je oznaka A) u 2007., 2008. i 2009. godini redom. U tabeli 4.19. dat je sadržaj masnih kiselina u namenskim mastima ostalih proizvođača u periodu 2007–2009. godina, gde su uzorci obeleženi brojem 1–3 iz 2007. godine, 4–16 iz 2008. godine i 17–24 iz 2009. godine.

Na slikama 4.8. i 4.9. dat je uporedni prikaz prosečnih sadržaja *trans*-, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u namenskim mastima proizvođača A i različitih proizvođača u 2007., 2008. i 2009. godini.

Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da je sastav masnih kiselina namenskih masti proizvođača A proizvedenih u 2007., 2008. i 2009. godini veoma sličan. Dominantne masne kiseline u analiziranim uzorcima su oleinska, elaidinska i palmitinska sa prosečnim sadržajem od oko 30%, 25% i 15%, redom.

Sadržaj zasićenih masnih kiselina se kretao u intervalu 17,7–64,7%; 20,0–74,9% i 20,4–60,0% u 2007., 2008. i 2009. godini, redom. U grupi zasićenih masnih kiselina najzastupljenije su bile palmitinska i stearinska. Prosečan sadržaj palmitinske kiseline u posmatranom vremenskom periodu je iznosio 14,8; 16,8 i 16,5%, a stearinske 10,4; 11,1 i 12,4%. Rezultati ukazuju da se u proizvodnji namenskih masti u velikoj meri koristi palmino ulje, što je i očekivano jer masti sa većim sadržajem palmitinske kiseline prirodno kristališu u β' polimorfnom obliku. U praksi je prisutna tendencija da se izborom sirovina i načinom prerade proizvedu masti za potrebe pekarske i konditorske industrije koje pretežno kristališu u β' polimorfnom obliku jer utiču na stabilnost emulzije, glatkoću i poseduju dobre aeracione karakteristike (formiranje brojnih, sitnih mehurića vazduha u mastima) (Wassel & Young, 2007). Prosečan sadržaj aterogenih zasićenih masnih kiselina, laurinske, miristinske i palmitinske iznosio je 21,0; 22,2 i 18,6% u 2007., 2008. i 2009. godini., što je znatno više u odnosu na danske i španske namenske masti (Ovens *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 2002).

Sadržaj *cis*-nezasićenih masnih kiselina u namenskim mastima proizvođača A u 2007., 2008. i 2009. godine se kretao u intervalima 19,9–58,3%; 17,1–59,1% i 23,3–58,7% redom. Dominantna masna kiselina iz grupe *cis*-mononezasićenih masnih kiselina bila je oleinska sa prosečnim sadržajem od oko 30%, dok je u grupi *cis*-polinezasićenih masnih kiselina bila najzastupljenija linolna sa prosečnim sadržajem od oko 6% u 2007. i 2008. godini, odnosno 8,9% u 2009. godini.

Sadržaj *trans* masnih kiselina kretao se u širokom rasponu i iznosio je 0,6–44% (prosek 29,1%) u 2007. godini, 2,4–42,1% (prosek 27,8%) u 2008. godini i 3,4–37,3% (prosek 27,5%) u 2009. godini. Slični rezultati su dobijeni u Poljskoj i Češkoj gde se sadržaj TFA u namenskim mastima kretao u opsegu od 0,1–56,6% (Basol & Tasan, 2008), odnosno 16,5–59,1% (Brát & Pokorný, 2000). Od ukupno 52 uzorka analizirana u navedenom vremenskom periodu 43 sadrži 20,9–44,0% *trans* masnih kiselina, 3 uzorka sadrže 10,2–15,6% TFA, dok preostalih 6 uzoraka sadrže manje od 5% TFA te zadovoljavaju dansku zakonsku regulativu (www.tfx.org.uk/page116.html). Visok sadržaj *trans* masti ukazuje da je proizvođač A za proizvodnju namenskih masti u najvećoj meri koristio parcijalno hidrogenovana ulja.

Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 4.19. i slika 4.9.) može se videti da se sadržaj masnih kiselina u namenskim mastima ostalih proizvođača menjao u toku 2007., 2008. i 2009. godine. Od 2007. do 2009. godine dolazi do smanjenja sadržaja aterogenih masnih kiselina, uz istovremeno povećanje sadržaja, sa zdravstvenog aspekta poželjnih, *cis*- mono- i polinezasićenih masnih kiselina. Prosečan sadržaj sume laurinske, miristinske, palmitinske i *trans* masnih kiselina u 2007., 2008. i 2009. godini je iznosio 64,1%, 56,2% i 50,3%, redom. Sadržaj *trans* masnih kiselina u posmatranom vremenskom periodu se kretao od 0,0 do 48,7%, a prosečna vrednost je iznosila 15,8%. Trinaest od 24 ispitivana uzorka sadrži manje od 5% TFA, te zadovoljava dansku zakonsku regulativu (www.tfx.org.uk/page116.html), dok je u preostalim uzorcima sadržaj TFA veoma visok. Dobijeni rezultati ukazuju da se u proizvodnji namenskih masti pored parcijalno hidrogenovanih ulja i masti, koristi i kombinacija ovih ulja i masti sa drugim tipovima biljnih ulja, kao i različiti tehnološki postupci.

Sadržaj *trans* masnih kiselina u svih 76 ispitivanih uzoraka namenskih masti u periodu 2007–2009. godine kretao se u opsegu od 0,0 do 48,7%, a prosečna vrednost je iznosila 24,3% što je znatno više u odnosu na namenske masti proizvedene u Španiji (6,6%) (Alonso *et al.*, 2002), Danskoj (6,5%) (Leth *et al.*, 2003), Kosta Riki (1,3%) (Baylin *et al.*, 2007) i Turskoj (Basol & Tasan, 2008).

Imajući u vidu nepoželjno dejstvo *trans* masnih kiselina na zdravlje ljudi, pred proizvođačima namenskih masti stoji nimalo lak zadatak, smanjiti sadržaj TFA i razviti funkcionalan proizvod istih ili veoma sličnih karakteristika. Naime, *trans* izomeri utiču na tačku topljenja, teksturalna svojstva i oksidativnu stabilnost. Sem toga, *trans* masne kiseline utiču na kinetiku kristalizacije masti, potpomažu formiranje kristala u poželjnom β' polimorfnom obliku, čak i kada postoji prirodna tendicija ka formiranju β polimorfnog oblika (Wassell & Young, 2007). Stoga zamena *trans* izomera zahteva uvođenje drugog kinetičkog mehanizma koji će omogućiti formiranje željenih polimorfnih oblika. Jednostavno, smanjenje sadržaja *trans* masti, ukoliko se ne vodi računa o kristalnoj formi, može negativno uticati na funkcionalnost finalnog proizvoda (Mayamol *et al.*, 2004). Dodatkom ulja semena pamuka, loja, hidrogenovanog palminog ulja i ribljeg ulja obezbeđuje se formiranje poželjnijeg β' kristalnog oblika (Ghotra *et al.*, 2002).

Masna punjenja se veoma mnogo koriste u različitim konditorskim proizvodima kao što su praline, vafel proizvodi i punjeno čajno pecivo, te utiču na njihovu nutritivnu vrednost. Kako mnoga masna punjenja sadrže hidrogenovane masti, u okviru ovog rada je određen sastav masnih kiselina u šest uzoraka masnih punjenja.

Tabela 4.16. Sadržaj masnih kiselina u namenskim mastima proizvođača A u 2007. godini (n = 3; RSD = 0,23–6,11 %)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
8:0	0,3											2,2	3,6		1,2			
10:0	0,2							0,1				1,9	3,2		1,0			
12:0	4,8	0,6	1,0	0,6	0,7	0,2	0,3	0,2	2,8			22,4	33,2	0,6	13,3		0,3	0,3
14:0	1,5	0,3	0,5	0,3	0,4	0,2	0,3	0,1	1,0	0,1		7,8	10,5	1,6	5,0		0,3	0,2
16:0	12,9	12,3	12,3	12,1	12,2	12,0	14,7	8,2	12,9	12,1	11,6	16,5	9,1	46,5	22,2	12,4	14,0	12,2
18:0	7,9	9,5	11,7	12,9	15,3	16,9	10,7	6,3	10,9	13,8	10,8	5,7	4,6	5,2	9,3	12,3	12,5	10,7
18:1t	23,7	30,5	29,6	32,8	34,9	38,1	29,6	20,8	31,4	40,6	37,8	10,7	9,1	0,4	15,1	42,8	34,6	30,2
18:1c	34,0	34,9	33,4	31,5	30,1	28,7	34,1	41,8	31,0	31,8	32,3	25,2	19,5	35,1	26,6	29,8	31,6	35,8
18:2t	2,7	2,8	2,9	2,7	1,8	1,3	2,6	3,2	2,3		2,4	0,8	1,1	0,2	0,5	1,2	1,4	1,8
18:2c	10,3	7,9	6,8	5,6	3,6	1,4	6,9	16,1	6,4	0,4	3,9	6,3	5,4	10,0	5,1	0,7	4,3	8,0
20:0	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4
20:1	0,5	0,2	0,1	0,3				0,1										
18:3	0,3		0,2					0,3	0,2		0,2	0,1	0,2					
22:0	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,4	2,2	0,5	0,5	0,4	0,2	0,2		0,2	0,4	0,5	0,4
24:0		0,1	0,4	0,2		0,2		0,2	0,1	0,2			0,1					
SFA	28,5	23,7	27,0	27,1	29,6	30,5	26,8	17,7	28,7	27,2	23,4	56,9	64,7	54,3	52,7	25,5	28,1	24,2
MUFA	58,2	65,6	63,1	64,6	65,0	66,8	63,7	62,7	62,4	72,4	70,1	35,9	28,6	35,5	41,7	72,6	66,2	66,0
PUFA	13,3	10,7	9,9	8,3	5,4	2,7	9,5	19,6	8,9	0,4	6,5	7,2	6,7	10,2	5,6	1,9	5,7	9,8
TFA	26,4	33,3	32,5	35,5	36,7	39,4	32,2	24,0	33,7	40,6	40,2	11,5	10,2	0,6	15,6	44,0	36,0	32,0

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–trans masne kiseline

Tabela 4.17. Sadržaj masnih kiselina u namenskim mastima proizvođača A u 2008. godini (n = 3; RSD = 0,34–7,34 %)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
8:0						0,5							3,6				4,0
10:0						0,4							2,3				3,2
12:0	0,5	0,2	0,4	0,7	0,2	6,5			0,2	0,2	0,1			25,1	0,4	1,1	33,0
14:0	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2	2,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	1,9	6,0	0,5	0,6	9,3	
16:0	12,0	12,1	13,2	12,6	13,0	13,7	15,5	10,5	15,3	13,4	13,8	10,9	50,3	27,7	17,5	12,6	21,3
18:0	10,0	11,5	12,0	13,9	17,6	19,6	10,5	7,0	10,6	15,1	13,2	12,7	4,9	4,9	12,0	9,1	4,1
18:1t	29,0	23,8	27,3	26,9	27,6	29,6	30,4	16,6	25,7	36,1	28,0	28,8	2,4	3,9	24,6	27,9	4,1
18:1c	25,8	33,2	32,5	32,0	33,4	29,7	24,2	37,5	31,9	32,5	33,3	32,0	29,9	20,8	32,5	37,5	16,0
18:2t	13,1	9,6	7,4	3,8	1,8	2,2	5,0	4,3	8,8		4,7	8,3			5,9	5,1	
18:2c	7,5	6,3	5,2	7,8	4,5	3,4	4,2	21,6	5,7	1,1	5,0	4,3	10,6	5,7	5,5	4,9	5,0
20:0	0,9	1,3	1,0	1,0	0,9	0,8	0,3	0,5	0,8	0,8	0,8	1,0			0,6	0,6	
20:1		0,6										0,3					
22:0	0,8	0,8	0,7	0,9	0,8	0,8	0,3	1,8	0,7	1,0	0,7	1,0			0,5	0,6	
24:0		0,3										0,4					
SFA	24,6	26,5	27,6	29,5	32,7	35,1	36,2	20,0	27,9	30,3	29,0	26,3	57,1	69,6	31,5	24,6	74,9
MUFA	54,8	57,6	59,8	58,9	61,0	59,3	54,6	54,1	57,6	68,6	61,3	61,1	32,3	24,7	57,1	65,4	20,1
PUFA	20,6	15,9	12,6	11,6	6,3	5,6	9,2	25,9	14,5	1,1	9,7	12,6	10,6	5,7	11,4	10,0	5,0
TFA	42,1	33,4	34,7	30,7	29,4	31,8	35,4	20,9	34,5	36,1	32,7	37,1	2,4	3,9	30,5	33,0	4,1

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Tabela 4.18. Sadržaj masnih kiselina u namenskim mastima proizvođača A u 2009. godini (n = 3; RSD = 0,36–6,92 %)

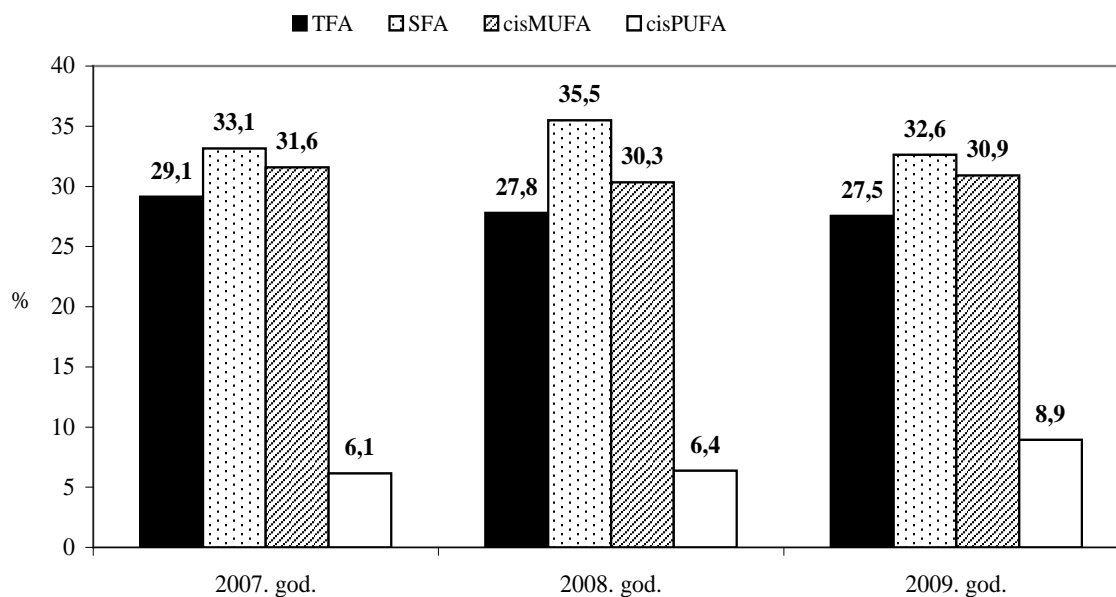
Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
8:0					0,4									1,3			
10:0					0,4									1,2			
12:0		0,1	0,4	1,3	4,2	0,8	0,6		0,3	0,1	0,3	0,4		13,1	0,3	0,7	
14:0		0,2	0,3	0,7	1,9	0,3	0,4		0,4	0,2	0,2	0,2	1,7	6,2	0,3	0,4	
16:0	12,4	14,4	13,1	14,1	15,7	12,4	17,7	8,6	14,9	14,9	14,2	12,3	42,2	28,3	16,5	13,8	15,3
18:0	8,9	11,3	11,9	15,1	16,1	19,9	12,1	7,8	13,1	14,3	13,9	12,7	6,6	9,3	14,0	11,8	11,5
18:1t	25,5	27,1	29,2	31,7	28,5	30,7	26,9	16,6	21,6	33,6	27,8	26,0	3,4	4,9	24,9	24,1	35,8
18:1c	31,9	28,1	29,3	25,1	21,8	29,1	27,9	37,6	33,1	34,6	33,6	32,4	33,1	25,3	32,4	35,2	33,0
18:2t	1,3	7,2	4,4	3,0	3,4	1,9	4,0	4,3	4,3		1,3	6,2			3,5	3,5	1,5
18:2c	19,1	9,1	9,6	7,6	5,9	3,4	8,8	21,1	10,2	1,1	7,4	7,6	13,0	9,8	6,9	8,9	2,4
20:0	0,9	1,0	1,1	0,7	0,8	0,7	1,0	0,9	1,2	0,6	0,7	0,8		0,6	0,7	0,8	0,5
20:1		0,6			0,4							0,8					
22:0		0,5	0,7	0,7	0,5	0,8	0,6	3,1	0,9	0,6	0,6	0,6			0,5	0,8	
24:0		0,4															
SFA	22,2	27,9	27,5	32,6	40,0	34,9	32,4	20,4	30,8	30,7	29,9	27,0	50,5	60,0	32,3	28,3	27,3
MUFA	57,4	55,8	58,5	56,8	50,7	59,8	54,8	54,2	54,7	68,2	61,4	59,2	36,5	30,2	57,3	59,3	68,8
PUFA	20,4	16,3	14,0	10,6	9,3	5,3	12,8	25,4	14,5	1,1	8,7	13,8	13,0	9,8	10,4	12,4	3,9
TFA	26,8	34,3	33,6	34,7	31,9	32,6	30,9	20,9	25,9	33,6	29,1	32,2	3,4	4,9	28,4	27,6	37,3

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

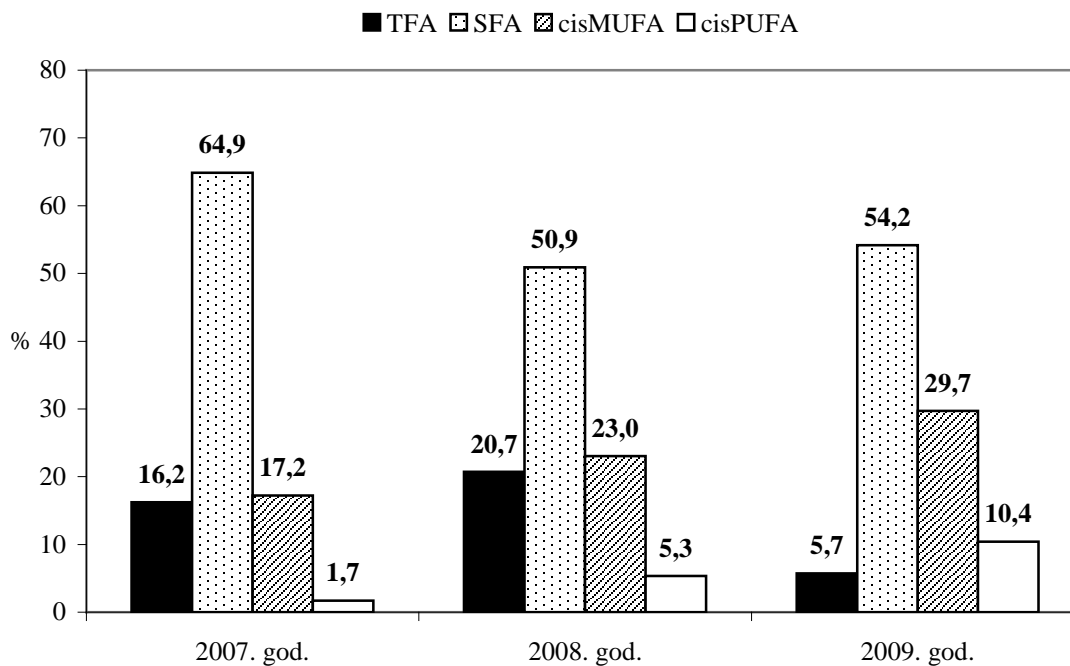
Tabela 4.19. Sadržaj masnih kiselina u namenskim mastima različitih proizvođača u 2007–2009. godini (n = 3; RSD = 0,27–7,12 %)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
6:0											0,7		0,5	0,6		0,1									
8:0	3,4	20,4				22,0					11,7		9,9	10,5		2,3		0,1			0,5	0,1			
10:0	2,4	10,0				10,9					7,7		7,0	7,3		2,2		0,1			0,4	0,1			
12:0	26,8	48,3		6,5	1,1	41,3		1,8		0,3	0,8	43,7	0,3	42,1	43,3		19,5	0,5	1,7	0,3	3,3	0,5	0,4	0,5	
14:0	7,4	11,6		1,6	0,5	8,2		0,7		0,2	0,4	16,4	1,5	15,8	16,9		10,3	1,8	2,1	1,9	3,0	2,5	2,0	1,9	
16:0	30,9	4,4	14,2	19,5	19,5	4,8	15,5	12,5	13,7	11,8	12,1	8,6	43,1	9,8	9,2	18,6	24,2	42,6	39,0	40,4	42,2	48,8	41,4	35,1	
16:1												0,2					0,1	0,2		0,3		0,4	0,2	0,2	
17:0												0,2					0,1	0,2		0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	
18:0	3,0	3,8	8,0	9,8	8,8	1,8	10,8	9,5	13,7	9,9	8,8	3,3	5,7	12,3	3,3	13,7	5,2	6,3	7,3	7,2	6,7	8,3	12,7	8,2	
18:1t				48,1	32,3	30,7	3,1	45,4	29,5	44,8	31,8	27,0		0,3		31,5	0,8				2,8	0,6	17,1	13,7	
18:1c	21,0	1,5	29,1	22,3	31,6	4,9	24,6	36,6	25,1	34,7	36,5	6,2	36,6	1,6	7,0	30,1	23,8	33,3	33,9	33,3	27,9	25,6	21,6	29,3	
18:2t			0,6		1,1			2,2	0,7	2,7	3,3		0,3			2,4	0,5	0,3		0,1	0,4	1,4	1,1	2,7	
18:2c	5,1			8,0	6,7	3,0	3,7	6,2	0,9	7,6	10,1	1,6	11,1	0,5	1,8	3,3	10,0	13,8	14,0	14,6	11,8	9,7	2,0	5,5	
20:0								0,5	0,6	0,5	0,5	0,1	0,5	0,2	0,1	0,4	0,5	0,6	0,9	0,9	0,6	0,9	0,8	0,9	
20:1													0,2				0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2	
18:3													0,2				0,1	0,2	0,4	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	
22:0								0,5	0,5	0,5	0,5		0,1				0,1		0,2	0,1		0,1	1,3		
24:0																						0,2		0,2	
SFA	73,9	98,5	22,2	37,4	29,9	89,0	26,3	25,5	28,5	23,2	23,1	92,2	51,4	97,6	91,2	32,7	64,5	52,0	51,4	51,0	56,9	61,9	57,6	48,3	
MUFA	21,0	1,5	77,2	54,6	62,3	8,0	70,0	66,1	69,9	66,5	63,5	6,2	37,0	1,9	7,0	61,6	24,9	33,7	34,2	33,9	30,8	26,8	39,2	43,4	
PUFA	5,1		0,6	8,0	7,8	3,0	3,7	8,4	1,6	10,3	13,4	1,6	11,6	0,5	1,8	5,7	10,6	14,3	14,4	15,1	12,3	11,3	3,2	8,3	
TFA			48,7	32,3	31,8	3,1	45,4	31,7	45,5	34,5	30,3		0,3	0,3		33,9	1,3	0,3		0,1	3,2	2,0	18,2	16,4	

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–trans masne kiseline



Slika 4.8. Prosečan sadržaj *trans* (TFA), zasićenih (SFA), *cis*-mononezasićenih (*cis*MUFA) i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina (*cis*PUFA) u namenskim mastima proizvođača A u 2007., 2008. i 2009. godini



Slika 4.9. Prosečan sadržaj *trans* (TFA), zasićenih (SFA), *cis*-mononezasićenih (*cis*MUFA) i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina (*cis*PUFA) u namenskim mastima različitih proizvođača u 2007., 2008. i 2009. godini

Sadržaj masnih kiselina, izražen u odnosu na ukupne masne kiseline, u ispitivanim uzorcima masnih punjenja prikazan je u tabeli 4.20. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standardna devijacija se kretala u opsegu 0,11–8,23%.

Tabela 4.20. Sadržaj masnih kiselina u masnim punjenjima (n = 3; RSD = 0,11–8,23%.)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka					
	1	2	3	4	5	6
12:0	0,4	1,1			1,0	1,1
14:0	0,3	1,0			1,9	2,1
16:0	15,7	14,9	23,2	12,7	42,6	45,0
16:1					0,4	
17:0	0,1					
18:0	14,3	7,0	5,0	4,5	5,2	5,1
18:1t	29,9	23,8	6,8	1,5	1,2	0,5
18:1c	36,3	43,4	50,5	54,3	38,5	37,6
18:2t		1,3				
18:2c	1,8	7,0	12,6	19,8	8,6	8,3
20:0	0,6	0,3			0,3	0,3
18:3	0,2	0,2	1,9	7,2	0,3	
22:0	0,4					
SFA	31,8	24,3	28,2	17,2	51,0	53,6
MUFA	66,2	67,2	57,3	55,8	40,1	38,1
PUFA	2,0	8,5	14,5	27,0	8,9	8,3
TFA	29,9	25,1	6,8	1,5	1,2	0,5
Sadržaj masti (g/100 g)	32,5	33,1	35,6	33,6	34,2	34,5
SFA (g/100 g proizv.)	10,3	8,0	10,0	5,8	17,5	18,5
MUFA (g/100 g proizv.)	21,5	22,2	20,4	18,7	13,7	13,1
PUFA (g/100 g proizv.)	0,6	2,8	5,1	9,1	3,0	2,8
TFA (g/100 g proizv.)	9,7	8,3	2,4	0,5	0,4	0,2

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Sadržaj *trans* masnih kiselina se kretao u intervalu od 0,5 do 29,9%, a prosečna vrednost je iznosila 10,8%. Uzorci označeni brojem 1 i 2 su imali veći sadržaj *trans* masnih kiselina, 29,9 i 25,1%, redom, uzorak broj 3 6,8%, dok su u uzorcima 4, 5 i 6 bile prisutne male količine *trans* izomera (0,5–1,5%).

Sadržaj zasićenih masnih kiselina se kretao u opsegu od 17,2% do 53,7%, u proseku 34,4%. U grupi zasićenih masnih kiselina preovladala je palmitinska, sa prosečnim sadržajem od 25,7%, za kojom je sledila stearinska, čiji je prosečan sadržaj iznosio 6,9%.

Sadržaj *cis* nezasićenih masnih kiselina se kretao u intervalu 38,4–81,3%, prosek 54,8%. U grupi *cis*-mononezasićenih masnih kiselina bila je najzastupljenija oleinska, sa

prosečnim sadržajem od 43,5%, dok je u grupi *cis*-polinezasićenih masnih kiselina dominirala linolna sa prosečnim sadržajem 9,7%.

Ukupan sadržaj aterogenih masnih kiselina kretao se u opsegu od 14,3% do 48,7%, prosečna vrednost je iznosila 38,0%. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je uzorak označen brojem 4 sa nutritivne tačke gledišta najkvalitetniji. Pored toga što je udeo aterogenih masti u ovom uzorku bio najniži (14,3%), utvrđeno je prisustvo i esencijalne linolenske kiseline u većoj količini (7,2%).

Sadržaj masnih kiselina, izražen u odnosu na ukupne masne kiseline, u ispitivanim uzorcima mlečnih proizvoda prikazan je u tabeli 4.21. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standarna devijacija se kretala u opsegu 0,03–9,18 %.

Sadržaj ukupnih *trans* masnih kiselina u ispitivanim uzorcima mlečnih proizvoda kretao se u opsegu od 0,0% do 3,2%, u odnosu na ukupne masne kiseline. U analiziranim uzorcima detektovano je prisustvo samo *trans* izomera masne kiseline C18:1. Sadržaj *trans* masnih kiselina u mlečnim proizvodima sa našeg tržišta je značajno niži u odnosu na sadržaj TFA u zemljama Evrope (Aro *et al.*, 1998a) i Kanadi (Mendis *et al.*, 2008) u kojima se kreće u intervalu od 3,2–6,2% i 4,2–7,4%, redom, dok je nešto viši u odnosu na Turske proizvode (Seckin *et al.*, 2005).

Sadržaj zasićenih masnih kiselina u mlečnim proizvodima se kretao u opsegu od 70,2% do 89,7%, prosečna vrednost je iznosila 77,5%. Od zasićenih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima najzastupljenije su bile palmitinska (14,3–35,1%) i miristinska kiselina (13,9–18,2%) koje se, zajedno sa laurinskom i *trans* masnim kiselinama, svrstavaju u grupu aterogenih masnih kiselina. Prosečni udeo sa zdravstvenog aspekta neutralne, stearinske kiseline iznosio je 8,8%. Sadržaj ukupnih zasićenih masnih kiselina u mlečnim proizvodima u zemljama Evrope i Kanadi (Aro *et al.*, 1998a; Mendis *et al.*, 2008) ne prelazi 70%, te se može zaključiti da je sadržaj SFA u domaćim mlečnim proizvodima nešto viši. U cilju smanjenja unosa, sa zdravstvenog aspekta nepoželjnih zasićenih masnih kiselina, trebalo bi konzumirati mlečne proizvode sa manjim sadržajem masti.

Sadržaj, sa zdravstvenog aspekta poželjnih, *cis*- nezasićenih masnih kiselina se kretao u opsegu od 10,3% do 26,6%, pri čemu je prosečan sadržaj *cis*-mononezasićenih masnih kiselina iznosio 18,6%, a *cis*-polinezasićenih masnih kiselina 2,3%. U grupi *cis*-mononezasićenih masnih kiselina dominirala je oleinska kiselina (8,2–20,6%), što je u skladu sa literaturnim podacima (Mendis *et al.*, 2008; Seckin *et al.*, 2005; Mozaffarian *et al.*, 2006).

Dominantna *cis*-polinezasićena masna kiselina bila je esencijalna linolna (C18:2) sa udelom od 1,2% do 3,3%. Poznato je da se ona ne sintetiše u ljudskom organizmu. Mlečni proizvodi predstavljaju značajan izvor linolne kiseline i njenih izomera koji imaju potencijalnu

ulogu u smanjenju rizika nastajanja karcinoma i srčanih oboljenja, povećanju imunološke funkcije organizma i u regulaciji telesne težine, odnosno raspoređivanju masnih naslaga. Prisustvo, takođe esencijalne linolenske kiseline (18:3n3), utvrđeno je u samo dva uzorka i to u količini od 0,8% i 1,3%.

Tabela 4.21. Sadržaj masnih kiselina u mlečnim proizvodima (n = 3; RSD = 0,03–9,18%)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4:0	2,7	4,4	4,5	4,1	2,7	1,2	2,3	2,5	2,2
6:0	2,2	3,3	3,9	3,3	2,9	1,3	2,4	2,1	2,3
8:0	1,6	2,2	2,6	2,2	2,1	5,4	4,7	6,0	1,6
10:0	3,9	5,2	5,7	5,3	5,4	5,3	7,4	6,2	4,1
12:0	4,7	6,0	5,2	5,6	6,1	40,1	9,1	6,1	4,6
14:0	14,0	17,0	15,4	16,4	18,2	15,7	13,8	14,2	13,8
14:1	1,5	1,5	1,1	1,4	1,4	0,2	2,4	1,7	1,1
15:0	2,1	1,8	1,4	1,6	1,7	0,3	2,0	1,5	1,8
16:0	27,1	29,4	30,4	29,3	35,1	14,3	26,1	25,3	28,6
16:1	2,2	1,9	1,6	1,9	1,8	0,3	1,8	2,0	2,0
17:0	1,0	0,7	0,6	0,6	0,6	0,1		0,8	0,8
18:0	11,6	9,5	9,0	9,2	7,1	6,0	7,5	8,8	10,3
18:1t	2,2	1,0	1,1	1,1	0,5		2,2	2,7	3,2
18:1c	18,8	14,1	15,7	16,0	13,2	8,2	15,8	17,6	20,6
18:2	3,3	2,0	1,8	2,0	1,2	1,6	2,5	2,5	1,7
20:0	0,3								
18:3	0,8								1,3
SFA	71,2	79,5	78,7	77,6	81,9	89,7	75,3	73,5	70,1
MUFA	24,7	18,5	19,5	20,4	16,9	8,7	22,2	24,0	26,9
PUFA	4,1	2,0	1,8	2,0	1,2	1,6	2,5	2,5	3,0
TFA	2,2	1,0	1,1	1,1	0,5		2,2	2,7	3,2
Sadržaj masti (g/100 g)	56,0	44,3	30,6	17,5	24,3	29,6	83,8	24,1	82,6
SFA (g/100 g proizv.)	39,9	35,2	24,1	13,6	19,9	26,5	63,2	17,7	58,0
MUFA (g/100 g proizv.)	13,8	8,2	6,0	3,6	4,1	2,6	18,6	5,8	22,2
PUFA (g/100 g proizv.)	2,3	0,9	0,6	0,4	0,3	0,5	2,1	0,6	2,5
TFA (g/100 g proizv.)	1,3	0,4	0,3	0,2	0,1		1,8	0,7	2,6

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Kao što se iz tabele 4.21. može videti, sastav masnih kiselina u ispitivanim mlečnim proizvodima je bio veoma sličan. Dominantne masne kiseline u ispitivanim uzorcima mlečnih proizvoda bile su palmitinska, oleinska i miristinska, sa prosečnim sadržajima od 27,3%; 15,6% i 15,4%, redom. Izuzetak je bio uzorak broj 6 u kom je sadržaj laurinske kiseline bio čak 40,1%, dok je sadržaj palmitinske i oleinske kiseline bio dvostruko manji u odnosu na ostale uzorke. U ovom uzorku nije utvrđeno prisustvo *trans* izomera. Masnokiselinski sastav uzorka broj 6 ukazuje da su u procesu proizvodnje korišćene modifikovane masti.

Rezultati ovih istraživanja pokazuju da mlečni proizvodi sadrže značajne količine aterogenih zasićenih masnih kiselina. Sadržaj *trans* masti u ovoj grupi proizvoda je bio veoma nizak, tako da bi do negativnog uticaja na zdravlje došlo tek ako bi se mlečni proizvodi konzumirali u sedam puta većim količinama od uobičajenih (Motard-Bélanger *et al.*, 2008; Destailats *et al.*, 2008). Procenjeno je da se putem mleka, mlečnih proizvoda i mesa u Evropi prosečano unese ispod 2 g/danu *trans* masti (Craig-Schmidt, 2006), što je oko 0,8% dnevno potrebne energije, te odgovara preporuci Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2003).

Sadržaj masnih kiselina, izražen u odnosu na ukupne masne kiseline, u ispitivanim uzorcima slanog trajnog peciva prikazan je u tabeli 4.22. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standarna devijacija se kretala u opsegu 0,2–10,9 %.

U 13 od 20 ispitivanih uzoraka određeno je prisustvo *trans* masnih kiselina u količini od 0,3% do 37,2%, dok je prosečan sadržaj TFA u svim ispitivanim uzorcima iznosio 10,9 %. Najzastupljeniji su bili *trans* izomeri masne kiseline C18:1, dok su manje količine *trans* izomera linolne kiseline (0,2% do 2,7%) bile prisutne u 8 uzoraka. U devet od 20 ispitivanih uzoraka sadržaj *trans* masnih kiselina je bio niži od 2%, što zadovoljava dansku zakonsku regulativu (www.tfx.org.uk/page116.html). Uzimajući u obzir prosečan sadržaju TFA, slana trajna peciva sa našeg tržišta su veoma slična ovoj vrsti proizvoda u Argentini, kod kojih je prosečan sadržaj *trans* izomera 11,1% (Tavella *et al.*, 2000).

Sadržaj zasićenih masnih kiselina se kretao u intervalu od 21,2% do 74,0%, a prosečna vrednost je iznosila 45,9%. Najzastupljenija zasićena masna kiselina je bila palmitinska, sa prosečnim sadržajem od 26,9% (opseg 10,1–49,9%), što ukazuje da se za proizvodnju slanog trajnog peciva u najvećoj meri koriste namenske masti sa palminim uljem kao osnovom.

Sadržaj *cis*-nezasićenih masnih kiselina se kretao od 15,2% do 72,0%. Među *cis*-nezasićenim masnim kiselinama najzastupljenija je bila oleinska kiselina sa prosečnim sadržajem od 29,6% (opseg 12,8–40,4%), a zatim je sledila linolna kiselina sa prosečnim sadržajem od 13,4%. Prisustvo manjih količina (0,2–1,1%) esencijalne linolenske kiseline je utvrđeno u šest uzoraka.

Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim uzorcima čajnog peciva proizvedenih 2007., 2008. i 2009. godine prikazan je u tabelama 4.23., 4.24. i 4.25. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standarna devijacija se kretala u intervalu 0,24–11,72%.

Na slici 4.10. dat je uporedni prikaz prosečnih sadržaja *trans*, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u čajnom pecivu u toku 2007., 2008. i 2009. godine.

Tabela 4.22. Sadržaj masnih kiselina u slanom trajnom pecivu (n = 3; RSD = 0,2–10,9%)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
6:0							0,3										0,3			
8:0							8,1	6,0	7,3			1,7	3,2			3,2	5,0			
10:0							5,5	4,4	4,5			1,2	1,5			2,1	3,7			
12:0	0,5	0,1	1,3	0,4	0,2	0,5	1,3	31,0	24,1	25,5	0,3	8,7	12,0			14,1	21,3	0,7	1,3	1,2
14:0	1,1	0,3	1,5	0,9	0,8	1,3	9,5	10,3	8,8	0,2	0,2	2,9	3,7			5,3	8,9	1,4	2,0	2,5
16:0	31,3	16,4	35,0	28,8	28,7	35,3	17,7	10,1	23,6	24,5	14,5	17,0	19,4	20,3	18,9	31,7	25,7	42,8	47,0	49,9
18:0	6,0	5,7	6,1	4,2	4,4	5,5	8,6	4,2	3,3	3,4	8,6	3,1	7,4	5,6	8,8	4,1	4,6	4,9	4,8	4,2
18:1t	10,1	34,5	13,1			7,8	31,3	15,7			34,0	6,8	18,4	12,5	23,1		0,1			
18:1c	36,3	31,7	33,7	34,6	35,0	36,9	29,8	12,8	20,3	19,5	34,7	40,4	29,5	25,0	29,2	25,6	21,6	33,3	30,0	31,3
18:2t	1,4	2,7					0,9	0,4			2,4	1,1	1,3			0,2				
18:2c	13,0	8,0	9,3	28,0	28,4	12,3	10,4	2,4	8,0	6,5	4,2	31,6	8,9	14,9	20,0	13,2	8,0	16,6	13,5	10,6
20:0	0,3	0,2		0,4	0,5	0,4					0,5		0,4			0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
20:1				0,4	0,5												0,1			
18:3			0,4								0,6	1,1	0,4			0,4	0,2			0,4
22:0				0,8	0,8															
24:0				0,4	0,4															
SFA	39,2	22,7	43,9	35,9	35,8	43,0	27,6	68,7	71,7	74,0	24,7	21,2	42,1	46,3	27,7	60,8	69,8	50,1	55,4	58,1
MUFA	46,4	66,2	46,8	35,0	35,5	44,7	61,1	28,5	20,3	19,5	68,7	47,2	47,9	37,5	52,3	25,6	21,8	33,3	30,7	31,3
PUFA	14,4	11,1	9,3	29,1	28,7	12,3	11,3	2,8	8,0	6,5	6,6	31,6	10,0	16,2	20,0	13,6	8,4	16,6	13,9	10,6
TFA	11,5	37,2	13,1			7,8	32,2	16,1			36,4	6,8	19,5	13,8	23,1		0,3			0,7
Sadržaj masti (g/100 g)	28,0	7,8	25,2	15,0	16,0	14,0	8,5	20,8	21,2	19,9	8,5	19,0	20,0	25,0	18,0	7,0	22,1	7,0	7,1	22,4
SFA (g/100 g proizv.)	11,0	1,8	11,1	5,4	5,7	6,0	2,3	14,3	15,2	14,7	2,1	4,0	8,4	11,6	5,0	4,3	15,5	3,5	3,9	13,0
MUFA (g/100 g proizv.)	13,0	5,2	11,8	5,3	5,7	6,3	5,2	5,9	4,3	3,9	5,8	9,0	9,6	9,4	9,4	1,8	4,8	2,3	2,2	7,0
PUFA (g/100 g proizv.)	4,0	0,9	2,3	4,4	4,6	1,7	1,0	0,6	1,7	1,3	0,6	6,0	2,0	4,1	3,6	1,0	1,9	1,2	1,0	2,4
TFA (g/100 g proizv.)	3,2	2,9	3,3			1,1	2,7	3,3			3,1	1,3	3,9	3,5	4,2		0,1			

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Tabela 4.23. Sadržaj masnih kiselina u čajnom pecivu u 2007. godini (n = 3; RSD = 0,24–10,15%.)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8:0	3,8							2,7		2,0
10:0	2,7							5,1		3,6
12:0	29,3	1,8						5,3		3,4
14:0	6,6	0,6						9,1		6,5
15:0								1,7		
16:0	28,7	13,1	14,6	14,5	17,2	13,0	11,6	22,3	12,9	18,2
16:1								0,8		1,1
18:0	2,6	5,5	6,9	6,6	15,5	5,1	6,9	6,9	9,6	7,2
18:1t		24,8	41,9	39,5	25,9	35,1	20,1	14,6	37,5	4,4
18:1c	20,6	48,7	31,4	31,9	35,8	35,0	49,9	25,0	31,5	42,6
18:2t			0,6	0,5	0,5	1,8	1,0		2,3	
18:2c	5,7	5,5	4,6	7,0	4,7	9,2	10,5	6,5	5,4	11,0
20:0					0,4	0,4			0,4	
18:3						0,4			0,1	
22:0									0,3	
SFA	73,7	21,0	21,5	21,1	33,1	18,5	18,5	53,1	23,2	40,9
MUFA	20,6	73,5	73,3	71,4	61,7	70,1	70,0	40,4	69,0	48,1
PUFA	5,7	5,5	5,2	7,5	5,2	11,4	11,5	6,5	7,8	11,0
TFA		24,8	42,5	40,0	26,4	36,9	21,1	14,6	39,8	4,4
Sadržaj masti (g/100g)	22,0	23,0	21,3	20,0	20,1	20,3	23,9	12,0	17,6	15,3
SFA (g/100 g proizv.)	16,2	4,8	4,6	4,2	6,7	3,7	4,4	6,4	4,1	6,3
MUFA (g/100 g proizv.)	4,5	16,9	15,6	14,3	12,4	14,2	16,7	4,8	12,1	7,4
PUFA (g/100 g proizv.)	1,3	1,3	1,1	1,5	1,0	2,3	2,7	0,8	1,4	1,7
TFA (g/100 g proizv.)		5,7	9,1	8,0	5,3	7,5	5,0	1,8	7,0	0,7

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Na osnovu dobijenih rezultata (Tabele 4.23., 4.24. i 4.25.) može se videti da se po sastavu masnih kiselina čajna peciva proizvedena u 2007. godini razlikuju u odnosu na ona proizvedena 2008. i 2009. godine, pri čemu su sastavi proizvoda iz 2008. i 2009. godine bili veoma slični. U čajnom pecivu iz 2007. godine najzastupljenije masne kiseline su bile oleinska, elaidinska i palmitinska, sa prosečnim udelom 35,2%; 27,1% i 16,6%, redom. U 2008. i 2009. godini u čajnom pecivu preovlađivale su oleinska i palmitinska kiselina. Prosečne vrednosti sadržaja oleinske i palmitinske kiseline u 2008. godine su iznosile 34,3% i 29,9%, a u 2009. godini 26,1% i 30,4%.

Sadržaj *trans* masnih kiselina u 2007. godini se kretao u opsegu 0,0–42,5%, a prosečna vrednost je iznosila 25,1% u odnosu na ukupne masti, dok je u 2008. i 2009. godini bilo znatno

smanjeno prisustvo *trans* masti u čajnom pecivu. Udeo *trans* izomera masnih kiselina u 2008. godini je iznosio 0,0–28,6%, prosečno 5,4%, a u 2009. godini 0,0–14,5%, prosečno 3,3%.

Sa slike 4.10. može se uočiti da je smanjenje udela *trans* masnih kiselina posledica porasta sadržaja ukupnih zasićenih masnih kiselina. Sadržaj zasićenih masnih kiselina sa 12, 14 i 16 ugljenikovih atoma, kretao se u intervalu 11,6–64,7% (prosek 22,9%) u 2007. godini, 11,4–53,2% (prosek 40,4%) u 2008. godini i 27,3–57,6% (prosek 42,9%) u 2009. godini. U najvećem broju uzoraka *trans* masne kiseline su zamenjene palmitinskom kiselinom, dok je u pojedinim uzorcima povećan sadržaj i laurinske kiseline.

Tabela 4.24. Sadržaj masnih kiselina u čajnom pecivu u 2008. godini (n = 3; RSD = 0,33–10,92%.)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka							
	1	2	3	4	5	6	7	8
6:0				0,7				
8:0	2,6	2,2	2,2	0,7				1,3
10:0	3,4	1,5	1,7	1,9				1,1
12:0	9,1	10,2	11,5	2,8	0,5	0,6		15,7
14:0	10,1	4,3	5,0	7,3	1,2	1,3		6,0
14:1	0,6			0,5				
15:0	0,9			0,9				
16:0	32,6	25,6	27,4	32,7	34,5	42,2	11,4	31,5
16:1	1,3		0,1	1,1				
17:0	0,6		0,1	0,6	0,2			
18:0	7,4	4,1	8,6	8,7	5,2	6,9	8,4	4,8
18:1t	1,2		7,4	4,6	0,2	0,3	27,5	
18:1c	22,4	40,5	27,6	27,0	44,5	37,6	45,0	29,6
18:2t			0,6				1,1	
18:2c	7,4	11,4	7,0	9,5	13,1	10,8	5,8	9,7
20:0		0,2	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
20:1			0,1					
18:3	0,4		0,1	0,6	0,2			
22:0			0,2				0,4	
SFA	66,7	48,1	57,1	56,7	42,0	51,3	20,6	60,7
MUFA	25,5	40,5	35,2	33,2	44,7	37,9	72,5	29,6
PUFA	7,8	11,4	7,7	10,1	13,3	10,8	6,9	9,7
TFA	1,2		8,0	4,6	0,2	0,3	28,6	
Sadržaj masti (g/100 g)	11,6	24,0	18,1	12,8	24,5	19,6	20,6	22,1
SFA (g/100 g proizv.)	7,7	11,5	10,4	7,2	10,3	10,1	4,2	13,4
MUFA (g/100 g proizv.)	3,0	9,7	6,4	4,2	10,9	7,4	14,9	6,5
PUFA (g/100 g proizv.)	0,9	2,7	1,4	1,3	3,3	2,1	1,4	2,1
TFA (g/100 g proizv.)	0,1		1,5	0,6		0,1	5,9	

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Tabela 4.25. Sadržaj masnih kiselina u čajnom pecivu u 2009. godini (n = 3; RSD = 0,27–11,72%.)

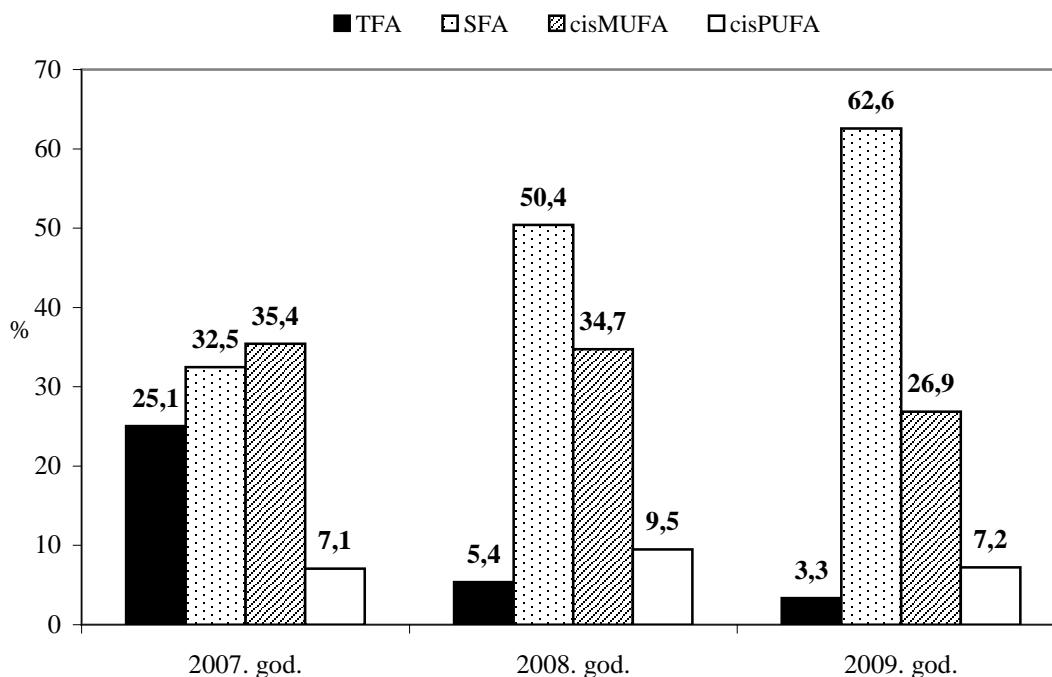
Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
4:0	2,2			5,1	6,6	7,1		1,2	0,7	1,1	1,7	1,0				
6:0	3,1			6,4	8,0	7,9	1,1	1,8	1,0	2,0	2,8	1,6	0,9			
8:0	2,7		1,0	5,0	5,5	5,5	17,4	1,6	0,9	1,8	3,4	3,5	0,8	3,4		1,2
10:0	4,8		0,5	6,7	6,9	6,0	8,4	3,1	1,6	3,2	4,6	3,5	1,5	2,0		1,1
12:0	4,7	0,7	3,5	3,6	4,1	3,6	37,2	3,2	1,8	3,1	5,7	8,9	1,9	11,7	0,5	16,8
14:0	9,4	1,4	2,1	5,9	6,9	7,0	7,2	7,2	4,3	7,1	7,2	6,8	4,4	3,9	2,1	6,6
14:1	1,1							0,8	0,4	0,6	0,7	0,5	0,3			
15:0	1,2							0,9	0,5	0,9	0,8	0,5	0,4			
16:0	20,8	34,8	41,1	21,7	26,3	16,7	10,4	30,6	32,1	33,0	31,6	25,9	44,3	31,7	50,5	34,2
16:1	1,2							1,6	1,0	1,5	0,9	0,5	0,9			
17:0	0,6							0,8	0,5	0,8		0,4	0,4			
18:0	8,1	5,0	11,0	7,1	5,5	7,5	3,9	7,2	18,6	7,4	9,2	11,8	6,8	11,8	5,5	4,8
18:1t	11,3	1,5	1,2	12,0	8,0	14,5	1,1				2,0			0,6		
18:1c	19,9	44,2	31,6	22,2	17,7	19,4	10,6	30,1	30,6	27,5	23,6	27,5	27,8	27,2	30,7	26,3
18:2t	1,3															
18:2c	6,4	11,6	7,2	4,3	4,5	4,8	2,7	8,8	5,1	8,8	5,4	6,7	8,9	6,5	10,1	9,0
20:0	0,3	0,4	0,8					0,2	0,5	0,3	0,1	0,4	0,3	0,5	0,3	
20:1	0,2	0,1										0,1		0,3		
18:3	0,7	0,3						0,9	0,4	0,9	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
SFA	57,9	42,3	60,0	61,5	69,8	61,3	85,6	57,8	62,5	60,7	67,1	64,3	61,7	65,0	58,9	64,7
MUFA	33,7	45,8	32,8	34,2	25,7	33,9	11,7	32,5	32,0	29,6	27,2	28,6	29,0	28,1	30,7	26,3
PUFA	8,4	11,9	7,2	4,3	4,5	4,8	2,7	9,7	5,5	9,7	5,7	7,1	9,3	6,9	10,4	9,0
TFA	12,6	1,5	1,2	12,0	8,0	14,5	1,1				2,0			0,6		
Sadržaj masti (g/100 g)	12,2	23,5	20,5	12,6	13,0	12,0	22,2	10,3	20,1	11,7	11,8	13,0	13,2	18,3	18,4	22,6
SFA (g/100 g proizv.)	7,1	9,9	12,3	7,8	9,1	7,3	19,0	5,9	12,6	7,1	7,9	8,4	8,1	11,9	10,8	14,6
MUFA (g/100 g proizv.)	4,1	10,8	6,7	4,3	3,3	4,1	2,6	3,3	6,4	3,5	3,2	3,7	3,8	5,1	5,7	5,9
PUFA (g/100 g proizv.)	1,0	2,8	1,5	0,5	0,6	0,6	0,6	1,0	1,1	1,1	0,7	0,9	1,2	1,3	1,9	2,0
TFA (g/100 g proizv.)	1,5	0,4	0,2	1,5	1,0	1,7	0,2				0,2			0,1		

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Takođe je uočeno da je došlo do smanjenja sadržaja masti u čajnom pecivu od 2007. do 2009. godine, samim tim i do smanjenja sadržaja *trans* masnih kiselina. U 2007. godini prosečan sadržaj masti u čajnom pecivu je iznosio 19,5%; u 2008. godini 19,2% a u 2009. godini 16%.

Od ukupno 34 analizirana uzorka čajnog peciva 18 zadovoljava dansku zakonsku regulativu u pogledu sadržaja TFA (www.tfx.org.uk/page116.html), odnosno sadrži manje od 2% *trans* masnih kiselina.

Poredeći prosečnu vrednost sadržaja TFA u čajnom pecivu sa našeg tržišta, tokom protekle dve godine, sa literaturnim podacima, utvrđeno je da naši proizvodi sadrže manje *trans* masnih kiselina u odnosu na proizvode iz Turske (1,0–30,5%) (Daglioglu *et al.*, 2000) i Brazila (12,2–31,2%) (Martin *et al.*, 2005), ali i nešto veće količine TFA u odnosu na italijanske proizvode koji su imali oko 1,7% TFA (Caponio *et al.*, 2006).



Slika 4.10. Prosečan sadržaj *trans*-, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u čajnom pecivu u 2007., 2008. i 2009. godini

Sadržaj masnih kiselina, izražen u odnosu na ukupne masne kiseline, u ispitivanim uzorcima tvrdog keksa prikazan je u tabeli 4.26. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standardna devijacija se kretala u opsegu 0,1–9,3%.

Tabela 4.26. Sadržaj masnih kiselina u tvrdom keksu (n = 3; RSD = 0,1–9,3%)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
8:0				2,4	3,1		4,2	4,6	
10:0				1,6	2,5	0,1	2,6	4,1	
12:0		0,4	1,5	12,8	25,6	1,0	20,5	46,1	2,4
14:0		1,3	1,5	5,3	9,0	2,1	5,3	12,3	2,3
16:0	15,8	41,9	42,8	32,9	20,4	46,1	32,4	15,2	52,3
16:1						0,4			0,5
17:0			0,1			0,2			0,2
18:0	8,0	6,2	8,8	4,8	13,7	5,4	4,9	5,1	7,7
18:1t	42,3	1,3	6,6	1,7	4,3			0,4	
18:1c	29,3	35,9	30,8	28,3	16,5	32,5	22,8	9,9	27,1
18:2c	4,6	12,6	7,4	10,0	4,6	11,1	6,9	2,2	7,0
20:0		0,4	0,5	0,2	0,3	0,4	0,2	0,1	0,3
20:1						0,2			
18:3						0,4	0,2		0,2
22:0						0,1			
SFA	23,8	50,2	55,2	60,0	74,6	55,4	70,1	87,5	65,2
MUFA	71,6	37,2	37,4	30,0	20,8	33,1	22,8	10,3	27,6
PUFA	4,6	12,6	7,4	10,0	4,6	11,5	7,1	2,2	7,2
TFA	42,3	1,3	6,6	1,7	4,3			0,4	
Sadržaj masti (g/100 g)	10,6	11,8	21,3	11,5	17,6	12,3	18,7	18,5	20,1
SFA (g/100 g proizv.)	2,5	5,9	11,7	6,9	13,2	6,8	13,1	16,2	13,1
MUFA (g/100 g proizv.)	7,6	4,4	8,0	3,4	3,7	4,1	4,3	1,9	5,5
PUFA (g/100 g proizv.)	0,5	1,5	1,6	1,1	0,8	1,4	1,3	0,4	1,4
TFA (g/100 g proizv.)	4,5	0,2	1,4	0,2	0,8			0,1	

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

U 6 od 9 ispitivanih uzoraka određeno je prisustvo *trans* masnih kiselina u količini od 0,4 do 42,3% u odnosu na ukupne masne kiseline, dok je prosečan sadržaj TFA u ispitivanim uzorcima iznosio 6,3 %. U šest od devet ispitivanih uzoraka sadržaj *trans* masnih kiselina je bio niži od 2%, što zadovoljava dansku zakonsku regulativu (www.tfx.org.uk/page116.html). Tvrdi keks sa našeg tržišta sadrži znatno manje količine *trans* izomera u odnosu na turske i američke proizvode koji sadrže oko 12%, odnosno 20% *trans* masnih kiselina (Daglioglu *et al.*, 2000; Satchithanandam *et al.*, 2004).

Sadržaj zasićenih masnih kiselina kretao se u intervalu od 23,8% do čak 87,5%, a prosečna vrednost je iznosila 60,2%. Najzastupljenija zasićena masna kiselina je bila palmitinska, sa prosečnim sadržajem od 33,3% (opseg 15,2–52,3%), za kojom je sledila laurinska sa prosečnim sadržajem od 13,8% (opseg 0,4–46,1%).

Sadržaj *cis*-nezasićenih masnih kiselina se kretao od 9,9% do 35,9%, prosečno 26,0%. Među *cis*-nezasićenim masnim kiselinama najzastupljenije su bile oleinska i linolna kiselina sa prosečnim sadržajima od 25,9% i 7,4%, redom. Prisustvo manjih količina (0,2–0,4%) linolenske kiseline detektovano je u tri uzorka.

Rezultati pokazuju da je smanjenje sadržaja *trans* masnih kiselina u tvrdom keksu uzrokovano povećanjem sadržaja pre svega palmitinske i laurinske kiseline. Naime, prosečan sadržaj zasićenih masnih kiselina sa 12, 14 i 16 ugljenikovih atoma je bio relativno visok, sa prosečnom vrednosti od 49,9%.

Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim uzorcima vafel proizvoda u 2007–2008. godini i 2009. godini prikazan je u tabelama 4.27. i 4.28. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standarna devijacija se kretala u opsegu 0,15–9,72%.

Tabela 4.27. Sadržaj masnih kiselina u vafel proizvodima u 2007–2008. godini (n = 3; RSD = 0,21–9,72%)

Masne kiseline (%)	Oznaka uzorka								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
8:0				3,0			2,6		4,9
10:0				2,1			2,1		2,6
12:0		0,3	0,5	13,8		0,9	19,8	0,6	17,6
14:0		0,2	0,4	5,7	0,5	1,3	8,0	1,5	4,0
16:0	13,7	13,0	17,5	31,7	21,7	46,6	26,1	41,0	31,1
18:0	7,2	6,5	8,3	5,2	8,4	8,4	11,4	8,6	6,5
18:1t	40,8	37,8	40,6	0,5	24,3	3,9	3,3	7,7	1,8
18:1c	36,4	35,8	25,5	29,0	39,1	32,2	21,0	33,6	25,4
18:2t		3,3	2,8		1,1				
18:2c	1,9	2,8	4,1	8,7	3,9	6,4	5,4	6,6	5,7
20:0		0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
20:1					0,1				
18:3					0,2				
22:0					0,3				
SFA	20,9	20,3	27,0	61,8	31,3	57,5	70,3	52,1	67,1
MUFA	77,2	73,6	66,1	29,5	63,5	36,1	24,3	41,3	27,2
PUFA	1,9	6,1	6,9	8,7	5,2	6,4	5,4	6,6	5,7
TFA	40,8	41,1	43,4	0,5	25,4	3,9	3,3	7,7	1,8
Sadržaj masti (g/100 g)	28,9	29,3	30,7	25,1	25,1	34,6	32,6	28,1	31,7
SFA (g/100 g proizv.)	6,0	6,0	8,3	15,5	7,9	19,9	22,9	14,6	21,3
MUFA (g/100 g proizv.)	22,3	21,6	20,3	7,4	16,0	12,5	7,9	11,6	8,6
PUFA (g/100 g proizv.)	0,5	1,8	2,1	2,2	1,3	2,2	1,8	1,9	1,8
TFA (g/100 g proizv.)	11,8	12,1	13,3	0,1	6,4	1,3	1,1	2,2	0,6

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

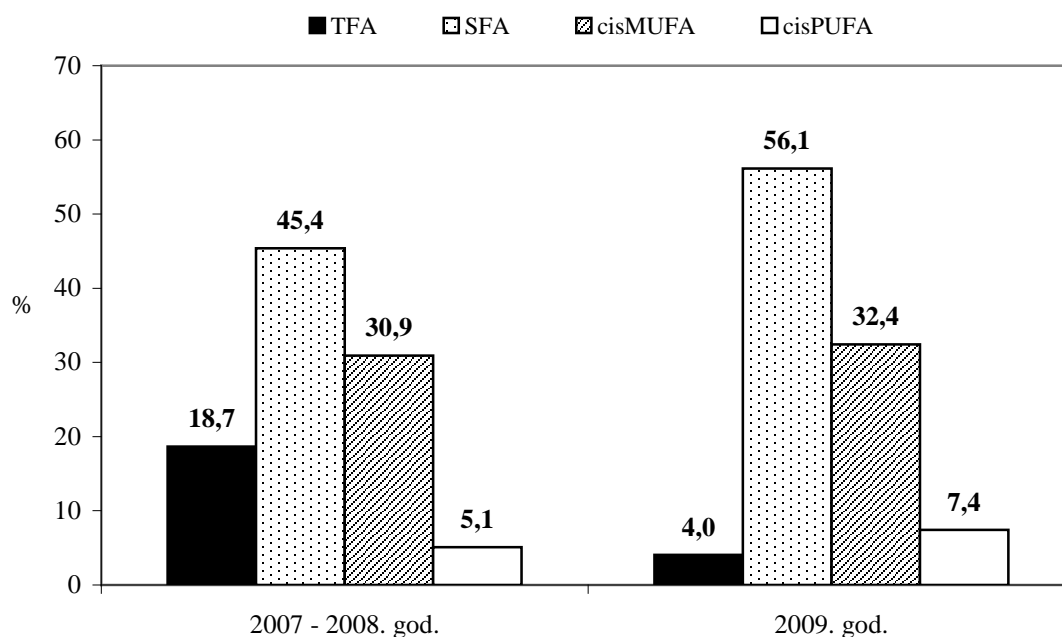
Na slici 4.11. je dat uporedni prikaz prosečnih sadržaja *trans*-, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u vafel proizvodima u 2007–2008. i 2009. godini.

Tabela 4.28. Sadržaj masnih kiselina u vafel proizvodima u 2009. godini (n = 3; RSD = 0,15–9,06%)

Masne kiseline (%)	Oznaka uzorka									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6:0			0,4							
8:0			0,7	2,5		2,1			2,3	0,4
10:0			0,8	1,5		1,3			2,3	0,4
12:0	1,1		2,2	8,5	0,4	7,2	0,4	0,5	27,8	3,6
14:0	2,1	0,1	2,1	2,9	1,7	2,6	1,5	1,5	8,5	2,9
14:1			0,1							
15:0			0,2							
16:0	43,7	15,5	25,5	28,4	48,6	30,2	48,3	45,8	22,2	54,6
16:1			0,6							
17:0			0,3							
18:0	7,3	9,3	20,5	14,4	6,3	14,0	6,1	6,1	9,9	6,4
18:1t	7,3	33,1								
18:1c	31,7	39,5	36,0	32,5	32,5	33,5	33,1	35,9	21,6	25,7
18:2c	6,4	1,9	8,3	7,8	9,9	7,8	9,9	9,5	4,6	5,7
20:0	0,4	0,6	0,8	0,6	0,3	0,6	0,4	0,4	0,4	0,3
20:1			0,6	0,3		0,3			0,2	
18:3			0,3	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	
22:0			0,4	0,1						
24:0			0,2							
SFA	54,6	25,5	54,1	58,9	57,3	58,0	56,7	54,3	73,4	68,6
MUFA	39,0	72,6	37,3	32,8	32,5	33,8	33,1	35,9	21,8	25,7
PUFA	6,4	1,9	8,6	8,3	10,2	8,2	10,2	9,8	4,8	5,7
TFA	7,3	33,1								
Sadržaj masti (g/100 g)	27,3	32,0	31,5	26,7	27,7	28,9	28,2	25,4	34,8	35,1
SFA (g/100 g proizv.)	14,9	8,1	17,0	15,7	15,9	16,7	16,0	13,8	25,6	24,1
MUFA (g/100 g proizv.)	10,6	23,2	11,7	8,8	9,0	9,8	9,3	9,1	7,6	9,0
PUFA (g/100 g proizv.)	1,7	0,6	2,7	2,2	2,8	2,4	2,9	2,5	1,7	2,0
TFA (g/100 g proizv.)	2,0	10,6								

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da se vafel proizvodi iz 2007–2008. godine razlikuju po sastavu masnih kiselina u odnosu na vafel proizvode iz 2009. godine. Dominantne masne kiseline u vafel proizvodima tokom 2007–2008. godine bile su oleinska, palmitinska i elaidinska sa prosečnim udelom od 30,9%; 26,9% i 17,9%, redom, dok su u toku 2009. godine u vafel proizvodima bile najzastupljenije palmitinska, oleinska i stearinska kiselina sa prosečnim sadržajem od 36,3%, 32,2% i 10,0%, redom.



Slika 4.11. Prosečan sadržaj *trans* (TFA), zasićenih (SFA), *cis*-mononezasićenih (*cis*MUFA) i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina (*cis*PUFA) u vafel proizvodima u 2007–2008. i 2009. godini

Sadržaj *trans* masnih kiselina u 2007–2008. godini kretao se u intervalu od 0,5% do 43,4%, a prosečna vrednost je iznosila 18,7%. U 2009. godini značajno je smanjeno prisustvo TFA u vafel proizvodima, jer je prosečan sadržaj *trans* masti iznosio 4,0%, pri čemu su TFA detektovane u samo dva uzorka. Poredeći prosečnu vrednost sadržaja TFA u vafel proizvodima sa našeg tržišta sa literaturnim podacima, utvrđeno je da su naši proizvodi slični australijskim, u kojima je prosečan sadržaj TFA oko 6,8% (McCarthy *et al.*, 2008), ali sadrže više TFA u odnosu na švajcarske proizvode (0,8%) (Richter *et al.*, 2009),

Od ukupno 19 analiziranih uzoraka vafel proizvoda 10 zadovoljava dansku zakonsku regulativu u pogledu sadržaja TFA (www.tfx.org.uk/page116.html), odnosno sadrže manje od 2% *trans* masnih kiselina.

Sadržaj zasićenih masnih kiselina u vafel proizvodima kretao se u intervalu 20,3–70,3% (prosečno 45,4%) u periodu 2007–2008. godine, odnosno 25,5–73,4% (prosečno 56,1%) u 2009. godini. Suma sadržaja aterogenih zasićenih masnih kiselina se kretala u opsegu od 22,9% do 47,9% (prosek 36%) u 2007–2008. godini, a u 2009. godini 15,6–61,15% (prosek 44,0%).

U većini vafel proizvoda je smanjenje sadržaja *trans* masti izvedno na račun povećanja sadržaja palmitinske kiseline, dok je u pojedinim uzorcima povećan i sadržaj laurinske kiseline. Sa zdravstvene tačke gledišta, najpovoljniji sastav masnih kiselina imao je uzorak broj 3 iz 2009. godine (tabela 4.28.), u kojem je suma sadržaja *trans* masnih kiselina i zasićenih masnih kiselina sa 12, 14 i 16 ugljenikovih atoma bila najniža i iznosila je 29,8%.

Sadržaj masnih kiselina u ispitivanim uzorcima čokoladnih proizvoda prikazan je u tabeli 4.29. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standardna devijacija se kretala u opsegu 0,03–11,22 %.

U 13 od 17 ispitivanih uzoraka detektovano je prisustvo *trans* masnih kiselina u količini od 1,1% do 41,8%, u odnosu na ukupne masne kiseline. Najzastupljeniji su bili *trans* izomeri masne kiseline C18:1. Sadržaj *trans* izomera linolne kiseline, koji su detektovani u 3 uzorka, kretao se u opsegu od 1,3% do 1,7%. U šest od 17 ispitivanih uzoraka sadržaj *trans* masnih kiselina je bio niži od 2%, što zadovoljava dansku zakonsku regulativu (www.tfx.org.uk/page116.html). Veoma visok sadržaj *trans* masnih kiselina je utvrđen u uzorcima broj 1, 5 i 16 (39,0%; 41,8%, i 41,7%, redom), što ukazuje da su za proizvodnju ovih proizvoda korišćene hidrogenovane biljne masti. Prosečan sadržaj TFA u čokoladnim proizvodima, izuzev tri uzorka sa veoma visokim sadržajem TFA, iznosio je 4,1%, što je niže u odnosu na čokoladne proizvode u Kanadi i Danskoj sa prosečnim sadržajem TFA od 9,2 i 8,0%, redom (Stender & Dyerberg, 2003; Innis *et al.*, 1999) a više od prosečnog sadržaja TFA u turskim čokoladnim proizvodima koji su imali oko 0,2% TFA (Karabulut, 2007).

Sadržaj zasićenih masnih kiselina u čokoladnim proizvodima se kretao u opsegu od 26,7% do čak 92,0%, a prosečna vrednost je iznosila 59,8%. Od zasićenih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima su bile najzastupljenije stearinska (4,3–36,9%) i palmitinska kiselina (10,7–54,5%). Prisustvo zasićenih masnih kiselina u veoma velikoj količini detektovano je u uzorcima broj 7, 9, 10 i 13 i to u količini od 92,0; 91,7; 77,7 i 84,1%, redom. U ovim uzorcima je bila najzastupljenija laurinska kiselina sa sadržajima od 38,5; 49,2; 24,9 i 29,2%, redom, na osnovu čega se može zaključiti da su pri njihovoj proizvodnji korišćene laurinske masti kao zamena za kakao maslac. Sadržaj zasićenih masnih kiselina u čokoladnim proizvodima je bio veoma visok, ali mora se istaći da je prosečni udeo, sa zdravstvenog aspekta neutralne, stearinske kiseline u ovoj grupi proizvoda takođe bio visok (21,3%)

Sadržaj, sa zdravstvenog aspekta poželjnih, *cis* nezasićenih masnih kiselina se kretao u opsegu od 5,0% do 43,6%, od kojih je u svim ispitivanim uzorcima bila najzastupljenija oleinska kiselina sa prosečnim sadržajem od 26,5%. Prosečan sadržaj linolne kiseline iznosio je 2,9%.

Dominantne masne kiseline u ispitivanim uzorcima čokoladnih proizvoda su bile oleinska, palmitinska i stearinska kiselina, sa prosečnim sadržajima od 26,5%, 22,9% i 20,0%, redom, sa izuzetkom uzoraka broj 7, 9, 10 i 13 u kojima je najzastupljenija laurinska kiselina.

Tabela 4.29. Sadržaj masnih kiselina u čokoladnim proizvodima (n = 3; RSD = 0,03–11,22 %)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
6:0									0,7								
8:0		0,2				2,0	4,8		3,2	5,4			9,3				
10:0	0,5	0,4	0,7	1,9		1,5	4,0		4,1	3,9	0,3	0,5	5,2				0,4
12:0	0,5	0,6	0,7	1,3		9,0	38,5	0,9	49,2	24,9	0,4	0,7	29,2	0,3	0,3	0,3	0,5
4:0	1,3	1,8	1,6	2,4		4,4	13,5	2,3	16,2	6,6	1,4	2,0	9,0	0,9	1,0	0,9	1,8
15:0		0,2								0,2	0,2	0,1					
16:0	16,7	22,3	26,4	22,1	14,6	30,5	10,7	54,5	14,7	23,3	19,7	28,3	14,2	25,8	24,2	15,7	25,9
16:1	0,2	0,4				0,2				0,3	0,3	0,4			0,3		0,5
17:0	0,2	0,3								0,2	0,2	0,4		0,3	0,4		0,6
18:0	9,0	19,7	28,3	17,9	11,6	17,8	20,2	8,5	4,3	12,1	22,1	32,7	16,6	36,9	36,5	10,6	34,6
18:1t	37,4	16,4	3,4	11,0	40,1		3,0				11,2	2,7	1,1	2,0	3,0	41,7	2,5
18:1c	30,8	33,7	28,2	39,9	30,6	27,9	4,4	28,4	6,8	18,7	40,0	28,9	13,7	30,3	30,0	29,3	29,5
18:2t	1,6	1,3			1,7												
18:2c	1,0	2,2	10,0	3,5	0,9	6,1	0,6	5,1	1,5	3,3	3,4	2,4	1,1	2,1	2,8	0,7	2,6
20:0	0,6	0,3	0,7		0,5	0,6	0,3	0,3		0,4	0,6	0,8	0,6	1,1	1,3	0,5	1,1
22:0	0,2	0,2									0,2	0,1		0,3	0,2	0,3	
SFA	29,0	46,0	58,4	45,6	26,7	65,8	92,0	66,5	91,7	77,7	45,1	65,6	84,1	65,6	63,9	28,3	64,9
MUFA	68,4	50,5	31,6	50,9	70,7	28,1	7,4	28,4	6,8	19,0	51,5	32,0	14,8	32,3	33,3	71,0	32,5
PUFA	2,6	3,5	10,0	3,5	2,6	6,1	0,6	5,1	1,5	3,3	3,4	2,4	1,1	2,1	2,8	0,7	2,6
TFA	39,0	17,7	3,4	11,0	41,8		3,0				11,2	2,7	1,1	2,0	3,0	41,7	2,5
Sadržaj masti (g/100 g)	30,0	32,0	11,2	32,0	30,0	33,5	28,1	27,3	27,7	33,8	30,2	29,1	32,1	25,1	24,2	28,6	31,2
SFA (g/100 g proizv.)	8,7	14,7	6,6	14,6	8,0	22,0	25,9	18,2	25,4	26,2	13,6	19,1	27,0	16,5	15,5	8,1	20,2
MUFA (g/100 g proizv.)	20,5	16,1	3,5	16,3	21,2	9,4	2,1	7,8	1,9	6,4	15,5	9,3	4,7	8,1	8,0	20,3	10,2
PUFA (g/100 g proizv.)	0,8	1,1	1,1	1,1	0,8	2,0	0,2	1,4	0,4	1,1	1,0	0,7	0,3	0,5	0,7	0,2	0,8
TFA (g/100 g proizv.)	11,7	5,7	0,4	3,5	12,5		0,8				3,4	0,8	0,3	0,5	0,7	11,9	0,8

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Masti kao jedan od osnovnih sastojaka čokoladnih proizvoda, utiču na ukus, topivost, osećaj u ustima, konzistenciju, teksturu i ostale fizičke osobine ovih proizvoda, kao i na njihovu nutritivnu vrednost. Kakao maslac, kao prirodna masnoća, zauzima specijalno mesto u konditorskoj industriji, zbog svojih neobičnih i visoko cenjenih fizičkih karakteristika. Literaturni podaci (Ding *et al.*, 2006) ukazuju na pozitivno dejstvo čokolade sa visokim sadržajem kakao maslaca, koji je bogat flavonoidima koji imaju značajnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Međutim, iz ekonomskih razloga kakao maslac se često zamenjuje specijalnim biljnim mastima, odnosno mastima analognim kakao maslacu. Dodatak ovih masti u čokoladu je ograničen na maksimalno 5%, dok se u čokoladnim proizvodima primenjuju kao delimične ili potpune zamene za kakao maslac. Masti analogne kakao maslacu se dobijaju različitim tehnološkim postupcima iz prirodnih masti i ulja kao što su palmino ulje, kokosovo ulje, ulje semena uljane repice, ulje iz palminih koštica itd. (Hartig *et al.*, 2002). U proizvodnji čokoladnih proizvoda se takođe koriste mlečna mast i masti za masna punjenja (masti sa visokim sadržajem simetričnih triglicerida, laurinske masti, masti sa visokim sadržajem *trans* masnih kiselina i masti sa niskim sadržajem *trans* masnih kiselina).

Na osnovu masnokiselinskog sastava ispitivanih čokoladnih proizvoda, može se zaključiti da su za njihovu proizvodnju korišćene raznovrsne masti. Iako je sadržaj *trans* masnih kiselina u većini ispitivanih uzoraka bio nizak, posmatrajući ukupan sadržaj masnih kiselina koje štetno deluju na ljudsko zdravlje, *trans* i zasićenih masnih kiselina sa 12, 14 i 16 ugljenikovih atoma koja se kratala u intervalu 28,53–80,1%, može se zaključiti da su se za proizvodnju čokoladnih proizvoda koristile masti niske nutritivne vrednosti. Međutim, ne sme se zaboraviti da baš ova masna faza doprinosi formiranju karakterističnih senzornih svojstava koje potrošač očekuje, na koja je navikao i zbog kojih na kraju i konzumira ove proizvode. Pred konditorskom industrijom stoji veoma težak zadatak. Potrošačima se moraju ponuditi novi proizvodi koji će zadovoljiti tri osnovna principa prehrambene industrije: odgovarajuća funkcionalna svojstava, prihvatljiva cena i ukus identičan ili veoma sličan referentnom proizvodu.

Sadržaj masnih kiselina, izražen u odnosu na ukupne masne kiseline, u ispitivanim uzorcima karamela prikazan je u tabeli 4.30. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Relativna standarna devijacija se kretala u opsegu 0,08–7,12%.

Sadržaj *trans* masnih kiselina u karamelama se kretao u opsegu od 1,9% do 27,3% u odnosu na ukupne masne kiseline, a prosečna vrednost je iznosila 9,2%.

Sadržaj zasićenih masnih kiselina se kretao u intervalu od 50,1% do čak 82,9%, a prosečna vrednost je iznosila 66,9%. Najzastupljenija zasićena masna kiselina je bila

palmitinska, sa prosečnim sadržajem od 24,4% (opseg 17,6–38,0%), a zatim laurinska kiselina sa prosečnim sadržajem od 16,1% (opseg 2,7–31,3%).

Sadržaj *cis*-nezasićenih masnih kiselina se kretao od 14,9% do 41,8%, prosečno 23,7%. Među *cis*-mononezasićenim masnim kiselinama najzastupljenija je bila oleinska kiselina sa prosečnim sadržajem od 18,8%. Iz grupe *cis*-polinezasićenih masnih kiselina utvrđeno je prisustvo manjih količina linolne (2,1–5,7%) i linolenske kiseline (0,1–0,5%).

Tabela 4.30. Sadržaj masnih kiselina u karamelama (n = 3; RSD = 0,08–7,12%)

Masna kiselina (%)	Oznaka uzorka			
	1	2	3	4
4:0			1,1	
6:0		0,9	1,7	
8:0	1,6	3,6	3,7	0,4
10:0	3,3	4,0	5,4	0,9
12:0	3,5	27,1	31,3	2,7
14:0	7,9	12,6	13,5	4,1
14:1	1,1	0,4	0,6	
15:0	0,9	0,6	0,7	0,3
16:0	23,3	17,6	18,7	38,0
16:1	1,0	0,8	0,8	0,3
17:0	0,4	0,4	0,4	
18:0	9,1	15,9	5,6	5,8
18:1t	27,3	1,9	2,5	5,1
18:1c	18,5	9,9	11,4	35,6
18:2c	2,1	3,8	2,4	5,7
20:0		0,2	0,1	0,4
20:1				0,2
18:3		0,3	0,1	0,5
SFA	50,0	82,9	82,2	52,6
MUFA	47,9	13,0	15,3	41,2
PUFA	2,1	4,1	2,5	6,2
TFA	27,3	1,9	2,5	5,1
Sadržaj masti (g/100 g)	7,0	7,7	6,9	7,0
SFA (g/100 g proizv.)	3,5	6,4	5,6	3,7
MUFA (g/100 g proizv.)	3,3	1,0	1,1	2,9
PUFA (g/100 g proizv.)	0,1	0,3	0,2	0,4
TFA (g/100 g proizv.)	1,9	0,1	0,2	0,4

SFA–zasićene masne kiseline; MUFA–mononezasićene masne kiseline; PUFA–polinezasićene masne kiseline; TFA–*trans* masne kiseline

Sadržaj *trans*, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u svim analiziranim proizvodima izražen u odnosu na ukupne masne kiseline prikazan je u tabeli 4.31., dok je u tabeli 4.32. dat prikaz sadržaja navedenih grupa masnih kiselina izražen u gramima po 100 grama proizvoda.

Tabela 4.31. Sumaran prikaz sadržaja *trans*, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u analiziranim proizvodima

Proizvod	n	% u odnosu na ukupne masne kiseline			
		TFA	SFA	<i>cis</i> MUFA	<i>cis</i> PUFA
Ulja	9	0,2 (0,0–1,5)	33,0 (11,9–94,3)	39,5 (4,9–70,6)	27,4 (0,9–64,7)
Jestivi margarini	28	6,5 (0,0–15,8)	27,2 (16,5–46,5)	24,5 (15,9–39,6)	41,8 (19,3–54,3)
Margarini za domaćinstvo	15	19,9 (0,0–32,3)	31,6 (16,0–58,0)	26,8 (16,0–34,8)	21,8 (9,9–59,3)
Industrijski margarini	27	9,8 (0,0–38,7)	47,7 (25,2–60,9)	28,1 (19,0–41,9)	15,2 (2,8–38,9)
Namenske masti	76	24,3 (0,0–48,7)	40,0 (17,7–98,5)	28,8 (1,5–41,9)	6,9 (0,0–21,6)
Masna punjenja	6	10,8 (0,5–29,9)	34,4 (17,2–53,7)	43,5 (36,4–54,3)	11,3 (2,0–27,0)
Mlečni proizvodi	9	1,6 (0,0–3,2)	77,5 (70,2–89,7)	18,6 (8,7–23,7)	2,3 (1,2–4,1)
Slano trajno pecivo	20	10,9 (0,0–37,2)	45,9 (21,2–74,0)	29,6 (12,8–40,4)	13,5 (2,4–31,6)
Čajno pecivo	34	10,2 (0,0–42,5)	50,8 (18,5–85,6)	31,2 (10,6–49,9)	7,7 (2,7–13,3)
Tvrđi keks	9	6,3 (0,0–42,3)	60,2 (23,8–87,5)	26,0 (9,9–35,9)	7,5 (2,2–12,6)
Vafel proizvodi	19	11,0 (0,0–43,4)	51,0 (20,3–73,4)	31,7 (21,0–39,5)	6,3 (1,9–10,2)
Čokoladni proizvodi	17	10,6 (0,0–41,8)	59,8 (26,7–92,0)	26,7 (4,4–40,2)	2,9 (0,6–10,0)
Karamele	4	9,2 (1,9–27,3)	66,9 (50,1–82,9)	1,3 (0,5–2,1)	3,7 (2,1–6,2)

n–broj uzoraka; TFA–*trans* masne kiseline; SFA–zasićene masne kiseline; *cis*MUFA–*cis*-mononezasićene masne kiseline; *cis*PUFA–*cis*-polinezasićene masne kiseline

Tabela 4.32. Sadržaj *trans*, zasićenih, *cis*-mononezasićenih i *cis*-polinezasićenih masnih kiselina u analiziranim proizvodima izražen u g/100 g proizvoda

Proizvod	n	g/100 g proizvoda			
		TFA	SFA	<i>cis</i> MUFA	<i>cis</i> PUFA
Jestivi margarini	28	3,9 (0,0–12,9)	16,2 (4,1–36,6)	14,5 (4,1–23,5)	23,7 (8,5–43,3)
Margarini za domaćinstvo	15	15,8 (0,0–26,3)	25,3 (13,1–47,0)	21,3 (13,0–27,9)	17,6 (8,1–48,5)
Industrijski margarini	27	8,0 (0,0–31,7)	38,8 (20,6–50,1)	22,9 (15,4–34,2)	12,3 (2,3–31,6)
Masna punjenja	6	3,6 (0,2–9,7)	11,7 (5,8–18,5)	14,8 (11,8–18,2)	3,9 (0,6–9,1)
Mlečni proizvodi	9	0,8 (0,0–2,6)	33,1 (13,6–63,2)	8,6 (2,6–19,6)	1,1 (0,3–2,5)
Slano trajno pecivo	20	1,6 (0,0–4,2)	7,9 (1,8–15,5)	4,8 (1,8–10,2)	2,2 (0,4–6,0)
Čajno pecivo	34	1,9 (0,0–9,1)	8,7 (3,7–19,0)	5,7 (2,3–11,9)	1,4 (0,5–3,3)
Tvrđi keks	9	0,8 (0,0–4,5)	9,9 (2,5–16,2)	4,0 (1,8–6,6)	1,1 (0,4–1,6)
Vafel proizvodi	19	3,2 (0,0–13,3)	15,3 (6,0–25,6)	9,3 (6,9–12,6)	1,8 (0,5–2,9)
Čokoladni proizvodi	17	3,1 (0,0–12,5)	17,1 (6,6–27,0)	7,6 (1,2–12,8)	0,8 (0,2–2,0)
Karamele	4	0,6 (0,1–1,9)	4,8 (3,5–6,4)	0,1 (0,0–0,1)	0,3 (0,1–0,4)

n–broj uzoraka; TFA–*trans* masne kiseline; SFA–zasićene masne kiseline; *cis*MUFA–*cis*-mononezasićene masne kiseline; *cis*PUFA–*cis*-polinezasićene masne kiseline

Na osnovu dobijenih rezultata jasno se uočava da se ukupan sadržaj *trans* masnih kiselina u analiziranim uzorcima prehrambenih proizvoda, sirovina i međuproizvoda koji se koriste u pekarskoj i konditorskoj industriji, kretao se u veoma širokom intervalu, od 0,0% u svim grupama analiziranih proizvoda, izuzev karamela, do 48,7% u namenskim mastima. Velike varijacija u pogledu sadržaja *trans* masti su u skladu sa literaturnim podacima i odlikavaju trenutnu situaciju u svetu. Izveštaji iz različitih evropskih zemalja ne pokazuju

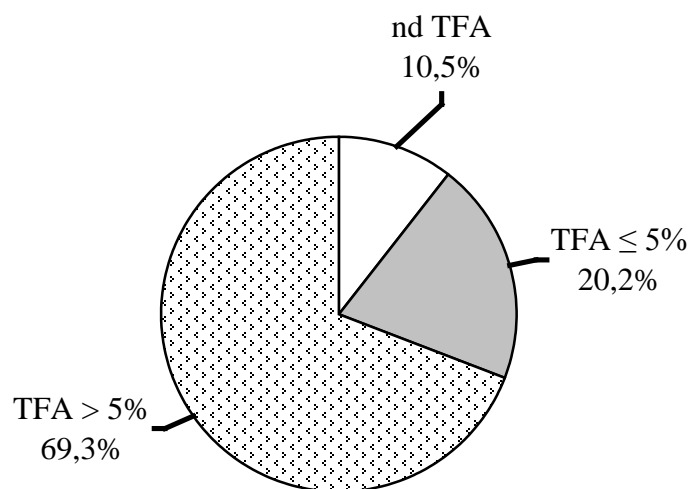
uniformnu raspodelu sadržaja TFA, nekoliko novijih studija je pokazalo da neki proizvodi i dalje sadrže veoma velike količine TFA. Na primer, u Španiji je detektovano prisustvo velikih količina *trans* izomera u prženoj i brzoj hrani (21%) (Richter, 2009), u Austriji i Australiji kokice sadrže 30% *trans* masti (Lehner, 2007; McCarthy *et al.*, 2008), u Poljskoj se sadržaj TFA u margarinima za domaćinstvo i keksu kreće u intervalu 20–25% i 25–45%, redom (Mojska *et al.*, 2006), dok češki vafel proizvodi sadrže čak 40% *trans* masnih kiselina (Dostalova *et al.*, 2007). Za neevropske zemlje je takođe karakteristično prisustvo velikih količina *trans* izomera u prehrambenim proizvodima. Tako na primer turski keks sadrži 17% TFA (Karabulut, 2007), brazilski krekeri i do 31% TFA (Martin *et al.*, 2005), neka od najčešće korišćenih ulja u Iranu sadrže između 23 i 36% TFA ((Mozaffarian i sar, 2007), a krofne u Australiji 22% TFA (Food Standards Australia New Zeland, 2007).

Sadržaj *trans* masnih kiselina varira kako u zavisnosti od vrste prehrambenih proizvoda, tako i u okviru iste vrste prehrambenih proizvoda proizvedenih od strane različitih proizvođača. Takođe je pokazano da sadržaj *trans* masti veoma varira i u proizvodima istog proizvođača koji se prodaju u različitim zemljama (Stender *et al.*, 2006). Teško je uporediti rezultate dobijene u okviru ovog rada sa drugim studijama jer se ciljevi različitih studija, a samim tim i izbor uzoraka, razlikuju. Međutim, važno je napomenuti da su industrijski proizvedene *trans* masne kiseline prisutne u hrani u našoj zemlji kao i širom sveta.

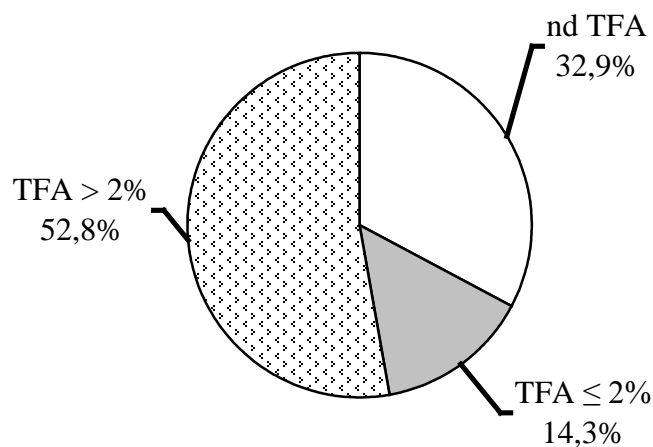
Kako u našoj zemlji još uvek ne postoji zakonska regulativa vezana za maksimalno dozvoljenu količinu *trans* masnih kiselina u prehrambenim proizvodima, dobijeni rezultati su upoređeni sa danskom zakonskom regulativom (www.tfx.org.uk/page116.html). S obzirom da se danska zakonska regulativa ne odnosi na proizvode životinjskog porekla sa prirodno većim količinama TFA (meso, mleko), nego samo na one koji sadrže industrijski proizvedene *trans* masti, mlečni proizvodi su izuzeti prilikom poređenja.

Od ukupno 124 analizirana uzorka, koja se ne koriste za direktnu upotrebu u ishrani (namenske masti, masna punjenja, industrijski i margarini za domaćinstvo) 86 uzoraka (69,3%) sadrži više od 5% *trans* masnih kiselina, 25 (20,2%) sadrži manje od 5% TFA, dok u 13 uzoraka (10,5%) nije detektovano prisustvo *trans* izomera (Slika 4.12.).

Od ukupno 140 analiziranih uzoraka, koji se koriste za direktnu upotrebu u ishrani 74 uzorka (52,8%) sadrži više od 2% *trans* masnih kiselina, 20 (14,3%) sadrži manje od 2% TFA, dok u 46 uzoraka (32,9%) nije detektovano prisustvo *trans* izomera (Slika 4.13.).



Slika 4.12. Raspodela sadržaja *trans* masnih kiselina u proizvodima koji se ne koriste za direktnu upotrebu u ishrani



Slika 4.13. Raspodela sadržaja *trans* masnih kiselina u proizvodima koji se koriste za direktnu upotrebu u ishrani

Sagledavajući dobijene rezultate može se zaključiti da je količina *trans* masnih kiselina u posmatranim uzorcima u našoj zemlji značajana. Naime, 60,6% uzoraka ne zadovoljava dansku zakonsku regulativu, odnosno sadrži više od 2% ili 5% industrijski proizvedenih *trans* masnih kiselina, dok preostalih 39,4% zadovoljava dansku zakonsku regulativu.

Imajući u vidu podatak da bolesti srca i krvnih sudova najčešće (u odnosu na druge bolesti) dovode do fatalnih ishoda (55,8%) u Srbiji (Institut za javno zdravlje Srbije, 2008), kao i činjenicu da *trans* masne kiseline negativno utiču pre svega na razvoj kardiovaskularnih bolesti, visok sadržaj TFA u namirnicama predstavlja alarmantan podatak.

Vlada Republike Srbije je donela Strategiju za prevenciju i kontrolu hroničnih nezaraznih bolesti Republike Srbije kojom su obuhvaćene i kardiovaskularne bolesti (<http://www.minzdravlja.info/downloads/Zakoni/Strategije/Strategija%20Za%20Prevenciju%20I%20Kontrolu%20Hronicnih%20Nezaraznih%20Bolesti.pdf>).

U okviru Akcionog plana Strategije za prevenciju i kontrolu nezaraznih bolesti Republike Srbije između ostalog, predviđa se i sledeće:

- unapređenje zakonske regulative u pogledu kvaliteta namirnica (vremenski okvir 2009–2014.);
- unapređenje zakonske regulative u pogledu reklamiranja industrijski proizvedene hrane koja predstavlja rizik po zdravlje (vremenski okvir 2009–2014.);
- izrada preporuka za pravilnu ishranu za različite populacione grupe (izrada: 2008–2009., promocija: 2009., primena: 2010–2015., ocena: 2016.);
- prikupljanje podataka o navikama u ishrani, stanju uhranjenosti i fizičkoj aktivnosti stanovništva Srbije (vremenski okvir: 2013., potom na pet godina);
- edukacija stanovništva o zdravstvenim koristima pravilne ishrane i fizičke aktivnosti (izrada: 2008–2009., primena: 2010–2015., ocena: 2016., potom na pet godina) i
- saradnja sa proizvođačima hrane u pogledu smanjenja soli, šećera i masnoća u industrijski proizvedenim namirnicama, gde se predviđa i unapređenje zakonske regulative u pogledu preciznijeg označavanja sastava gotovih proizvoda (deklaracija sa detaljnim informacijama o nutritivnom sastavu proizvoda) (izrada: 2008–2009., promocija 2009., primena 2009. i dalje).

Imajući u vidu činjenicu da podataka o sadržaju aterogenih masti u prehrambenim proizvodima, a samim tim ni o njihovom prosečnom unosu, u našoj zemlji još uvek nema, trebalo bi što pre započeti proces kontinualnog praćenja sadržaja masnih kiselina u prehrambenim proizvodima. Na osnovu dobijenih rezultata stekao bi se uvid o nutritivnoj

vrednosti proizvoda prisutnih na našem tržištu, kao i o prosečnom unosu aterogenih masti u našoj zemlji. U skladu sa Strategijom za prevenciju i kontrolu hroničnih nezaraznih bolesti Republike Srbije sledila bi izrada preporuka za pravilnu ishranu i edukacija stanovništva, kao i saradnja sa proizvođačima u cilju smanjenja aterogenih masti u prehrambenim proizvodima.

5. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije razvijena je GC–MS metoda koja se može primeniti u analizi sirovina, poluproizvoda i prehrambenih proizvoda u cilju definisanja sadržaja masnih kiselina, uključujući i *trans* izomere masnih kiselina. Izvedena je optimizacija uslova hromatografskog razdvajanja metilestara masnih kiselina gasnom hromatografijom na specifičnoj kapilarnoj koloni (SP-2560), uz detekciju kvadrupolnom masenom spektrometrijom SCAN tehnikom, u intervalu m/z 40–400 a.m.u, pri analizi smeša standarda sa 19 i 37 metilestara masnih kiselina.

U cilju optimizovanja uslova kvalitativne analize metilestara masnih kiselina prethodno formirana sopstvena baza podataka „FAMES“ dopunjena je masenim spektrima metilestara masnih kiselina iz upotrebljenih smeša standarda.

U cilju izvođenja kvantitativnog određivanja primenom modifikovane metode 100% definisani su relativni korekcionni faktori svedeni na palmitinsku kiselinu.

U cilju skraćanja vremena pripreme uzoraka za GC–MS analizu ispitana je mogućnost primene mikrotalasne ekstrakcije u otvorenom sistemu, umesto uobičajeno korišćene ekstrakcije po Soxhlet-u. Razvijena je metoda za pripremu uzoraka, simultana mikrotalasna ekstrakcija–esterifikacija u otvorenom sistemu. Statistički su upoređeni rezultati dobijeni primenom mikrotalasne ekstrakcije, simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije u otvorenom sistemu i ekstrakcije po Soxhlet-u, koja je korišćena kao referentna metoda. Poređene su srednje vrednosti sadržaja masnih kiselina određene GC–MS analizom pri istim, prethodno definisanim optimalnim uslovima. Ustanovljeno je da su razlike sadržaja masnih kiselina dobijenih nakon primene mikrotalasne ekstrakcije, simultane mikrotalasne ekstrakcije–esterifikacije u otvorenom sistemu i ekstrakcije po Soxhlet-u u okviru eksperimentalne greške uz 95% verovatnoću, što predstavlja potvrdu definisane metode za pripremu uzoraka. Dobro slaganje rezultata u pogledu sadržaja *trans* masnih kiselina je pokazalo da pod dejstvom mikrotalasnog zračenja ne dolazi do promena u strukturi masnih kiselina, odnosno konverzije *cis* u *trans* izomere. Takođe je ustanovljeno da se primenom simultane mikrotalasne ekstrakcije–

esterifikacije postiže ista ili veća efikasnost u odnosu na ekstrakciju po Soxhlet-u, za mnogo kraće vreme (10 min/240 min), uz upotrebu manje količine rastvarača ($5 \text{ cm}^3/150 \text{ cm}^3$), uštedu električne energije i smanjeni štetni uticaj na životnu sredinu, na osnovu čega se može zaključiti da se simultana mikrotalasna ekstrakcija–esterifikacija u otvorenom sistemu može primeniti, umesto uobičajeno korišćene ekstrakcije po Soxhlet-u, u rutinskim analizama za određivanje sastava masnih kiselina, uključujući i *trans* izomere, u prehrambenim proizvodima.

U cilju definisanja nutritivne vrednosti, odnosno funkcionalnih osobina prehrambenih proizvoda, određen je sastav masnih kiselina, sa posebnim akcentom na *trans* masne kiseline, u 273 uzoraka prikupljenih sa našeg tržišta u periodu od juna 2006. do juna 2009. godine. Uzorci su obuhvatali sledeće grupe proizvoda: ulja, namenske masti, masna punjenja, industrijske margarine, margarine za domaćinstvo, jestive margarine, mlečne proizvode i konditorske proizvode (slano trajno pecivo, čajno pecivo, tvrdi keks, vafel proizvode, čokoladne proizvode i karamele).

Dobijeni rezultati su pokazali da se ukupan sadržaj *trans* masnih kiselina u analiziranim uzorcima prehrambenih proizvoda, sirovina i međuproizvoda koji se koriste u pekarskoj i konditorskoj industriji, kretao u veoma širokom intervalu, od 0,0% u svim grupama analiziranih proizvoda, izuzev karamela, do čak 48,7% u namenskim mastima.

Prosečan sadržaj *trans* masnih kiselina iznosio je 0,2% u uljima, 6,5% u jestivim margarinima, 19,9% u margarinima za domaćinstvo, 9,8% u industrijskim margarinima, 24,3% u namenskim mastima, 10,8% u masnim punjenjima, 1,6% u mlečnim proizvodima, 10,9% u slanom trajnom pecivu, 10,2% u čajnom pecivu, 6,3% u tvrdom keksu, 11,0% u vafel proizvodima, 10,6% u čokoladnim proizvodima i 9,2% u karamelama.

Uočeno je da sa smanjenjem udela *trans* masnih kiselina u većini posmatranih uzoraka dolazi do porasta sadržaja, takođe aterogenih, ukupnih zasićenih masnih kiselina.

Kako u našoj zemlji još uvek ne postoji zakonska regulativa vezana za maksimalno dozvoljenu količinu *trans* masnih kiselina u prehrambenim proizvodima, dobijeni rezultati su upoređeni sa danskom zakonskom regulativom. S obzirom da se danska zakonska regulativa ne odnosi na proizvode životinjskog porekla sa prirodno većim količinama TFA (meso, mleko), nego samo na one koji sadrže industrijski proizvedene *trans* masti, mlečni proizvodi su izuzeti prilikom poređenja.

Od ukupno 124 analizirana uzorka, koja se ne koriste za direktnu upotrebu u ishrani (namenske masti, masna punjenja, industrijski i margarini za domaćinstvo) 86 uzoraka (69,3%) sadrži više od 5% *trans* masnih kiselina, 25 (20,2%) sadrži manje od 5% TFA, dok u 13 uzoraka (10,5%) nije detektovano prisustvo *trans* izomera.

Od ukupno 140 analiziranih uzoraka, koji se koriste za direktnu upotrebu u ishrani 74 uzorka (52,8%) sadrži više od 2% *trans* masnih kiselina, 20 (14,3%) sadrži manje od 2% TFA, dok u 46 uzoraka (32,9%) nije detektovano prisustvo *trans* izomera.

Sagledavajući dobijene rezultate može se zaključiti da je količina *trans* masnih kiselina u posmatranim uzorcima u našoj zemlji značajana. Naime, 60,6% uzoraka ne zadovoljava dansku zakonsku regulativu, odnosno sadrži više od 2% ili 5% industrijski proizvedenih *trans* masnih kiselina, dok preostalih 39,4% zadovoljava dansku zakonsku regulativu.

Imajući u vidu podatak da su bolesti srca i krvnih sudova vodeći uzrok smrtnosti u Srbiji, sa učešćem od 55,8% u svim uzrocima smrti, kao i činjenicu da *trans* masne kiseline negativno utiču pre svega na razvoj kardiovaskularnih bolesti, visok sadržaj TFA u namirnicama predstavlja alarmantan podatak.

U skladu sa Strategijom za prevenciju i kontrolu hroničnih nezaraznih bolesti Republike Srbije, a u cilju prevencije kardiovaskularnih oboljenja, trebalo bi što pre započeti proces kontinualnog praćenja sadržaja masnih kiselina u prehrambenim proizvodima, izradu preporuka za pravilnu ishranu, edukaciju stanovništva, kao i saradnju sa proizvođačima, kako bi se potrošačima ponudili proizvodi sa smanjenim sadržajem aterogenih masti, odnosno više nutritivne vrednosti.

6. Literatura

- Abu-Samra, A., Morris, J.S., Koirtiyohann, S.R. (1975): Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry* 47, 1475–1477.
- Adolf, R.O. (1995): Separation of cis and trans unsaturated fatty acid methyl esters by silver-ion high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 659, 95-99.
- Adolf, R.O., Copes, L.C., Emken, E.A. (1995): Analysis of the monoenoic fatty acid distribution in hydrogenated vegetable oils by silver-ion high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemist Society* 72, 571-574.
- Adolf, R.O., Lamm, T. (1998): Fractionation of cis- and trans-oleic, linoleic and conjugated linoleic fatty acid methyl esters by silver-ion high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 799, 329-332.
- Akoh, C.C., Min, D.B. (1998): *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York
- Alonso, L., Fraga, M.J., Juarez, M., Carmona, P. (2002): Fatty acid composition of Spanish shortening with special emphasis on trans unsaturated content as determination by Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography. *Journal of American Oil Chemist Society* 79, 1-6.
- Anwar, F., Bhangar, M.I., Iqbal, S., Sultana, B. (2006): Fatty acid composition of different margarines and butters from Pakistan with special emphasis on trans unsaturated contents. *Journal of Food Quality* 29, 87-96.
- AOAC (2000): Official Method 963.22, Methyl Esters of Fatty Acids in Oils and Fats, AOAC, Washington.
- AOAC (2001): Official methods of analysis, 18th edn., Method 2000.10., AOAC International.

- AOCS (1999): Official methods and recommended practices of the AOCS, 5th edn. AOCS, Champaign.
- Arici, M., Tasan, T., Gecgel, U., Ozsoy, S. (2002): Determination of fatty acid composition and total trans fatty acid of Turkish margarines by capillary GLC. *Journal of the American Oil Chemist Society* 79, 439 – 441 .
- Aro, A., Jauhiainen, M., Partanen, R., Salminen, I., Mutanen, M. (1997). Stearic acid, *trans* fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein (a), and lipid transfer proteins in health subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 65, 1419–1426.
- Aro, A., Antoine, J.M., Pizzoferrato, L., Reykadal, O., Van Poppel, G. (1998a): Trans fatty acids in dairy and meat products from 14 European countries: the TRANSFAIR study. *Journal of Food Composition and Analysis* 11, 150-160.
- Aro, A., van Amelsvoort, J., Becker, W., van Erp-Baart, M.A., Kafatos, A., Leth, T., van Poppel, G. (1998b): *Trans* fatty acids in dietary fats and oils from 14 European countries: The TRANSFAIR study. *Journal of Food Composition and Analysis* 11, 137-149.
- Ascherio, A. (2006): Trans fatty acids and blood lipids. *Atherosclerosis Supplements* 7, 25-27.
- Azizian, H., Kramer, J.K.G. (2005): A rapid method for the quantification of fatty acids in fats and oils with emphasis on *trans* fatty acids using fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR). *Lipids* 40, 855-867.
- Basol, B., Tasan, M. (2008): Fatty acid compositions of Turkish shortenings with emphasis on trans fatty acids. *Journal of Food Lipids* 15, 240-250.
- Batista, A., Vetter, W., Lukas, B. (2001): Use of focused open vessel microwave-assisted extraction as prelude for the determination of the fatty acid profile of fish – a comparison with results obtained after liquid-liquid extraction according to Bligh and Dyer. *European Journal of Food Research & Technology* 212, 377-384.
- Bayard, C.C., Wolff, R.L. (1995): Trans-18:1 acids in French tub margarines and shortenings: Recent trend. *Journal of the American Oil Chemist Society* 72, 1485-1489.
- Baylin, A., Siles, X., Donovan, P.A., Fernandez, X., Campos, H. (2007): Fatty acid composition of Costa Rican food including trans fatty acid content. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 182-192.
- Belitz, H.D. Grosch, W., Schieberle, P. (2009): *Food Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

- Boselli, E., Velazco, V., Caboni, M.F., Lercker, G. (2001): Pressurized liquid extraction of lipids for determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A* 917, 239-244.
- Brát, J., Pokorný, J. (2000): Fatty Acid Composition of Margarines and Cooking Fats Available on the Czech Market. *Journal of Food Composition and Analysis* 13, 337 -343 .
- Brondz, I. (2002): Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 465, 1-37.
- Caponio, F., Summo, C., Delcuratolo, D., Pasqualone, A. (2006): Quality of the lipid fraction of Italian biscuits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 356-361.
- Carvalho, A.P., Malcata, F.X. (2005): Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5049-5059.
- Christie, W.W. (1987): A stable silver-loaded column for the separation of lipids by high-performance liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* 10, 148-150.
- Christie, W.W. (1989): *Gas chromatography and lipids: a practical guide*, The Oily Press Ltd., Bridgwater, Somerset
- Claig-Schmidt, M.C. (2001): Isomeric fatty acids: evaluating status and implications for maternal and child health. *Lipids* 36, 997-1006.
- Craig-Schmidt, M.C. (2006): World-wide consumption of trans fatty acids. *Atherosclerosis Supplements* 7, 1- 4.
- Crupkin, M., Zambelli, A. (2008): Detrimental impact of trans fats on human health: stearic acid-rich fats as possible substitutes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 271-279.
- Daglioglu, O., Tasan, M., Tuncel, B. (2000): Determination of fatty acid composition and total trans fatty acids of Turkish biscuits by capillary gas-liquid chromatography. *European Journal of Food Research & Technology* 211, 41-44.
- David, F., Sandra, P., Vickers, A.K. (2005): Select the right column and find more FAMES. *Agilent Separation Times* 18, 10-11.
- David, F., Sandra, P., Wylie, P.L. (2002): Improving analysis of fatty acid methyl esters using retention time locked methods and retention time databases, Agilent Technologies Application Note 5988-5871EN, Palo Alto, CA.

- de Roos, N.M., Bots, M.L., Katan, M.B. (2001): Replacement of dietary saturated fatty acids by trans fatty acids lowers serum HDL cholesterol and impairs endothelial function in healthy men and women. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21, 1233-1237.
- Delmonte, P., Rader, J.I. (2007): Evaluation of gas chromatographic methods for the determination of *trans* fat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 77-85.
- Destailats, F., Golay, P.A., Giuffrida, F., Hug, B., Dionis, F. (2004): Direct methods for the quantification of LC-PUFA in food products. *Lipid Technology* 16, 183-185.
- Destailats, F., Malpuech-Brugère, C., Moulin, J., Bauman, D.E., Lock, A.L., Barbano, D.M., Mensink, R.P., Bezelgues, J.B., Chaumont, P., Combe, N., Cristiani, I., Joffre, F., German, J.B., Dionisi, F., Boirie, Y., Sébédio, J.L. (2008): Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subject? Results of the trans Fatty Acids collaboration (TRANSFACT) study. *American Journal of Clinical Nutrition* 87, 558-566.
- Dimić, E. (2005): Hladno cedena ulja, Tehnološki fakultet, Novi Sad
- Ding, L.D., Hutflless, S.M., Ding, X., Girorta, S. (2006): Chocolate and prevention of cardiovascular disease: A systematic review. *Nutrition & Metabolism* 3, 2-15.
- Dodds, E.D., McCoy, M.R., Rea, L.D., Kennish, J.M. (2005): Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: Flame ionization detection vs. Electron impact mass spectrometry. *Lipids* 40, 419-428.
- Dostalova, J., Dolezal, M., Brat, J., Culkova, J., (2007): Contents of trans and other groups of fatty acids in spread fats and various bakery products. 5th Euro Fed Lipid Congress, Gothenburg, Sweden.
- Doyle, E. (1997): Trans fatty acid. *Journal of Chemical Education* 74, 1030-1032.
- Dubois, V., Brenton, S., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. (2007): Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science & Technology* 109, 710-732.
- ElKhorri, S., Paré, J.R.J., Bélanger, J.M.R., Pérez, E. (2007): The microwave-assisted process (MAP^{TM1}): Extraction and determination of fat from cocoa powder and cocoa nibs. *Journal of Food Engineering* 79, 1110-1114.

- Eller, F.J. (1999): Interference by methyl levulinate in determination of total fat in low-fat, high-sugar products by gas chromatographic fatty acid methyl ester (GC-FAME) analysis. *Journal of AOAC International* 82, 766-769.
- Erkkilä, A., de Mello, V.D.F., Risérus, U., Laaksonen, D.E. (2008): Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Progress in Lipid Research* 47, 172-187.
- Flider, F.J., Orthoefer, F.T. (1981): Metals in soybean oil, *Journal of American Oil Chemist Society* 58, 270-272.
- Food Standards Australia New Zealand (2007): *Trans Fatty Acids in the New Zealand and Australian Food Supply*. Food Standards Australia New Zealand, Canberra.
- Fritzsche, J., Steinhart, H. (1998): Analysis, occurrence and physiological properties of *trans* fatty acid (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) - a Review. *Fett/Lipid* 100, 190-218.
- Ganzler, K., Salgo, A., Valko, K. (1986): Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A* 371, 299-306.
- García-Ayuso, L.E., Velasco, J., Dobarganes, M.C., Luque de Castro, M.D. (2000): Determination of oil content of seeds by focused microwave-assisted Soxhlet extraction. *Chromatographia* 52, 103-108.
- Gatto, L.M., Sullivan, D.R., Samman, S. (2003): Postprandial effects on dietary trans fatty acids on apolipoprotein(a) and cholesteryl ester transfer. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 1119-1124.
- Ghotra, B.S., Dyal, S.D., Narine, S.S. (2002): Lipid shortenings: a review. *Food Research International* 35, 1015-1048.
- Golay, P.A., Dionisi, F., Hug, B., Giuffrida, F., Destailats, F. (2006): Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acid content. *Food Chemistry* 101, 1115-1120.
- Griinari, J.M., Dwyer, D.A., McGuire, M.A., Bauman, D.E., Palmquist, D.L., Nurmela, K.V.V. (1998): Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81, 1251-1261.
- Gunstone, F. (1996): *Fatty Acid and Lipid Chemistry*, Blackie Academic and Professional, London.
- Hartig, E., Torbica, A., Muc, S. (2002): *Biljne masti analogne kakao maslacu*, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

- Hornstra, G. (1999): Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. *Fett/Lipid* 101, 456-466.
- Hornstra, G. (2000): Essential fatty acids in mothers and their neonates. *American Journal of Clinical Nutrition* 71(suppl), 1262S-1269S.
- HP59970 MS ChemStation Handbook, Hewlett Packard, 1998.
- http://lipidlibrary.aocs.org/ms/arch_me/index.htm (01.07.2009.)
- <http://www.minzdravlja.info/downloads/Zakoni/Strategije/Strategija%20Za%20Prevenciju%20i%20Kontrolu%20Hronicnih%20Nezaraznih%20Bolesti.pdf> (01.07.2009.)
- Hübschmann, H.J. (2001): Handbook of GC/MS, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Innis, S.M., Green, T.J., Halsey, T.K. (1999): Variability in the trans fatty acid content of foods within a food category: implications for estimation of dietary trans fatty acid intakes. *Journal of American College of Nutrition* 18, 255-260.
- Institut za javno zdravlje Srbije (2009): Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije 2008.
- Ip, C., Thompson, H.J. (1994): Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer* 74, 1050-1054.
- ISO 659-1988 (E), (1998): International Organization for Standardization, Case postale 56, CH-1211 Genève 20, Switzerland,.
- James, A.T., Martin, A.J.P. (1952): Gas-liquid partition chromatography: The separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal* 50, 679-690.
- Jang, E.S., Jung, M.Y., Min, D.B. (2005): Hydrogenation for low *trans* and high conjugated fatty acids, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1, 22-30.
- Juanéda, P., Ledoux, M., Sébédo, J.L. (2007): Analytical methods for determination of trans fatty acid content in food. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 901-917.
- Judd, J.T., Clevidence, B.A., Muesing, R.A., Wittes, J., Sunkin, M.E., Podczasy, J.J. (1994). Dietary *trans* fatty acids: effects of plasma lipids and lipoproteins on healthy men and women. *American Journal of Clinical Nutrition* 59, 861-868.
- Kafatos, A., Chrysafidis, D., Perake, E. (1994): Fatty acid composition of Greek margarines, consumption by population of Greek and its relationship to the adipose tissue analysis. *International Journal of Food Science and Nutrition* 45, 107-114.

- Karabult, I., Turan, S. (2006): Some properties of margarines and shortenings marketed in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 55-58.
- Karabulut, I. (2007): Fatty acid composition of frequently consumed foods in Turkey with special emphasis on trans fatty acids. *International Journal of Food Science and Nutrition* 58, 619-628.
- Khatoun, S., Reddy, S.R.Y. (2005): Plastic fats with zero *trans* fatty acids by interesterification of mango, mahua and palm oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107, 786-791.
- Kravić, S., Marjanović, N., Suturović, Z., Švarc-Gajić, J., Pucarević, M. (2006): Sastav masnih kiselina industrijskih i margarina za domaćinstvo uključujući trans izomere. *Journal of Edible Oil Industry, Uljarstvo* 37, 45-51.
- Latta, S. (1991): Gourmet oils in the 1990s, *INFORM* 2, 98-113.
- Ledoux, M., Juanéda, P., Sébédio, J.L. (2007): Trans fatty acid: Definition and occurrence in foods. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 891-900.
- Lee, K.N., Kritchevsky, D., Pariza, M.W. (1994): Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108, 19-25.
- Léger, C.L., Razanamahefa, L., Margaritis, I. (2007): Health risk and benefits of trans fatty acids including conjugated fatty acids in food-Synopsis of the AFSSA report and recommendations. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 887-890.
- Lehner, P. (2007): Entwicklung der Gehalte an Transfettsäuren in ausgewählten Produkten des Österreichischen Marktes-Folgestudie der AK-Transfett-Studie. *Arbeitskammer Wien* 1-22.
- Lepage, G., Roy, C.C. (1984): Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research* 25, 1391-1396.
- Leth, T., Bysted, A., Hansen, K.N., Ovens, L. (2003): Trans FA content in Danish margarines and shortenings. *Journal of the American Oil Chemist Society* 80, 475-478.
- Lichtenstein, A.H. (2000): Trans fatty acids and cardiovascular disease risk. *Current Opinion in Lipidology* 11, 37-42.
- Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Jalbert, S.M., Schaefer, E.J. (1999). Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. *New England Journal of Medicine* 340, 1933-1940.

- Lipsky, S.R., McMurray, W.J. (1981): Role of surface groups in affecting the chromatographic performance of certain types of fused-silica glass capillary columns. *Journal of Chromatography A* 217, 3-17.
- Mahesar, S.A., Sherazi, S.T.H., Abro, K., Kandhro, A., Bhangar, M.I., van de Voort, F.R., Sedman, J. (2008): Application of microwave heating for the fast extraction of fat content from the poultry feeds. *Talanta* 75, 1240-1244.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007): Microwave assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews* 1, 7-18.
- Marjanović, N. (2001): Instrumentalne metode analize I/1. Metode razdvajanja, Univerzitet u Banjoj Luci, Banja Luka.
- Marjanović, N.J., Jankoviš, I.F. (1983): Instrumentalne metode analize, udžbenik sa praktičnim primerima, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Zavod za izdavanje udžbenika, Novi Sad.
- Marsel, J. (1977): Advanced Course in Mass Spectrometry, Introductory Lectures, Portorož, Institut „J. Stefan“ Univerza Ljubljana.
- Martin, C.A., Carapelli, R., Visantainer, J.V., Matsushita, M., de Souza, N.E. (2005): Trans fatty acid content of Brazilian biscuits. *Food Chemistry* 93, 445-448.
- Mayamol, P.N., Samuel, T., Balachandran, C., Sundaresan, A., Arumugan, C. (2004): Zero-trans shortening using palm stearin and rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemist Society* 81, 407-413.
- McCarthy, J., Barr, D., Sinclair, A. (2008): Determination of trans fatty acid levels by FTIR in processed food in Australia. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 17, 391-396.
- McDonald, R.E., Mossoba, M.M. (1997): New techniques and applications in lipid analysis, AOCS Press, USA, Illinois.
- McLafferty, F.W. (1980): Interpretation of Mass Spectra, University Science book, Mill Valley, CA.
- Mendis, S., Cruz-Hernandez, C., Ratnayake, W.M.N. (2008): Fatty acid profile of Canadian dairy products with special attention to the trans-octadecenoic acid and conjugated linoleic acid isomers. *Journal of AOAC International* 91, 811–819.
- Mensink, R.P., Katan M.B. (1990). Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *The New England Journal of Medicine* 323, 439-445.

- Mijin, D., Petrović, S. (2005): Primena mikrotalasne tehnike u organskoj hemiji i organskoj hemijskoj tehnologiji. *Hemijska industrija* 59, 224-229.
- Milosevic, M., Milosevic, V., Kramer, J.K.G., Azizian, H., Mossoba, M.M. (2004): Determining low levels of *trans* fatty acids in foods using an improved ATR-FTIR procedure. *Lipid Technology* 16, 252-255.
- Mirković, N., (2001): Diplomski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Mitra, S. (2003): *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA
- Mjøs, S.A. (2004): Two-dimensional fatty acid retention indices. *Journal of Chromatography A* 1061, 201-209.
- Mjøs, S.A. (2005): Properties of *trans* isomers of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid methyl esters on cyanopropyl stationary phases. *Journal of Chromatography A* 1100, 185-192.
- Mjøs, S.A., Pettersen, J. (2003): Determination of *trans* double bonds in polyunsaturated fatty acid methyl esters and their electron impact mass spectra. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 156-164.
- Mojska, H., Gielecinska, I., Balas, J., Pawlicka, M., Szponar, L., (2006): *Trans* fatty acids in foods in Poland: Monitoring Study. *Zywnienie Czlowieka i Metabolizm* 33, 107–122.
- Mosley, E.E., Powell, G.L., Riley, M.B., Jenkins, T.C. (2002): Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. *Journal of Lipid Research* 43, 290-296.
- Mossoba, M.M, Kramer, J.K.G., Delmonte, P., Yurawecz, M.P., Rader, J.I. (2003): *Official Methods for determination of trans fat*. AOAC press, Champaign, Illinois.
- Mossoba, M.M., Milosevic, V., Milosevic, M., Kramer, J.K.G., Azizian, H. (2007): Determination of total *trans* fats and oils by infrared spectroscopy for regulation compliance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 87-92.
- Motard-Bélanger, A., Charest, A., Grenier, G., Paquin, P., Chouinard, Y., Lemieux, S., Couture, P., Lamarche, B. (2008): Study of the effect of *trans* fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 87, 593-599.
- Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (2006): *Trans* fatty acid and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* 354, 1601-1613.

- Müller, H., Kirkhus, B., Pedersen, J.I. (2001): Serum cholesterol predictive equations with special emphasis on trans and saturated fatty acids. An analysis from designed controlled studies. *Lipids* 36, 783-791.
- Nielsen, K. (2006): Is the quality and cost of food affected if industrially produced trans fatty acids are removed? *Atherosclerosis Supplements* 7, 61-62.
- Nikolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimesa, J.A., Huth, P.J. (1997): Dietary conjugated linoleic acid reduces plazma lipoproteins and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22, 266-277.
- Nikolova-Damyanova, B. (1992): Silver ion chromatography and lipids, in: *Advances in Lipid Methodology – One*. (ed. Christie, W.W.), The Oily Press, Ayr, Scotland., str. 181-237
- O'Brien, R.D. (2003): *Fat and oils: formulating and processing for applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Oomen, C.M., Ocké, M.C., Feskens, E.J.M., van Erp-Baart, M.J., Kok, F.J., Kromhout, D. (2001): Association between trans fatty acids intake and 10-year risk of coronary heart disease in Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study. *Lancet* 357, 746-751.
- Oštrić-Matijašević, B., Turkulov, J. (1980): Tehnologija ulja i masti, I deo, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Novi Sad.
- Ovens, L., Leth, T., Hanson, K. (1996): Fatty acid composition of Danish margarines and shortenings, with special emphasis on trans fatty acids. *Lipids* 31, 971-976.
- Ovens, L., Leth, T., Hanson, K. (1998): Fatty acid composition and contents of trans-monounsaturated fatty acids in frying fats and in margarines and shortenings in Denmark. *Journal of American Oil Chemist Society* 75, 1079-1083.
- Paré, J.R.J., Bélanger, J.M.R. (1997): *Instrumental methods in food analysis*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands
- Pérez-Serradilla, J.A., Ortiz, M.C., Sarabia, L., Luque de Castro, M.D. (2007): Focused microwave-assisted soxhlet extraction of acorn oil for determination of the fatty acid profile by GC-MS. Comparison with conventional and standard methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 451-462.
- Petrauskaite, V., De Greyt, W., Kellens, M., Huyghebaert A. (1998): Physical and Chemical Properties of *trans*-Free Fats Produced by Chemical Interesterification of Vegetable Oil Blends. *Journal of the American Oil Chemist Society* 75, 489 – 493.

- Pfeuffer, M., Schrezenmeir, J. (2006): Impact of trans fatty acids of ruminant origin compared whit those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. *International Dairy Journal* 16, 1383-1388.
- Pollard, M.R., Gunstone, F.D., James, A.T., Morris, L.J. (1980): Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids* 15, 306-314.
- Precth, D., Molкетин, J. (2000a): Identification and quantitation of cis/trans C16:1 and C17:1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *European Journal of Lipid Science and Technology* 102, 102-113.
- Precth, D., Molкетин, J. (2000b): Recent trends in the fatty acid composition of German sunflower margarines, shortenings and cooking fats with emphasis on individual C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 and C20:1 *trans* isomers. *Nahrung* 44, 222 - 228 .
- Pretorius, V., W. Bertsch, (1983): Sample introduction in capillary gas-liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* 6, 64-67.
- Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. (2005): Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: a convincing alternative for total fat isolation from bakery products. *Talanta* 65, 98-103.
- Priego-Capote, F., Ruiz-Jiménez, J., García-Olmo, J., Luque de Castro, M.D. (2004): Fast method for the determination of total fat and *trans* fatty-acids content in bakery products based on microwave-assisted Soxhlet extraction and medium infrared spectroscopy detection. *Analytica Chimica Acta* 517, 13-20.
- Priego-Capote, F., Ruiz-Jiménez, J., Luque de Castro, M.D. (2007): Identification and quantification of *trans* fatty acids in bakery products by gas chromatography-mass spectrometry after focused microwave Soxhlet extraction. *Food Chemistry* 100, 859-867.
- Rac, M. (1964): *Ulja i masti*, Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja, Beograd.
- Ratnayake, W.M.N., Hansen, S.L., Kennedy, M.P. (2006): Evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 GC columns used in the recently approved AOCS official method Ce 1h-05: Determination of cis-, trans-, saturated, monosaturated and polyunsaturated fatty acid in vegetable or non-ruminat animal oils and fats by capillary GLC method. *Journal of the American Oil Chemists Society* 83, 475-488.

- Ribarova, F., Zanev, R., Shishkov, S., Rizov, N. (2003): α -Tocopherol, fatty acids and their correlations in Bulgarian foodstuffs. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 659-667.
- Richter, E.K., Shawish, K.A., Scheeder, M.R.L., Colombani, P.C. (2009): Trans fatty acid content of selected Swiss food: The TransSwissPilot study. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 479-484.
- Robinson, J.E., Singh, R., Kays, S. (2008): Evaluation of an automated hydrolysis and extraction method for quantification of total fat, lipid classes and *trans* fat in cereal products. *Food Chemistry* 107, 1144-1150.
- Ruiz-Jiménez, J., Luque de Castro, M.D. (2004): Forward-and-back dynamic ultrasound-assisted extraction of fat from bakery products. *Analytica Chimica Acta* 502, 75-82.
- Ruiz-Jimenez, J., Priego-Capote, F., Luque de Castro M.D. (2004): Identification and quantification of *trans* fatty acids in bakery products by gas chromatography–mass spectrometry after dynamic ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 1045, 203–210.
- Ruiz-Jiménez, J., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. (2006): FT-midIR determination of fatty acid profiles, including trans fatty acids, in bakery products after focused microwave-assisted Soxhlet extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 1532-1537.
- Sandra, P. (1985): *Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography*, Huethig, Heidelberg, Germany.
- Satchithanandam, S., Oles, C.J., Spease, C.J., Brandt, M.M., Yurawecz, M.P., Rader, J.I. (2004): Trans, saturated and unsaturated fat in foods in the United states prior to mandatory trans-fat labeling. *Lipids* 39, 11-18.
- Scott, R.P.W. (2003): *Gas Chromatography*, Chrom Ed. Series Library4science, LLC (www.chromatography-online.org/GC/GC-Columns/Capillary/Dynamic-Coating/rs29.html) (01.07.2009.)
- Seckin, A.K., Gursoy, O., Kinik, O., Akbulut, N. (2005): Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy products. *LWT- Food Science and Technology* 38, 909-915.
- Sehat, N. Rickert, R., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Yurawecz, J.A., Roach, J.A.G., Adolf, R.O., Morehouse, K.M., Fritsche, J., eulitz, K., Steinhart, H., Ku, Y. (1999): Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver-ion high performance liquid chromatography. *Lipids* 34, 407-413.

- Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., Backlund, P., Vanhanen, H., Viikari, J. (1996): Elaidic and trans-vaccenic acids in plasma phospholipids as indicators of dietary intake of 18:1 trans-fatty acids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 687, 371-378.
- Shahidi, F. (2005): *Bailey's Industrial Oil & Fat Products, Volume 1: Edible oil and fat products: Chemistry, properties and health effects*, 6th Edition, John Wiley & Sons. Inc., New York.
- Siew, S.L. (1989): Effects of refining on chemical and physical properties of palm oil products. *Journal of the American Oil Chemist Society* 66, 116-119.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X. (1997): *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc.
- Stehart, H., Rickert, R., Winkler, K. (2003): Trans fatty acids (TFA): analysis, occurrence, intake and clinical relevance. *European Journal of Medical Research* 8, 358-62.
- Stender, S., Dyerberg, J. (2003): The influence of *trans* fatty acids on health: A report of the Danish Nutrition Council, Fourth Edition, Publ. No. 34, Copenhagen, Denmark, Danish Nutrition Council.
- Stender, S., Dyerberg, J. (2004): Influence of trans fatty acids on health. *Annals of Nutrition & Metabolism* 48, 61-66.
- Stender, S., Dyerberg, J., Bysted, A., Leth, T., Asturp, A. (2006): A trans word journey. *Atherosclerosis* 7, 45-52.
- Tarrango-Trani, M.T., Phillips, K.M., Lemar, L.E., Holden, J.M. (2006): New and existing oils and fats used in products with reduced trans fatty acid content. *Journal of the American Dietetic Association* 106, 867-880.
- Tavella, M., Peterson, G., Espeche, M., Cavallero, E., Cipolla, L., Perego, L., Caballero, B. (2000): *Trans* fatty acid content of a selection of foods in Argentina. *Food Chemistry* 69, 209-213.
- Tekin, A., Cizmeci, M., Karaback, H., Kayahan, M. (2002): Trans FA and Solid Fat Contents of Margarines Marketed in Turkey. *Journal of the American Oil Chemist Society* 79, 443 – 445 .
- Thurnhofer, S., Lehner, K., Vetter, W. (2008): Exclusive quantification of methyl-branched fatty acids and minor 18:1-isomers in foodstuff by GC/MS in the SIM mode using 10,11-dichloroundecanoic acid and fatty acid ethyl esters as an internal standards. *European Journal of Food Research and Technology* 226, 975-983

- Thurnhofer, S., Vetter, W. (2005): A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selecting ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 53, 8896-8903.
- Timms, R.E. (2003): *Confectionery fats handbook, properties, production and application*, The Oil Press, Bridgwater, England.
- Torres, A.G., Trugo, N.M.F., Trugo, L.C. (2002): Mathematical method for the prediction of retention time of fatty acid methyl esters in temperature-programmed capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 50, 4156-4163.
- Torres, D., Casal, S., Oliveira, M.B. (2002): Fatty acid composition of Portuguese spreadable fats with emphasis on trans isomers. *European Journal of Food Research & Technology* 214, 108-111.
- Ulberth, F., Henninger, M. (1992): One-step extraction/methylation method for determining fatty acid composition of processed foods. *Journal of the American Oil Chemist Society* 69, 174-177.
- Van Poppel, G., Van Erp-Baart, M.A., Leth, T., Gevers, E., Van Amelsvoort, J., Lanzmann-Petithory, D., A., Aro, A. (1998): Trans fatty acids in foods in Europe: the TRANSFAIR study. *Journal of Food Composition and Analysis* 11, 112-136.
- Virost, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F., Chemat, F. (2007): New microwave-integrated Soxhlet extraction. An advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography A* 1174, 138-144.
- Virost, M., Tomao, V., Ginies, C., Visioni, F., Chemat, F. (2008): Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *Journal of Chromatography A* 1196-1197, 57-64.
- Wagner, K.H., Auer, E., Elmadfa, I. (2000): Content of trans fatty acids in margarines, plant oils, fried products and chocolate spreads in Austria. *European Journal of Food Research & Technology* 210, 237-241.
- Wang, L., Weller, C.L. (2006): Recent advances in extraction of nutraceutical from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17, 300-312.
- Wassell, P., Young, N.W.G. (2007): Food applications of trans fatty acid substitutes. *International Journal of Food Science & Technology* 42, 503-517.
- WHO (2003). *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, Report of Joint WHO/FAO Expert Consultation*, WHO Technical Report Series, 916, Geneva.

- Wolff, R.L. (1992): Resolution of linolenic acid geometrical isomers by gas-liquid chromatography on the capillary column coated with a 100% cyanopropyl polysiloxane film (CPTMSi 88). *Journal of Chromatography Science* 30, 17-22.
- Wolff, R.L., Combe, N.A., Destailats, F., Boue, C., Precht, D., Molquentin J., Entressangles, B. (2000): Follow up of the Δ^4 to Δ^{16} trans-18:1 isomer profile and content in French processed food containing partially hydrogenated vegetable oils during the period 1995-1999. Analytical and nutritional implications. *Lipids* 35, 815-825.
- www.ats.rs/upload/dl/REGISTAR/LAB_ZA_ISPITIVANJE/01-059.pdf (01.07.2009.)
- www.foodlaw.rdg.ac.uk/news/eu-06044.htm (01.07.2009.)
- www.tfx.org.uk/page116.html (Denmark's trans fat law Executive Order No. 160 of 11 March 2003 on the Content of Trans Fatty Acids in Oils and Fats etc, English Translation) (01.07.2009.)
- Yancey, J.A., (1977): *Guided to Stationary Phases for Gas Chromatography*, Analabs, Inc.
- Zock, P.L., Katan, M.B. (1992): Hydrogenation alternatives: effects of *trans* fatty acids and stearic acid versus linoleic acid on serum lipids and lipoproteins in humans. *Journal of Lipid Research* 33, 399–410.
- Zoulias, E.I., Oreopoulou, V., Tzia, C. (2002): Textural properties of low-fat cookies containing carbohydrate- or protein-based fat replacers. *Journal of Food Engineering* 55, 337-342.