

»Mladi za napredek Maribora 2016«  
33. srečanje

## **Vpliv temperature in UV-A sevanja na izomerizacijo *cis* - *trans* maščobnih kislin v konopljinem olju**

Raziskovalno področje: Biotehnologija, kmetijstvo, živilstvo

Raziskovalna naloga

Avtor: MAJA LORBEC, NUŠA NAVRŠNIK

Mentor: ZDENKA KEUC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

**Maribor, 2015**

## KAZALO VSEBINE

---

---

KAZALO SLIK.....	5
KAZALO GRAFOV .....	6
KAZALO TABEL.....	7
Uporabljene krajšave .....	8
POVZETEK .....	9
Zahvala .....	10
1 UVOD .....	11
1.1 Cilji raziskave .....	12
1.2 Hipoteze.....	13
1.3 Metode dela.....	15
2 PREGLED LITERATURE.....	17
2.1 Maščobe .....	17
2.2. Maščobne kisline .....	17
2.3 <i>Trans</i> - maščobne kisline .....	20
2.4 Določanje skupnih <i>trans</i> maščobnih kislin.....	21
2.5 ATR-IR spektroskopija .....	23
2.6 Vpliv visokih temperatur in UV sevanja na sestavo olj .....	24
3 SESTAVA HLADNO STISKANEGA KONOPLJINEGA OLJA .....	25
3.1 Pridobivanje hladno stiskanega konopljinega olja .....	27
4 PRAKTIČNI DEL.....	28
4.1 Opis vzorcev olja.....	28
4.2 Določanje maščobno kislinse sestave pred in po segrevanju ter obdelavi z UV svetlobo .....	28
4.2.1 Opis priprave in ekstrakcije estrov .....	29
4.2.2 Plinska kromatografija z masno spektroskopijo .....	29

5 REZULTATI.....	31
5.1 GC-MS podatki.....	31
5.2 IR spektri standardov.....	36
5.3 Priprava umeritvene krivulje za določanje <i>trans</i> geometrijske oblike .....	38
5.4 Segrevanje vzorcev konopljinca olja in čistih snovi .....	39
5.5 Obsevanje vzorcev olja in čistih snovi z UV-A svetlobo valov dolžine 230-240 nm.....	40
5.4 Spektri standardov in vzorcev olja pred segrevanjem ali obsevanjem z UV-A svetlobo.....	42
5.5 IR spektri standardov in vzorcev olja po segrevanju.....	47
5.5.1 Konopljino olje 1 .....	47
5.5.2 Konopljino olje 2 .....	48
5.5.3 Konopljino olje 3 .....	50
5.5.4 Konopljino olje 4 .....	51
5.6 Spektri oleinske in linolne kisline ter glicerol trioleta po toplotni obdelavi .....	53
5.6.1 Oleinska kislina.....	53
5.6.2 Glicerol trioleat .....	53
5.6.3 Linolna kislina .....	54
5.7 Spektri vzorcev konopljinca olja po obsevanju z UV svetlobo.....	55
5.7.1 Konopljino olje 1 .....	55
5.7.2 Konopljino olje 2 .....	56
5.7.3 Konopljino olje 3 .....	56
5.7.4 Konopljino olje 4 .....	57
5.8 Spektri oleinske in linolne kisline ter glicerol trioleta po obsevanju z UV svetlobo ...	57
5.8.1 Oleinska kislina.....	57
5.8.2 Glicerol trioleat .....	58

5.8.3 Linolna kislina .....	59
6 RAZPRAVA .....	59
7 ZAKLJUČEK.....	61
8 DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	63
9 VIRI IN LITERATURA .....	64
9.1 Bibliografija.....	64
9.2 Spletni viri .....	66
PRILOGA 1- FARMAKOLOŠKI UČINKI <i>OMEGA-3</i> MAŠČOBNIH KISLIN.....	69
PRILOGA 2 – GC_MS .....	71

## KAZALO SLIK

---

SLIKA 1. CIS IZOMERA $\alpha$ -LINOLENSKE KISLINE. ....	13
SLIKA 2. (ZGORAJ LEVO) CIS, CIS-9,12-OKTADEKADIENOJSKA KISLINA; PREHOD V TRANS OBLIKO (TRANS-10, CIS-12, TRANS-11) (OPHARDT, 2003).....	13
SLIKA 3. NASTANEK KONJUGIRANIH MAŠČOBNIH KISLIN (BARRINGTON, 2013). ....	14
SLIKA 4. PREHOD CIS OLEINSKE KISLINE (B) V TRANS OBLIKO (A) .....	14
SLIKA 5. STANDARD, UPORABLJEN V NALOGI: TRANS-9-TRIELAIDIN.....	16
SLIKA 6. STANDARD, UPORABLJEN V NALOGI: GLICEROL TRIOLEAT.....	17
SLIKA 7. CIS-OLEINSKA KISLINA.....	18
SLIKA 8. STRUKTURA NENASIČENIH MAŠČOBNIH KISLIN .....	18
SLIKA 9. PRIKAZ BAZIČNO IN KISLINSKO KATALIZIRANE REAKCIJE (PRIREJENO PO HALL, 2012).....	29
SLIKA 10. SHEMA APARATURE: GC-MS (POVZETO PO HOFFMAN IN STROOBANT, 2007). .....	30
SLIKA 11. ORGANIGRAM DRUGEGA DELA NALOGE. ....	36
SLIKA 12. PERKIN ELMER SPECTRUM TWO. ....	37
SLIKA 13. ATR IR SPEKTER TRIELAIDINA (100%) TRANS (RDEČE) IN TRIOLEIN (100%) CIS (MODRO) (SHIMADZU, 2015). ....	37
SLIKA 14. SEGREVANJE VZORCEV (VIR: LASTEN).....	40
SLIKA 15. OBSEVANJE VZORCEV 1 (VIR: LASTEN).....	40
SLIKA 16. OBSEVANJE VZORCEV 2 (VIR: LASTEN).....	41
SLIKA 17. OBSEVANJE VZORCEV 3 (VIR: LASTEN).....	41
SLIKA 18. OBSEVANJE VZORCEV 4 (VIR: LASTEN).....	41
SLIKA 19. IR SPEKTER LINOLENSKE KISLINE PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM.42	
SLIKA 20. PRIBLIŽAN SPEKTER LINOLENSKE KISLINE PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM. ....	42
SLIKA 21. SPEKTER GLICEROL TRIOLEATA (TO) PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM. ....	43
SLIKA 22. IR SPEKTER OLEINSKE KISLINE PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM. ....	44
SLIKA 23. VZOREC KONOPLJINEGA OLJA 1 PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM. ..	44
SLIKA 24. VZOREC KONOPLJINEGA OLJA 2 PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM. ..	45
SLIKA 25. VZOREC KONOPLJINEGA OLJA 3 PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM. ..	45
SLIKA 26. VZOREC KONOPLJINEGA OLJA 4 PRED SEGREVANJEM IN OBSEVANJEM.....	46

SLIKA 27. KONOPLJINO OLJE 1 (30 MIN, 100°C) (VIR: LASTEN).....	47
SLIKA 28. KONOPLJINO OLJE 1 (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).....	48
SLIKA 29. KONOPLJINO OLJE 2 (30 MIN, 100°C) (VIR: LASTEN).....	49
SLIKA 30. KONOPLJINO OLJE 2 (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).....	49
SLIKA 31. KONOPLJINO OLJE 3 (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).....	50
SLIKA 32. KONOPLJINO OLJE 4 (30 MIN, 100°C) (VIR: LASTEN).....	51
SLIKA 33. KONOPLJINO OLJE 4 (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).....	52
SLIKA 34. PRIMERJAVA KONOPLJINEGA OLJA ŠT. 3 IN 4 PO SEGREVANJU NA 150°C (30 MIN) (VIR: LASTEN).....	52
SLIKA 35. IZRAČUN PRVEGA ODVODA ZA OLJE ŠT. 3 IN 4 PO SEGREVANJU NA 150°C (30 MIN) (VIR: LASTEN).....	53
SLIKA 36. GLICEROL TRIOLEATE (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).....	54
SLIKA 37. KONOPLJINO OLJE 1 (UV, 120 MIN) (VIR: LASTEN).....	55
SLIKA 38. GLICEROL TRIOLEATE (UV, 120 MIN) (VIR: LASTEN).....	58

## KAZALO GRAFOV

---

GRAF 1. POMEMBNI ABSORPCIJSKI VRHOVI ZNAČILNI ZA MAŠČOBNE KISLINE (AOCS, 2013).....	16
GRAF 2. MAŠČOBNE KISLINE V RAZLIČNIH OLJIH OREŠČKOV IN SEMEN (NUTRITIONAL COMPOSITION OF HEMP SEED AND OIL, 2015).....	26
GRAF 3. SPREMINJANJE VREDNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN V KONOPLJINEM OLJU 1.....	33
GRAF 4. SPREMINJANJE VREDNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN V KONOPLJINEM OLJU 2.....	34
GRAF 5. SPREMINJANJE VREDNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN V KONOPLJINEM OLJU 3.....	34
GRAF 6. SPREMINJANJE VREDNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN V KONOPLJINEM OLJU 4.....	35
GRAF 7. VIŠINA VRHA PRI $966\text{ cm}^{-1}$ V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE TRIELAIDINA.....	38
GRAF 8. UMERITVENA PREMICA ZA <i>TRANS</i> -MAŠČOBNE KISLINE (ATR - FTIR SPEKTROSKOPIJA).....	39
GRAF 9. SPEKTER STANDARDA FAMA (1 – 15 MIN).....	71

GRAF 10. SPEKTER STANDARDA FAMA (16 – 30 MIN). .....	71
--	----

## **KAZALO TABEL**

---

---

TABELA 1. NAJPOMEMBNEJŠI SIGNALI V IR SPEKTRIH ZA ANALIZO MAŠČOBNIH KISLIN (AOCS, 2013). .....	16
TABELA 2. MAŠČOBNE KISLINE IN NJIHOVA IMENA.....	19
TABELA 3. METODE DOLOČANJA TMK (GLAVIČ, 2012).....	22
TABELA 4. VALOVNA ŠTEVILA, PRIMERNA ZA ANALIZO MAŠČOBNIH KISLIN. 23	
TABELA 5. MAŠČOBNE KISLINE V KONOPLJINEM OLJU (NUTRITIONAL COMPOSITION OF HEMP SEED AND OIL, 2015).....	25
TABELA 6. VITAMINI IN MINERALI (MG/100G) V KONOPLJINI SEMENIH VRSTE FINOLA (CALLAWAY, 2004) .....	26
TABELA 7. OPIS VZORCEV OLJA.....	28
TABELA 8. DELEŽI LINOLNE LINOLENSKE IN OLEINSKE KISLINE V SVEŽIH VZORCIH, PO SEGREVANJU IN PO UV SEVANJU.....	32
TABELA 9. REZULTATI MERITEV ABSORBANCE ZA STANDARDNE RAZTOPINE TRIELAIDINA V OLEINSKI KISLINI.....	38
TABELA 10. KONOPLJINO OLJE 1 PO SEGREVANJU.....	47
TABELA 11. KONOPLJINO OLJE 2 PO SEGREVANJU.....	48
TABELA 12. KONOPLJINO OLJE 3 PO SEGREVANJU.....	50
TABELA 13. KONOPLJINO OLJE 4 PO SEGREVANJU.....	51
TABELA 14. GLICEROL TRIOLEAT PO SEGREVANJU.....	53
TABELA 15. KONOPLJINO OLJE 1 PO OBSEVANJU. ....	55
TABELA 16. KONOPLJINO OLJE 2 PO OBSEVANJU. ....	56
TABELA 17. KONOPLJINO OLJE 3 PO OBSEVANJU. ....	56
TABELA 18. KONOPLJINO OLJE 4 PO OBSEVANJU. ....	57
TABELA 19. GLICEROL TRIOLAT PO OBSEVANJU.....	58

## Uporabljene krajšave

---

**MK**- maščobne kisline

**CMK**- *cis*-maščobne kisline

**TMK**- *trans*-maščobne kisline

**ALA**-  $\alpha$ -linolenska kislina

**LA**- linolna kislina

**UV**- ultravijolično

**NMK**- nenasičene maščobne kisline

**EPA**- eikozapentaenojska kislina

**DHA**- dokosaheksanojska kislina

**LDH**- laktat dehidrogenaza

**VLDL**- lipoprotein zelo nizke gostote

**HDL**- lipoprotein z visoko gostoto

**LDL**- lipoprotein z nizko gostoto

**THC**- tetrahidrokanabinol

**PMS**- predmenstrualni sindrom

**MEMK**- metilni estri maščobne kisline

**TO**- glicerol-trioleat

**OK**-oleinska kislina

**LK**-linolna kislina

**AA**- arahidonska kislina

**ATR-IR** - attenuated total reflectance

**ATR-FTIR**- fourier transform infrared spectroscopy



## POVZETEK

---

Z raziskavo smo preučili vpliv povišanih temperatur (od 100 do 240°C) in UV-A sevanja na *cis-trans* izomerizacijo maščobnih kislin v vzorcih hladno stiskanega konopljinca olja. V preučevanih vzorcih prevladuje linolna kislina (54,07% - 51,87%), *α*-linolenska kislina (16,60% - 19,22%), najmanj pa je oleinske kisline (9,26% - 10,74%). Analiza vzorcev z metodo GC z masno detekcijo po 60 min izpostavljanju temperaturam 240°C (±5°C) je pokazala, da se je delež nenasičenih MK v povprečju zmanjšal med 10 in 20%. Vsa preučevana konopljinca olja so po segrevanju spremenila tako barvo kot vonj. Delež *trans* izomer se je povečal od 0,20% (vzorec 4) do 0,40% (vzorca 2, 3). Povečanje smo opazili pri temperaturah nad 150°C in segrevanju, ki je trajalo vsaj 60 min. Pri UV obsevanju se je delež *trans* nenasičenih maščobnih kislin povečal med 0,1% in 0,2%. Zaključimo lahko, da segrevanje konopljinca olja ali obsevanje z UV svetlobo okoli 230 nm povzroča *cis-trans* izomerizacijo v obsegu do 0,5%.

Število besed: 157

Ključne besede: konopljinca olje, *trans* maščobne kisline, ATR-IR spektroskopija

## **Zahvala**

---

Iskreno se zahvaljujemo naši mentorici za strokovno vodenje in vso pomoč, ki nam jo je nudila ob izdelavi te raziskovalne naloge in pridobivanju literature. Želimo se zahvaliti tudi za vso podporo, čas in trud, ki so privedli do izpolnitve zastavljenega cilja. Ob izdelavi te naloge smo se ogromno naučili, to znanje pa bomo širili tudi med druge.

## 1 UVOD

---

*Omega-3* maščobne kisline so esencialne maščobne kisline, zato je njihov vnos povezan s pravilno prehrano. Naravni vir so predvsem hladnomorske ribe (losos, tuna, polenovka, sardine), laneno seme in različni oreščki. Preveč *omega-6* in premalo *omega-3* maščobnih kislin je povezano z razvojem srčno-žilnih, vnetnih in drugih obolenj. Na osnovi pozitivnih učinkov *omega-3* maščobnih kislin številne zdravstvene organizacije priporočajo njihov povečan vnos s hrano in prehranskimi dopolnili (Rihtarič, 2013). Kljub temu, da mehanizem njihovega delovanja še ni povsem znan, številne klinične študije potrjujejo pozitivne učinke na telo in varno uporabo. Zato je pomembno, da jih uživamo v zadostnih količinah. Na tej točki ima konopljinu olje lahko veliko prednosti pred prehranskimi dopolnili ali ribami, saj je pri slednjih lahko problem prevelika količina težkih kovin (Rihtarič, 2012).

Konopljinu seme (*Cannabis sativa L.*) in olje se v tradicionalni orientalski medicini že tisoče let uporabljata kot zdravilo za številne zgoraj omenjene bolezni. Razlog je v zelo ugodni sestavi, zaradi česar lahko pozitivno vpliva tako na preprečevanje bolezni srca in ožilja, kot tudi lajšanje težav predmenstrualnega sindroma, multiple skleroze, shizofrenije in številnih drugih bolezni (Pokorn, 2013; Tasič, 2013; Virant, 2014). K temu največ pripomore dejstvo, da sta tako olje kot oreščki bogat vir dveh esencialnih maščobnih kislin: *linolne* (18:2 *omega-6*) in *alfa-linolenske* esencialne maščobne kisline (18:3 *omega-3*). V konopljinem olju sta obe maščobni kislini v optimalnem razmerju (Tasič, 2010)<sup>1</sup>. Poleg pomembnih esencialnih maščobnih kislin vsebujejo konopljinu semena in olje tudi veliko proteinov, vitaminov in mineralov, in se zato uporabljajo za zdravljenje vnetnih procesov ter naravno višajo imunsko sposobnost telesa (Callaway, 2004).

Večina nenasičenih maščobnih kislin v naravi je v *cis* obliki (CMK). Za razliko od *cis* so *trans* maščobne kisline (TMK) oblika, ki ima številne škodljive učinke na telo. Prekomerno uživanje teh maščob lahko zraven bolezni srca in ožilja, povzroča tudi zmanjšano funkcijo možganov, povezano z Alzheimerjevo boleznijo (Ascherio s sodel., 1999). *Trans* maščobne kisline (TMK) se naravno pojavljajo v maščobnih živilih živalskega izvora, vendar v majhnih količinah (od 2% do 5%). Eden od potencialnih virov nastanka TMK je uporaba visokih temperatur, izpostavljenost UV žarkom ali kemijska obdelava rastlinskih olj (primer

---

<sup>1</sup> Včasih so za idealno imeli razmerje 5:1, ki je podobno razmerju v sojinem olju, vendar so kasneje ugotovili, da presežek *alfa-linolenske* kisline (*omega-3*) lahko zmoti presnovno ravnovesje, saj lahko pride do pomanjkanja *omega-6* metabolitov (Callaway, 2004).

hidrogeniranja). Če je maščoba izpostavljena visokim temperaturam, lahko te povzročijo oksidacijo in nastanek škodljivih razgradnih produktov. Stopnja oksidacije je odvisna od vrste in temperature olja. Horvat (2010) navaja, da se proces pretvorbe iz *cis* v *trans* obliko ob prisotnosti kisika lahko začne že pri 150°C. Pri tej temperaturi se začnejo tudi termooksidativne spremembe in nastanek škodljivega akroleina<sup>2</sup>. Glavičeva (2012) ugotavlja, da se delež *trans* maščobnih kislin v rafiniranem sončničnem olju povečuje s povišanjem temperature olja<sup>3</sup>, časom izpostavljenosti visokim temperaturam ali izpostavljenostjo zraku in svetlobi. Ugotavlja, da se ob tem zmanjšuje tudi delež linolne kisline. Dodatek antioksidantov ne vpliva na delež pretvorbe *cis* izomere v *trans* (Glavič 2012). Ker tudi drugi viri (Sadler, 2005; Mölleken, 1997) navajajo, da pri segrevanju lahko pride do prehajanja nenasičenih maščobnih kislin iz *cis* v *trans* obliko, nas je zanimalo, ali je to mogoče tudi pri konopljinem olju, saj je ravno v idealni kombinaciji obeh esencialnih nenasičenih *cis* maščobnih kislin, ključ njegove velike prehranske vrednosti. Zato je bil namen raziskave preučiti vpliv povišanih temperatur (od 100°C do 240°C) in UV sevanja ter trajanja teh sprememb na možnosti izomerizacije maščobnih kislin v konopljinem olju. Pregled ustrezne (dostopne) literature s tega področja je pokazal, da tovrstne raziskave v Sloveniji še ni bilo opravljene.

## 1.1 Cilji raziskave

---

Z raziskavo želimo preučiti vpliv povišanih temperatur (od 100 do 240°C) in UV-A sevanja na izomerizacijo (prehod iz *cis* v *trans* obliko) maščobnih kislin v izbranih vzorcih hladno stiskanega konopljinca olja. Slednje ima med konopljinimi olji najvišjo prehransko vrednost. Olja bomo segrevali na temperaturah: 100, 150, 200 in 240°C in sicer 30 ter 60 minut. V ločenem poskusu bomo olja za enako časovno enoto izpostavili UV-A sevanju (230-240 nm). Enakim pogojem bomo izpostavili tudi čisto linolno kislino in oleinsko kislino, s čimer bomo preučili katera od preučevanih snovi, prisotna v konopljinem olju, je najbolj občutljiva za izomerizacijo. Kontrola bo glicerol trioleat. Delež posameznih sestavin konopljinca olja bomo preučili s kombinacijo plinske kromatografije z masno spektrometrijo ter ATR FTIR spektroskopijo.

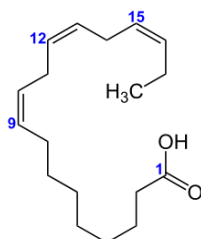
---

<sup>2</sup> Žarkost maščob največkrat povzročimo z močnim segrevanjem, pri katerem se maščobe razkrojijo. Pri tem iz glicerolovega dela nastane aldehyd (propenal) z ostrim vonjem, ki se imenuje akrolein.

<sup>3</sup> 120 urno cvrenje pri 155- 185°C.

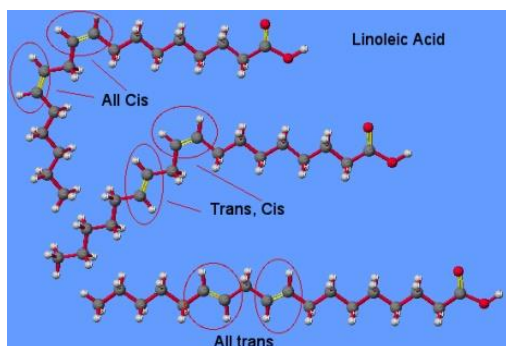
## 1.2 Hipoteze

**Hipoteza 1:** Ker linolenska<sup>4</sup> kislina predstavlja največji delež CMK v konopljinem olju (54 – 57%)<sup>5</sup>, bo segrevanje povzročilo prehod vsaj ene od dvojnih vezi v pozicijo *trans*. Možnih je več kombinacij, glede na lego dvojnih vezi.



SLIKA 1. CIS IZOMERA  $\alpha$ -LINOLENSKE KISLINE.<sup>6</sup>

Podoben prehod lahko pričakujemo tudi pri linolni<sup>7</sup> kislini. Torej prehod iz: *cis*-9 v *trans*-9 in prehod iz *cis*-12 v *trans*-12 (vendar ne obe hkrati).



SLIKA 2. (ZGORAJ LEVO) CIS, CIS-9,12-OKTADEKADIENOJSKA KISLINA; PREHOD V TRANS OBLIKO (TRANS-10, CIS-12, TRANS-11) (OPHARDT, 2003).

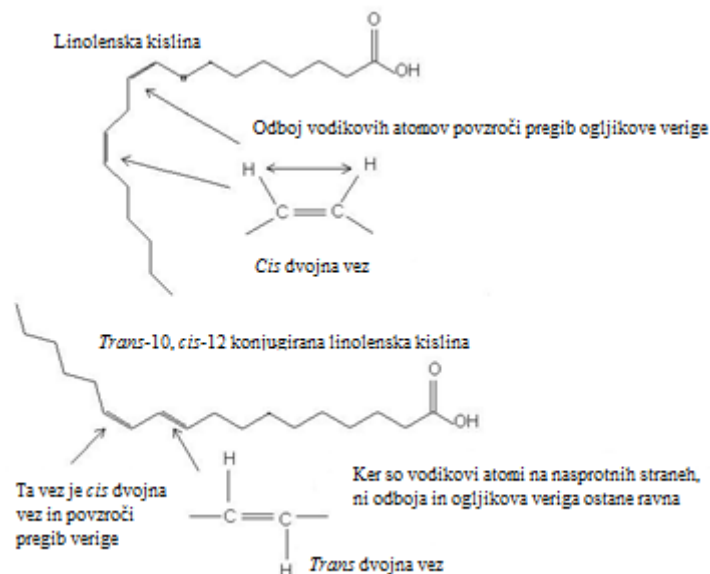
**Hipoteza 2.** Segrevanje linolne kisline do 240°C ne bo povzročilo prehoda *cis* izomere v popolno *trans* obliko, torej *trans*-10 in *trans*-12. Razlog je stabilnejša konfiguracija, ki jo (nova) konjugirana linolenska kislina pridobi s prehomom ene *cis* vezi v *trans* položaj (Barrington, 2013).

<sup>4</sup> IUPAC ime: *cis,cis,cis*-oktadeka-9,12,15-trienojska kislina.

<sup>5</sup> Iz linolenske kisline organizem sintetizira  $\gamma$ -linolensko kislino, ki je gradivni material za sintezo prostaglandinov - to so hormoni, ki so nujni za regulacijo številnih funkcij organizma. Linolensko in  $\gamma$ -linolensko maščobno kislino skupaj imenujemo vitamin F (Wikipedia, FKKT UL).

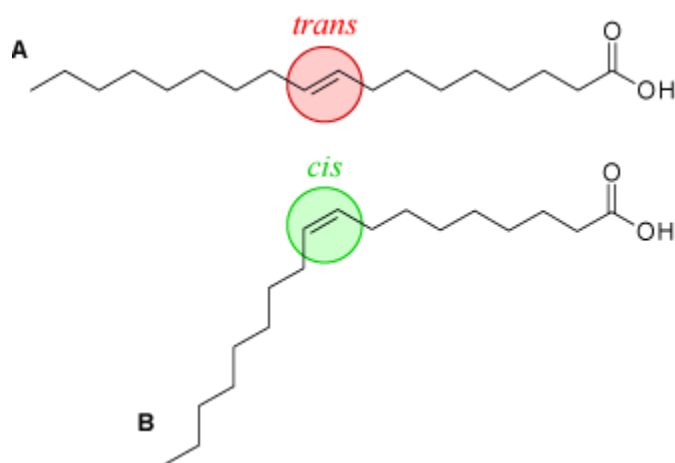
<sup>6</sup> Vir slike: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2e/Alpha-Linolenic\\_acid\\_Structural\\_Formulae\\_V.2.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2e/Alpha-Linolenic_acid_Structural_Formulae_V.2.svg). (povzeto 3.1.2016)

<sup>7</sup> IUPAC ime: (Z,Z)-9,12-oktadekadienojska kislina ali *cis, cis*-9,12-oktadekadienojska kislina. Je *omega*-6 esencialna maščobna kislina.



SLIKA 3. NASTANEK KONJUGIRANIH MAŠČOBNIH KISLIN (BARRINGTON, 2013).

**Hipoteza 3.** Oleinska kislina (18:1 *omega*-9) predstavlja 10-13% delež MK v konopljinem olju (Osburn, 2013). Zgradba je simetrična in manj občutljiva na segrevanje, zato do izomerizacije iz *cis* v *trans* obliko pri temperaturah do 240°C in UV-A sevanju ne bo prišlo.



SLIKA 4. PREHOD *CIS* OLEINSKE KISLINE (B) V *TRANS* OBLIKO (A) <sup>8</sup>

**Hipoteza 4.** Segrevanje linolne kisline do 240°C ne bo povzročilo prehoda *cis* izomere v popolno *trans* obliko, torej *trans*-10 in *trans*-12. Razlog je stabilnejša konfiguracija, ki jo konjugirana linolna kislina pridobi s preходом ene vezi v *trans* položaj (konjugacija).

<sup>8</sup> Vir slike: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/Cis\\_trans.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/Cis_trans.png) (povzeto 3.2.2016).

**Hipoteza 5.** Obsevanje linolne kisline z UV svetlobo valovne dolžine 230-240 nm bo povzročilo prehod vsaj ene od obeh dvojnih vezi v pozicijo *trans*. Možne kombinacije so: *cis*-10, *cis*-12; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-10, *trans*-12.

**Hipoteza 6.** Sestava konopljinega olja se bo s segrevanjem olja do 240 °C spremenila. Delež skupnih TMK se bo povečal.

**Hipoteza 7.** Sestava bio konopljinega olja se bo z obsevanjem z UV-A svetlobo spremenila. Delež skupnih TMK se bo povečal.

### 1.3 Metode dela

---

Za določanje deleža *trans* maščobnih kislin se največ uporablja plinska kromatografija, ki pa je časovno zahtevna, saj zahteva predpripravo in izolacijoustreznih metilnih estrov MK. Ta metoda nam bo služila kot referenčna metoda za določitev sestave olj in spreminjanje njihove sestave po segrevanju na 240°C (60 min) in izpostavljanju UV svetlobi (60 min). Zaradi značilne strukturne razlike med *cis* in *trans* izomeri, smo sklepali, da bo za spremljanje morebitne pretvorbe *cis* v *trans* zelo uporabna IR spektroskopija, ki nam je na voljo tudi v šolskem laboratoriju. IR spektri bodo zaradi strukturnih razlik obeh izmer pokazali različne (značilne) vrhove. V literaturi (AOCS, 2013) smo zasledili, da je značilen IR vrh za *trans* MK pri valovnem številu 966 cm<sup>-1</sup>. Z uporabo umeritvene premice bi pri tem valovnem številu (966 cm<sup>-1</sup>) lahko določali delež izomerizacije. Standard za *trans* obliko bo predstavljal trielaidin in standard za *cis* vez glicerol trioleat.

GRAF 1. POMEMBNI ABSORPCIJSKI VRHOVI ZNAČILNI ZA MAŠČOBNE KISLINE (AOCS<sup>9</sup>, 2013).

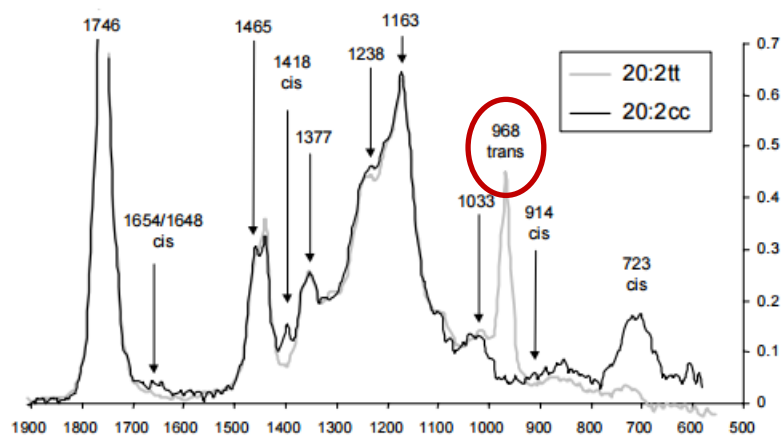
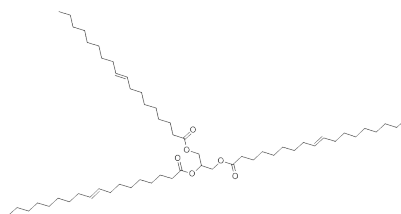


TABELA 1. NAJPOMEMBNEJŠI SIGNALI V IR SPEKTRIH ZA ANALIZO MAŠČOBNIH KISLIN (AOCS, 2013).

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Group	Mode of vibration
3025	=C-H ( <i>trans</i> )	Stretching (very weak)
3010	=C-H ( <i>cis</i> )	Stretching
2955	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Stretching, asym
2926	-C-H (CH <sub>2</sub> )	Stretching, asym
2855	-C-H (CH <sub>2</sub> )	Stretching, sym
1746	-C=O	Stretching
1654/1658	-C=C- ( <i>cis</i> )	Stretching (very weak)
1465	-C-H (CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> )	Bending, scissoring
1418	=C-H ( <i>cis</i> )	Bending, rocking
1377	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Bending, sym
1238	-C-O, -CH <sub>2</sub> -	Stretching, bending
1163	-C-O, -CH <sub>2</sub> -	Stretching, bending
1033	-C-O	Stretching
968	-HC=CH- ( <i>trans</i> )	Bending out of plane
914	-HC=CH- ( <i>cis</i> )	Bending out of plane (very weak)
723	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -, -HC=CH- ( <i>cis</i> )	Bending, rocking

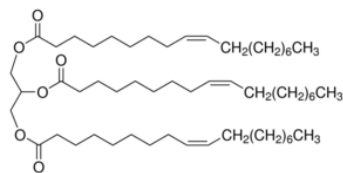


SLIKA 5. STANDARD, UPORABLJEN V NALOGI: TRANS-9-TRIELAIDIN<sup>10</sup>

<sup>9</sup> AOCS -American Oil Chemists Society

<sup>10</sup> Vir slike: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t7140?lang=en&region=SI> (povzeto 26.12.2015)





SLIKA 6. STANDARD, UPORABLJEN V NALOGI: GLICEROL TRIOLEAT<sup>11</sup>

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Maščobe

Lipidi so organske spojine, ki so netopne v vodi, zato pa toliko bolj v nepolarnih organskih topilih. Glede na strukturo jih lahko delimo na (Krečič-Stres, 2008):

- ✓ lipide z estersko strukturo (skupina trigliceridov (masti in olja), fosfogliceridi, sfingolipidi, glikolipidi in voski);
- ✓ lipide, ki niso estri (steroidi, terpeni, prostaglandini).

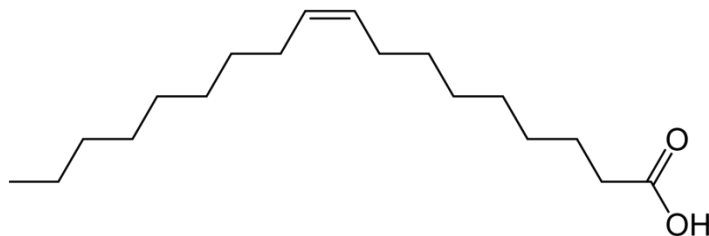
Lipidi z estersko strukturo vsebujejo maščobne kisline (MK). Te se med seboj razlikujejo po številu C-atomov (4-24) in številu dvojnih vezi. MK z višjim številom C-atomov so pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju (Pokorny, 2006). MK so v celicah vedno vezane na glicerol (Krečič-Stres, 2008). V preteklosti je veljalo, da so lipidi predvsem vir energije, danes vemo, da imajo lipidi poleg zagotavljanja energije in gradnje celičnih membran tudi funkcijo vitaminov, pigmentov, encimskih kofaktorjev, signalnih molekul in celo prenašalcev elektronov.

### 2.2. Maščobne kisline

Prekurzor za sintezo maščobnih kislin je očetna kislina oziroma njen aktiviran derivat acetilkoencim A. Zato skoraj vse MK vsebujejo sodo število C-atomov. V naravi so najpogostejše MK s 16 in 18 ogljikovimi atomi. Alkilna veriga je lahko nasičena ali nenasičena. Nenasičene MK so vsaj dvakrat pogostejše kot nasičene in to tako v živalskih kot v rastlinskih lipidih (Klofutar, 1992). Prisotnost dvojnih vezi zelo vpliva na fizikalne in kemijske lastnosti MK.

<sup>11</sup> Vir slike: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB2715065.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2715065.htm) (povzeto 26.12.2015)

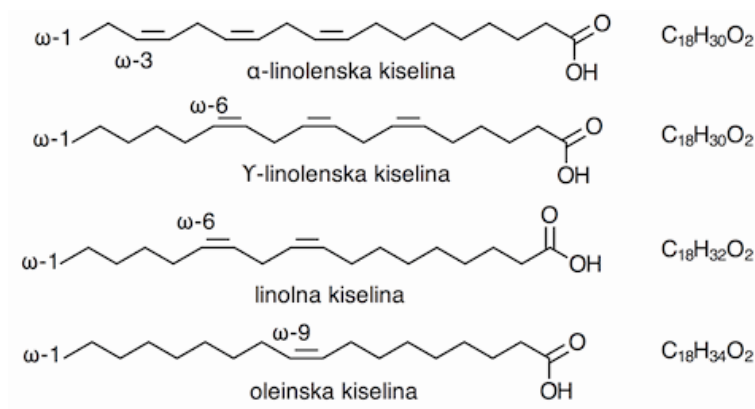
Nenasičene MK imajo nižja tališča in so bolj topne v organskih topilih kot nenasičene s primerljivim številom C-atomov. Med njimi imajo *trans* MK višja vrelišča in tališča kot primerljive *cis* izomere (Pokorny, 2006).



SLIKA 7. *CIS*-OLEINSKA KISLINA<sup>12</sup>

Na mestu, kjer je dvojna vez, se molekula »ukrivi«, zaradi česar je njihova urejenost v tekočini manjša, kot pri »iztegnjenih« nasičenih MK.

Pri mononenasičenih MK je dvojna vez običajno na mestih C9 ali C10 (prvi C-atom predstavlja C-atom v karboksilni funkcionalni skupini), pri di-nenasičenih MK je dvojna vez običajno na mestih C12 in C13. Naravne maščobne kisline imajo praviloma vedno *cis* konfiguracijo (Belitz s sodel., 2009). Glede na lego prve dvojne vezi, gledano iz metilnega konca molekule, delimo nenasičene maščobne kisline na *omega*-3, *omega*-6 in *omega*-9 maščobne kisline (Rose in Connolly, 1999). Primer *omega*-3 maščobne kisline je  $\alpha$ -linolenska kislina (ALA), *omega*-6 maščobne kisline linolna kislina (LA) ter *omega*-9 kisline oleinska kislina.



SLIKA 8. STRUKTURA NENASIČENIH MAŠČOBNIH KISLIN<sup>13</sup>

<sup>12</sup> Vir slike: [http://www.wikiwand.com/en/Oleic\\_acid](http://www.wikiwand.com/en/Oleic_acid) (povzeto 3.2.2016).

<sup>13</sup> Vir slike: <http://www.plantagea.hr/dev/masne-kiseline> (povzeto 3.2.2016)

Fizikalne lastnosti nenasičenih maščobnih kislin (NMK) so v največji meri odvisne od položaja prve dvojne vezi v alkilni verigi.

Pri poimenovanju MK se pogosto uporabljajo trivialna imena.

TABELA 2. MAŠČOBNE KISLINE IN NJIHOVA IMENA.

TRIVIALNO IME	KEMIJSKO IME	KRATKA OZNAKA
<b>Nasičene kisline</b>		
maslena	butanojska	C4:0
kapronska	heksanojska	C6:0
kaprilna	oktanojska	C8:0
kapronska	dekanojska	C10:0
lavrinska	dodekanojska	C12:0
miristinska	tetradekanojska	C14:0
palmitinska	heksadekanojska	C16:0
stearinska	oktadekanojska	C18:0
arahidinska	eikozanojska	C20:0
behenska	dokozanojska	C22:0
<b>Mononenasičene</b>		
oleinska	<i>cis</i> -9-oktadecenska	C18:1, c-9
elaidinska	<i>trans</i> -9-oktadecenska	C18:1, t-9
eruka	<i>cis</i> -13-dokosenska	C22:1 c-9
<b>Polinenasičene</b>		
linolna	<i>cis-cis</i> -9,12-oktadekadienska	C18:2, c-9, c-12
	<i>trans-trans</i> -9,12-oktadekadienska	C18:2, t-9, t-12
	<i>cis-trans</i> -9,12-oktadekadienska	C18:2, c-9, t-12
	<i>trans-cis</i> -9,12-oktadekadienska	C18:2, t-9, c-12
$\alpha$ - linolenska	all- <i>cis</i> -9,12,15-oktadekatrienska	C18:3 n-6
arahidonska	all- <i>cis</i> -5,8,11,14-eikozatetraenska	C20:4 n-6
EPA (eikozapentanojska)	all- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eikozapentaenska	C20:5 n-3
DHA (dokozaheksanojska)	all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenska	C22:6 n-3

$\alpha$ -linolenska (ALA) in linolna kislina (LA) sta esencialni maščobni kislini, ki ju človeško telo nujno potrebuje za svoje delovanje, vendar ju ni sposobno samo sintetizirati, zato ju moramo v zadostni količini zaužiti s hrano. Še zlasti pomemben je vnos ALA, saj je naš encimski sistem sposoben pretvoriti ALA v drugi dve pomembnejši *omega*-3 maščobni kislini, in sicer EPA in DHA.

Za razliko od *omega*-3 maščobnih kislin, je *omega*-6 MK v naši prehrani preveč<sup>14</sup>. Rihtarjeva poroča, da s prehrano običajno vnesemo razmerje med *omega*-6 in *omega*-3 maščobnimi kislinami v 15-16:1, kar za 3-4x presega priporočljivo razmerje 3:1. Prevelike količine *omega*-6 maščobnih kislin so tako lahko vzrok številnim vnetnim boleznim. *Omega*-3 in *omega*-6 maščobne kisline so namreč prekursorji številnih eikozanoidov, ki imajo pomembno

<sup>14</sup> Slednje se namreč nahajajo v nerafiniranih rastlinskih oljih (sončnično, sezamovo, bučno, koruzno olje) in hrani živalskega izvora (meso in mlečni izdelki), ki je vsakodnevno na našem jedilniku (opomba avtoric).

vlogo pri regulaciji vnetja. Iz *omega-6* maščobnih kislin nastanejo eikozanoidi, ki delujejo provnetno in pospešujejo vnetje, iz *omega-3* maščobnih kislin pa eikozanoidi, ki zmanjšajo stopnjo vnetja in delujejo bolj protivnetno (Wall s sodel., 2010).

### 2.3 *Trans*- maščobne kisline

---

Nenasičene maščobne kisline lahko obstajajo v dveh geometrijskih oblikah: *cis* in *trans*. Ker dvojna vez onemogoča prosto vrtljivost, nastane razlika v poziciji vodika ob dvojni vezi. Pri *cis* obliki sta vedno na isti strani ravnine dvojne vezi, pri *trans* obliki pa na različnih straneh ravnine dvojne vezi. Posledica takšne strukture je, da imajo *cis* izomere vedno nižja tališča (in vrelišča) in so termodinamsko manj stabilne kot *trans* izomere. Zato pri izomerizaciji skoraj vedno nastane *trans* izomera, ki je tudi manj občutljiva na (avto)oksidacijo (Filip s sodel., 2011).

*Trans* maščobne kisline v naravi najdemo v živilih živalskega izvora, kot so meso, mlečni izdelki, mleko in loj. Njihova sinteza je posledica mikrobne hidrogenacije rastlinskih (poli)nenasičenih maščobnih kislin v vampu prežvekovalcev (biohidrogenacija). Kot posledica razkroja nenasičenih maščobnih kislin s *cis* konfiguracijo lahko nastanejo tudi v človekovem metabolizmu (Mölleken, 1998). Vendar tukaj praviloma nastajajo konjugirane dvojne vezi (*cis/trans*), kjer je negativnih učinkov veliko manj kot pri industrijskem hidrogeniranju olj. *Trans* MK in konjugirane MK niso sinonimi. *Trans* MK imajo lahko samo eno *trans* vez, konjugirane MK pa imajo vedno več dvojnih vezi, od katerih je ena ali več izmed njih v *trans* poziciji.<sup>15</sup>

Zaradi škodljivega delovanja nasičenih maščobnih kislin živalskega izvora, so v preteklosti nutricionisti priporočali uporabo zdravju prijaznejših rastlinskih olj, ki vsebujejo pretežno nenasičene maščobne kisline. Vendar nenasičene maščobne kisline v rastlinskih oljih lahko zelo hitro oksidirajo in so (časovno gledano) manj stabilna oblika maščob. Zato so s postopkom delne hidrogenacije nenasičenih maščobnih kislin pripravili stabilnejše (nasičene)

---

<sup>15</sup> Konjugirane maščobne kisline so strukturni izomeri maščobnih kislin linolenske kisline. Konjugirane linolenske kisline imajo velik pomen za naše telo. Pomembna sta predvsem izomera: *cis*-9, *trans*-11 in *trans*-10, *cis*-12 konjugirane maščobne kisline. *Trans*-10, *cis*-12 maščobna kislina ima učinek zmanjševanja količine maščob (RdB, 2013).

maščobne kisline in omogočili uporabo teh za pripravo številnih drugih živil (npr. margarina in rastlinska mast za peko). Na ta način so rastlinskim oljem izboljšali obstojnost, podaljšali življenjsko dobo in praktičnost uporabe, saj so pri sobni temperaturi še vedno v poltrdem stanju. Toda pri postopku hidrogenacije se delež *trans* maščobnih kislin, glede na celotno vsebnost maščobe, lahko dvigne na 15% (Ascherio s sodel., 1999), kar je neželen stranski učinek in njihova škodljivost je višja kot pri tistih, ki so naravno prisotne v živilih živalskega izvora (Chopra in Panesear, 2010).<sup>16</sup>

V procesu hidrogenacije se pri visoki temperaturi najprej razbije dvojna vezi nenasičenih maščobnih kislin, na proste vezi pa se s pomočjo katalizatorjev veže vodik (Filip in Vidrih, 2010). *Trans* MK (posebno C18:1 izomere) povzročajo povišanje LDH (holesterola z nizko gostoto) v plazmi, znižajo raven varovalnega HDL, kar bistveno poveča tveganje za krvno-žilne bolezni (Lutter, 2005). Zato mora biti uživanje *trans* nenasičenih maščobnih kislin omejeno. World Health Organization priporoča kot maksimalni odmerek le 1% (cca. 2g/dan) *trans* maščobnih kislin dnevno (McCarthy, Barr in Sinclair, 2008). Zaradi tega se vsebnost *trans* maščobnih kislin obvezno označuje na embalažah živil. Filip in Vidrih (2010) navajata, da na tveganje srčno-žilnih bolezni bolj kot količina vpliva kakovost zaužitih maščob. V Kanadi in nekaterih evropskih državah zahtevajo, da se označi ne samo količina *trans* maščobnih kislin, temveč tudi vsebnost *cis*-(mono)nenasičenih maščobnih kislin, glede na skupni delež maščobnih kislin v živilu (Ratnayake, 2014).

## 2.4 Določanje skupnih *trans* maščobnih kislin

---

Metode določanja posameznih TMK za delo v šolskem laboratoriju so zelo kompleksne. V tabeli 3 so povzete do sedaj razvite metode (Glavič, 2012; Sandler, 2005).

---

<sup>16</sup> Novejša tehnologija že omogoča izdelavo margarin in maščobnih namazov, ki vsebujejo zelo malo *trans* maščobnih kislin. Nadomestili so jih rastlinski steroli in *omega*-3 maščobne kisline, ki imajo ugoden vpliv na zniževanje LDL holesterola (opomba avtoric).

TABELA 3. METODE DE DOLOČANJA TMK (GLAVIČ, 2012)

Metoda	Določanje	Prednosti	Slabosti
IR absorpcijska spektrometrija	skupne <i>trans</i> maščobne kisline	nizka cena; zanesljivi rezultati, če koncentracija <i>trans</i> izomerov presega 5%	nezanesljivi rezultati, če je koncentracija <i>trans</i> izomerov manjša od 5%; uporabljati moramo korekcijske faktorje
Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo	skupne <i>trans</i> maščobne kisline	zanesljivi rezultati, če je koncentracija <i>trans</i> izomerov manjša od 2%	ne razlikuje med dvema estroma z eno <i>trans</i> vezjo ter med enim estrom z dvema <i>trans</i> vezema in estrom z nobeno <i>trans</i> vezjo
plinsko-tekočinska kromatografija (GLC)	posamezne izomere <i>trans</i> maščobnih kislin		prisotnost neznanih komponent lahko privede do lažnih rezultatov
agentacijska kromatografija - GLC	posamezne izomere <i>trans</i> maščobnih kislin	nasičene, enkrat nenasičene, di nenasičene maščobne kisline	zamudna metoda
kapilarna kolona - GLC	posamezne izomere <i>trans</i> maščobnih kislin, ki jih lahko seštejemo in dobimo skupne <i>trans</i> maščobne kisline	natančna ločljivost estrov maščobnih kislin vključno s <i>cis</i> in <i>trans</i> izomerami	potrebno je veliko znanja in spretnosti za pripravo kolon in za razlago kromatogramov
tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	posamezne izomere <i>trans</i> maščobnih kislin	ločimo lahko <i>cis,cis</i> in <i>trans,trans</i> -dienojske maščobne kisline	
nuklearna magnetna resonanca (NMR)	posamezne izomere <i>trans</i> maščobnih kislin	analiziramo lahko celotne lipide; identificiramo lahko izomere <i>trans</i> -dienov z uporabo protona ( $^1\text{H}$ ) NMR	oprema je draga; uporablja se bolj za raziskave kot pa za splošne analize

Pri pregledu literature objavljene po letu 2012 smo opazili, da se ATR-FTIR spektroskopija lahko zelo uspešno uporablja za detekcijo TMK, v kolikor uspemo pripraviti ustrezno umeritveno premico s pomočjo standardov. Ker nam je ta metoda dela od letošnjega šolskega leta dostopna tudi v šolskem laboratoriju, smo se odločili, da jo bomo uporabili.

## 2.5 ATR-IR spektroskopija

IR spektroskopija je nedestruktivna tehnika, ki se lahko uporablja tudi za kvantitativno delo pri analizi maščob (Gullien in Cabo, 1997; van der Voort, 1994). *Trans* dvojne vezi lahko kvantificiramo s pikom okoli  $970\text{ cm}^{-1}$  (e.g. AOCS Official Method Cd 14-95). Pri tem lahko uporabimo površino ali višino vrha pri določenem valovnem številu (van der Voort, 1994). Najpomembnejši vrhovi za analizo nenasičenih maščobnih kislin so zbrani v spodnji preglednici.

*Cis* dvojna vez in dolžina ogljikovih atomov je lahko določena glede na jakost absorpcijskega vrha; podobno kot *trans*.

TABELA 4. VALOVNA ŠTEVILA, PRIMERNA ZA ANALIZO MAŠČOBNIH KISLIN.

Frekvenca (cm-1)	Kemijska vez
3025	=C-H ( <i>trans</i> )
3010	=C-H ( <i>cis</i> )
2955	-C-H (CH <sub>3</sub> )
23926	-C-H (CH <sub>3</sub> )
2855	-C-H (CH <sub>2</sub> )
1746	-C=O
1654/1658	-C=C- ( <i>cis</i> )
1465	-C-H (CH <sub>3</sub> , (CH <sub>2</sub> ))
1418	=C-H ( <i>cis</i> )
1377	-C-H (CH <sub>3</sub> )
1238	-C-O-, -CH <sub>2</sub> -
1163	-C-O-, -CH <sub>2</sub> -
1033	-C-O-
966	-HC=CH- ( <i>trans</i> )
914	-HC=CH- ( <i>cis</i> )
723	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -, -HC=CH- ( <i>cis</i> )

Med različnimi IR tehnikami je za študij posebno primerna metoda z oslavljenim odbojem (attenuated total reflectance) (ATR-IR). Slednja zaradi tesnega stika med preiskovanim substratom in ATR kristalom (v našem primeru diamant) omogoča snemanje spektrov z visoko intenziteto. ATR se pojavi, ko žarek sevanja vstopi iz gostejšega (višji lomni

količnik<sup>17</sup>) v manj gostejši medij (nižji lomni količnik) (Sherman Hsu, 1997). V tem primeru se IR žarki ne odbijejo samo od površine substrata, temveč prodrejo skozi preiskovano snov, kar še dodatno ojača signal (Tomšič, B. s sodel., 2007). Vzorec je po navadi postavljen v direktni stik z gostejšim kristalom, kot je npr. germanij ali cink selenid. IR žarek je usmerjen v rob ATR kristala, od koder se odbije skozi kristal z enim ali več odsevi. Število odsevov in globina prodiranja oz. penetracije se zmanjšata z večanjem vpadnega kota žarka. Če je razmerje med dolžino in debelino vzorca pri izbranem kotu višje, pride do večjega števila odsevov z ATR kristala (Sherman Hsu, 1997).

Ker je potrebno zelo malo ali skoraj nič pripravljanja vzorcev, je ATR ena izmed najbolj vsestranskih tehnik za jemanje in preizkušanje vzorcev. Med ATR-IR spektrom in navadnim IR spektrom je nekaj razlik; ena izmed njih je pozicije absorpcijskih delov so enake, razlikujeta pa se v relativni intenzivnosti določenega predela v obeh spektrih (Sherman Hsu, 1997).

## 2.6 Vpliv visokih temperatur in UV sevanja na sestavo olj

---

*Trans* maščobne kisline nastajajo pri visokih temperaturah (na primer pri cvrenju) in UV sevanju. Vpliv temperature se od olja do olja razlikuje, odvisno je od tega, kako občutljivo je na spremembo razmer (Tsuzuki, Matsuoka, Ushida, 2010).

Ultravijolično sevanje (UV) lahko spodbudi izomerizacijo *cis-trans* (oz. prehod iz enega v drug izomer). Za prehod je potrebna dovolj velika energija, ki pa jo molekula pridobi s pomočjo svetlobe. V vsakdanjem življenju je ta proces značilen za očesno mrežnico, kjer se nahaja spojina rodopsin. To je zelo velika molekula, kjer je na opsin oziroma na beljakovinski del vezan del z več dvojnimi vezmi - retinal (ena dvojna vez ima konfiguracijo *cis*, ostale pa *trans*) (Smrdu, 2012). Ko molekula absorbira foton svetlobe, lahko njeni elektroni preidejo v višje energijske orbitale. Molekula naredi prehod v višje energijsko stanje, s tem pa se  $\pi$  vezi v dvojni vezi raztrgajo in dopuščajo vrtljivost molekuli. Torej, ko 11-*cis*-retinal absorbira foton svetlobe v vidnem delu spektra (400-700 nm), se zaradi vrtljivosti med enajstim C-atomom in dvanajstim C-atomom spremeni struktura molekule in nastane retinal s *trans* dvojnimi vezmi (Casiday, 2000).

---

<sup>17</sup> razmerje med fazno hitrostjo razširjanja elektromagnetnega valovanja v praznem prostoru  $c$  in hitrostjo razširjanja v snovi  $v_f$ : (Wikipedia, povzeto 28. 12. 2015)



### 3 SESTAVA HLADNO STISKANEGA KONOPLJINEGA OLJA

Konopljino seme vsebuje več kot 30% olja in okoli 25% proteinov ter znatne količine prehranskih vlaknin, vitaminov in mineralov. Med MK je to je eden najbogatejših virov linolne (*omega-6*) in *alfa*-linolenske (*omega-3*) esencialne MK. Optimalno razmerje za človeka med *omega-6* : *omega-3* je med 2:1 in 3:1. V konopljinem olju je to razmerje 2,5:1. K dodatni prehranski vrednosti konopljinega olja svoj delež prispevata še *gama*-linolenska (*omega-6*) in stearidonska kislina (*omega-3*). Glavna proteina v konopljinem semenu sta *edestin* in *albumin*, ki ju organizem hitro prebavi in vsebujeta večje količine vseh esencialnih aminokislin (Callaway, 2004).

TABELA 5. MAŠČOBNE KISLINE V KONOPLJINEM OLJU (NUTRITIONAL COMPOSITION OF HEMP SEED AND OIL, 2015)

Nenasičene maščobne kisline	
Linolna kislina (18:2, <i>omega-6</i> )	54-57%
$\alpha$ -linolenska kislina (18:3, <i>omega-3</i> )	16-20%
$\gamma$ -linolenska kislina (18:3, <i>omega-6</i> )	2-4%
Stearidonska kislina (18:4, <i>omega-3</i> )	0.5-1.5%
Eikozanoinska kislina (20:1, <i>omega-9</i> )	0.5%
Oleinska kislina (18:1, <i>omega-9</i> )	10-13%
Nasičene maščobne kisline	
Palmitinska kislina (16:0)	6-7%
Stearinska kislina (18:0)	2-3%
Arahidinska kislina (20:0)	0.5-0.8%
Skupaj nasičene maščobne kisline	9-11%

GRAF 2. MAŠČOBNE KISLINE V RAZLIČNIH OLJIH OREŠČKOV IN SEMEN (NUTRITIONAL COMPOSITION OF HEMP SEED AND OIL, 2015)

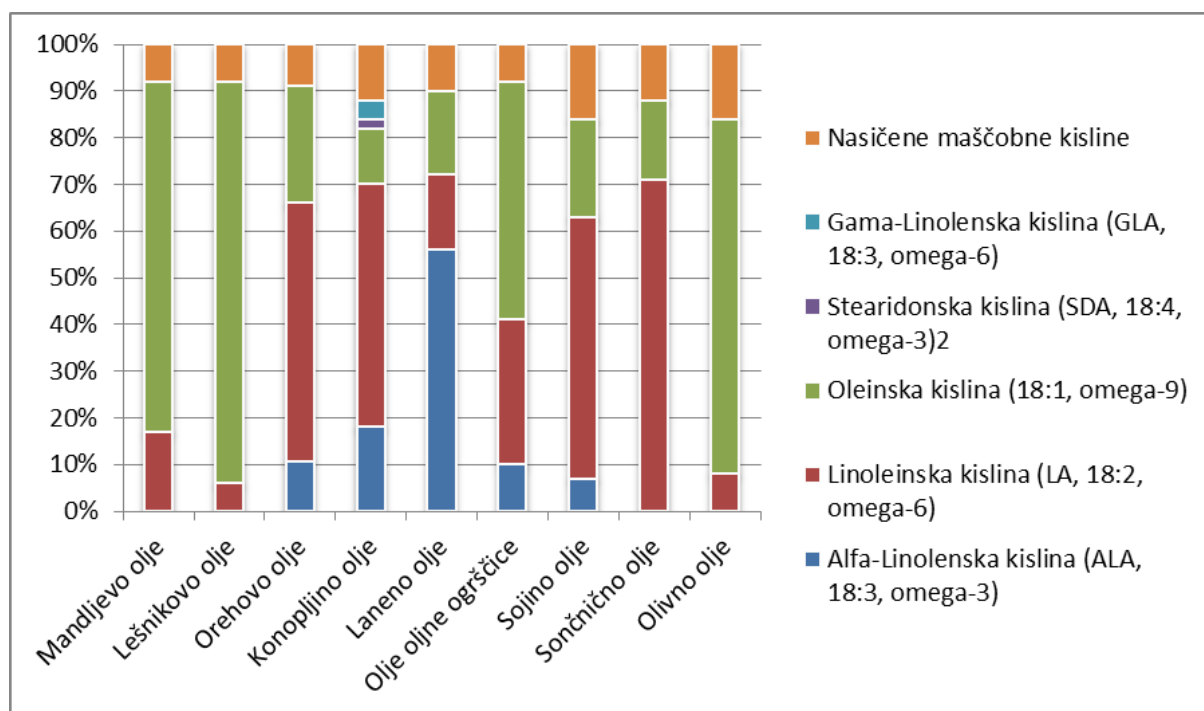


TABELA 6. VITAMINI IN MINERALI (MG/100G) V KONOPLJINIH SEMENIH VRSTE FINOLA (CALLAWAY, 2004)

Vitamins in minerals (mg/100g) v konopljinah semenih vrste Finola	
Tiamin (B1)	0.4
Riboflavin (B2)	0.1
Fosfor (P)	1160
Kalij (K)	859
Magnezij (Mg)	483
Kalcij (Ca)	145
Železo (Fe)	14
Natrij (Na)	12
Mangan (Mn)	7
Cink (Zn)	7
Baker (Cu)	2

### **3.1 Pridobivanje hladno stiskanega konopljinca olja**

---

Hladno stiskana olja izpodrivajo živalske maščobe, saj vsebujejo več nenasičenih maščobnih kislin tipa: *omega-3*, *omega-6*, *omega-9* in GLA (večkrat nasičena *gama*-linolenska maščobna kislina). So nujno potrebne za presnovo, telo pa jih ne proizvaja samo. Olje stiskajo iz konopljinca semen tako, da z vrtenjem vijakastega kovinskega dela stiskalnice iztisnejo večji del olja in ga ločijo od ostankov semen oz. od oljnih pogač. Stiskanje olja mora potekati v zaprtem prostoru brez kisika, da ne pride do oksidacije (hemp.com, povzeto 28.12.2015) Pri stiskanju in mletju nastaja toplota, ki ne sme presegati 49°C (120°F), da lahko olje še vedno opredelimo kot hladno stiskano. Takšna olja so zelo kakovostna, saj ohranijo okus, aromo in hranilne vrednosti semen (The George Mateljan Foundation, povzeto 28.12.2015)

## 4 PRAKTIČNI DEL

### 4.1 OPIS VZORCEV OLJA

TABELA 7. OPIS VZORCEV OLJA.

Oznaka vzorca	Organoleptične lastnosti (barva, okus, vonj)	Proizvajalec (leto proizvodnje) in druge značilnosti
Konopljinno olje 1	Svetlo zelena barva, močan vonj po konoplji, značilen okus po oreščkih.	Vegafit d.o.o., 2014
Konopljinno olje 2		Organic Oils Italia S.r.l., 2014
Konopljinno olje 3		Oljarna Fram d.o.o., 2015
Konopljinno olje 4		BATON d.o.o., 2013

### 4.2 DOLOČANJE MAŠČOBNO KISLINSKE SESTAVE PRED IN PO SEGREVANJU TER OBDELAVI Z UV SVETLOBO

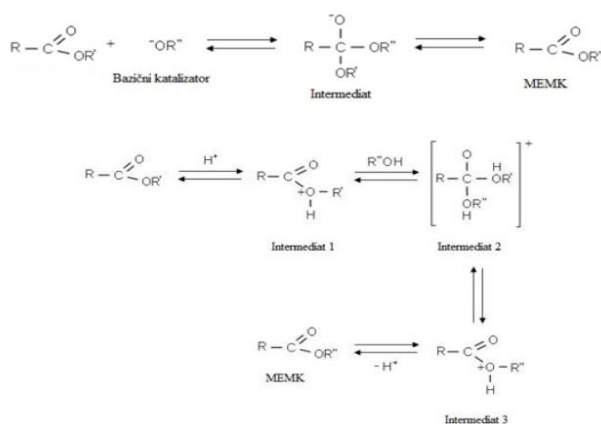
Za določitev maščobno kislinske sestave smo v preiskovanih oljih uporabili kombinacijo plinske kromatografije z masno detekcijo. Ker te aparature na šoli nimamo, smo v šolskem laboratoriju pripravili vzorce (metilne estre) ter računski del, spektri pa so bili posneti na Univerzi. ATR FTIR analizo ter vso ostalo lab. delo smo v celoti izvedli v šol. laboratoriju.

Kemikalije: NaOH(s) (Merck, p.a.); metanol (Merck, p.a.); diklorometan (Merck, p.a.); BF<sub>3</sub> (14% metanolno raztopina, p.a., Sigma Aldrich); heksan (Merck, p.a.)<sup>18</sup>; 2-krat deionizirana voda (šolski laboratorij); standardna zmes metilnih estrov maščobnih kislin (C4-C24, Supleco (ZDA)) - FAMA.

Literatura navaja različne možnosti določanja maščobno kislinske sestave. Običajno je to plinska kromatografija (Zhang s sodel., 2014). Ker pa so maščobne kisline nehlapne, jih moramo pretvoriti v bolj hlapne snovi, kar so estri maščobnih kislin (Park, 1994). Za reakcijo estrenja se kot alkohol običajno uporablja metanol, reakcija pa je lahko kislinsko ali bazično katalizirana. Tako lahko dobimo metilne estre MK (v nadaljevanju MEMK). V raziskavi smo se odločili za kombinacijo obojega, pri čemer smo kot bazični katalizator uporabili NaOH in kot kislino 14% metanolno raztopino borovega trifluorida. Razlog za takšno odločitev leži v dejstvu, da pri bazični reakciji reagirajo samo že zaestrene MK in je reakcija hitra, pri čemer ne gre za saponifikacijo, saj voda ni prisotna, reakcija pa poteka že pri sobni temperaturi (Hall, 2012; Teale, 2005; Weston s sodel., 2014). Če v nadaljevanju dodamo 14% BF<sub>3</sub> poteče

<sup>18</sup> Ker je zelo toksičen in hlapen, kemikalijo ves čas hranimo v hladilniku (opomba avtoric).

zaestritev še preostalih (večinoma prostih) MK (Hall, 2012), istočasno pa kot stranski produkt ne nastane voda. Celoten mehanizem reakcije prikazan na sliki spodaj.



SLIKA 9. PRIKAZ BAZIČNO IN KISLINSKO KATALIZIRANE REAKCIJE (PRIREJENO PO HALL, 2012).

Tako pripravljene estri so bili analizirani s plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (GC-MS). Vsi podatki so bili obdelani v Excelu.

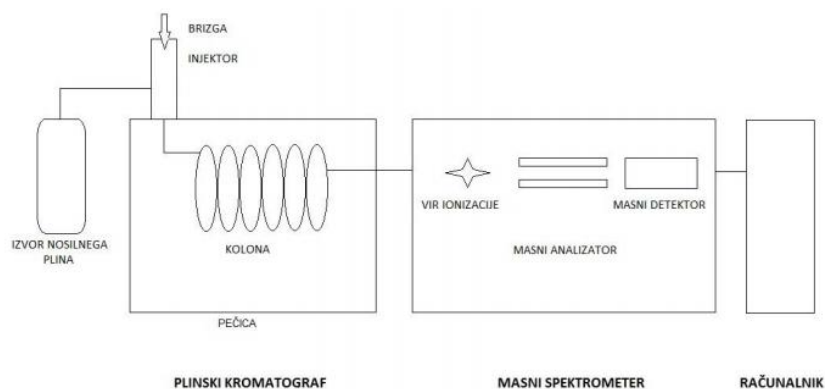
#### 4.2.1 OPIS PRIPRAVE IN EKSTRAKCIJE ESTROV

V 2mL centrifugirko smo natehtali cca. 10 mg vzorca, z mikropipeto dodali 10 $\mu$ L diklorometana (Merck, p.a.) in 200  $\mu$ L 0,5M metanolne raztopine NaOH. Zaprto centrifugirko smo za 10 min dali v vodno kopel (90°C,  $\pm$ 2°C). Po ohlajanju smo v zmes dodali 200 $\mu$ L 14% BF<sub>3</sub> (metanolna raztopina) ter zaprto centrifugirko še enkrat za 10 min položili v vodno kopel. Nato smo zmes ohladili na sobno temperaturo. Sledila je ekstrakcija MEMK.

V centrifugirko smo dali 1 mL heksana in z mikropipeto dodali 0,200 mL deionizirane vode. Estre smo v centrifugu (Humax14k) pri 3500 rpm stresali 1 min. Po ločitvi vodne in organske faze, smo vodno fazo prenesli v vialo za analizo z GC-MS, ki je bila opravljena na Univerzi.

#### 4.2.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROSKOPIJO

Plinska kromatografija z masno spektroskopijo omogoča ločevanje komponent v zmesi ter njihovo identifikacijo. Aparatura je shematično predstavljena na sliki 10.



SLIKA 10. SHEMA APARATURE: GC-MS (POVZETO PO HOFFMAN IN STROOBANT, 2007).

1 $\mu$ L vzorca (MEMK) smo injicirali v injektor, kjer se je najprej uparil in nato skupaj z mobilno fazo (nosilni plin je helij s pretokom 1.00mL/min) potoval po koloni s stacionarno fazo (kapilarna dimetilpolisiloksanska kolona (30m x25mm)). Molekule so glede na polarnost in molsko maso različno hitro potovale skozi kolono, zato kot rezultat dobimo različne zadrževalne (retencijske) čase ( $t_R$ ). Identifikacijo prisotnih spojin opravi masni spektrometer. Ko vzorec pride iz kolone plinskega kromatografa, je najprej izpostavljen ionizacijskemu viru. Ta povzroči ionizacijo molekul (pravilo z nabojem 1+), ki nato potujejo skozi masni spektrometer; na masnem detektorju so delci ločeni glede na njihovo razmerje med maso in nabojem. Detektor električni signal pretvori v ustrezen zapis na zaslonu. Računalniški program omogoča interpretacijo in obdelavo podatkov (Hoffman, Stroobant, 2007).

Čas analize: 30 min. Temperaturni program: 3°C/min (od 160 do 250 °C).

## 5 REZULTATI

---

---

### 5.1 GC-MS podatki

---

Najprej smo posneli spekter standarda FAMA (glej prilogo 2). Nato smo posneli spektre metilnih estrov vzorcev MK. Sledila je primerjava retencijskih časov za izbrane MK. Kvantitativna opredelitev je bila izvedena na osnovi površine pod krivuljo vrha in izražena v odstotkih (%) ter podana kot odstotek MEMK glede na skupno vsoto maščobnih kislin v vzorcu. Izračun prikazuje enačba 1.

$$P_{Ai} = (Ai / \Sigma Ai) \cdot 100 \%$$

Enačba 1.

Kjer je:

- $P_{Ai}$ ..... odstotek spojine  $i$  glede na vse spojine
- $A_i$ ..... površina vrha  $i$
- $\Sigma A_i$ ...vsota površin vseh vrhov

Ker smo se v hipotezah omejili le na tri nenasičene maščobne kisline, to je linolno, linolensko in oleinsko kislino, so podatki v preglednicah in grafih zabeleženi le ta za te MK. Analiza vseh štirih vzorcev konopljinih olj je pokazala, da je med nenasičenimi MK v vzorcih še elaidinska kislina (pod 2%), med nasičenimi pa prevladujeta palmitinska in stearinska kislina.

TABELA 8. DELEŽI LINOLNE LINOLENSKE IN OLEINSKE KISLINE V SVEŽIH VZORCIH, PO SEGREVANJU IN PO UV SEVANJU.

	<b>Konopljino olje</b>											
	Vzorec 1			Vzorec 2			Vzorec 3			Vzorec 4		
Maščobna kislina	Sveže olje	Po segrevanju (240°C)	Po UV sevanju (150 min)	Sveže olje	Po segrevanju (240°C)	Po UV sevanju (150 min)	Sveže olje	Po segrevanju (240°C)	Po UV sevanju (150 min)	Sveže olje	Po segrevanju	Po UV sevanju (150 min)
Linolna kislina (%)	54,07	38,12	50,23	54,15	39,43	46,76	52,20	38,01	41,12	51,87	38,52	40,88
$\alpha$ -linolenska kislina (%)	16,60	14,20	14,46	18,75	18,92	18,01	19,22	17,23	17,85	19,21	18,05	18,63
Oleinska kislina (%)	9,26	8,13	8,44	10,74	9,23	9,64	10,07	9,08	9,99	10,56	9,68	9,87
Skupaj	79,93	60,54	73,13	83,64	67,57	74,41	81,49	64,32	68,96	81,64	66,25	68,38

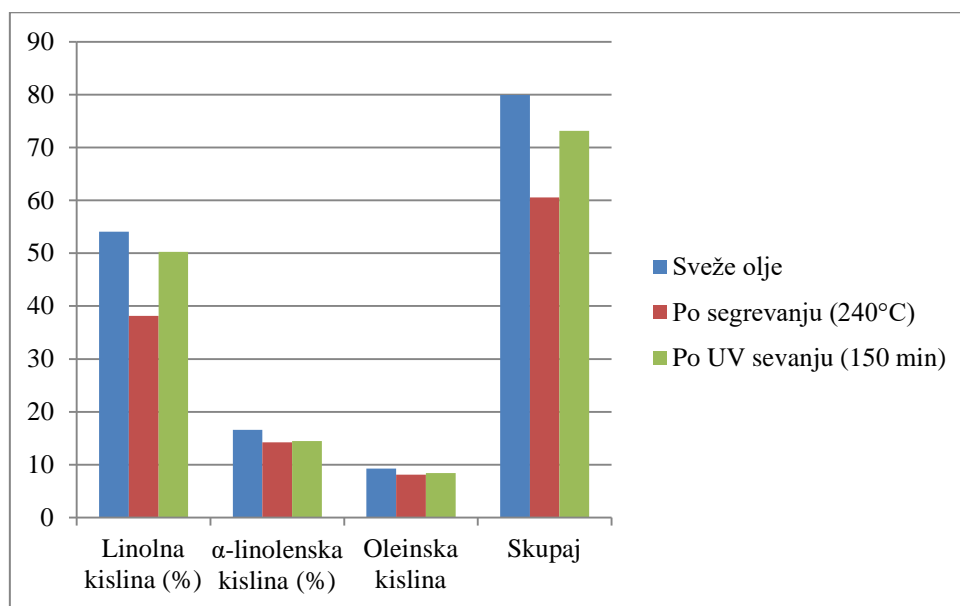
Iz tabele 8 je razvidno, da so razmerja med linolno in  $\alpha$ -linolenska kislino med vzorci različna; gibljejo sem med 3,2:1 (vzorec 1), 3,5:1 (vzorec 2), 2,6:1 (vzorec 3 in 4). Vzorca olj 3 in 4 sta s prehranskega vidika najugodnejša.



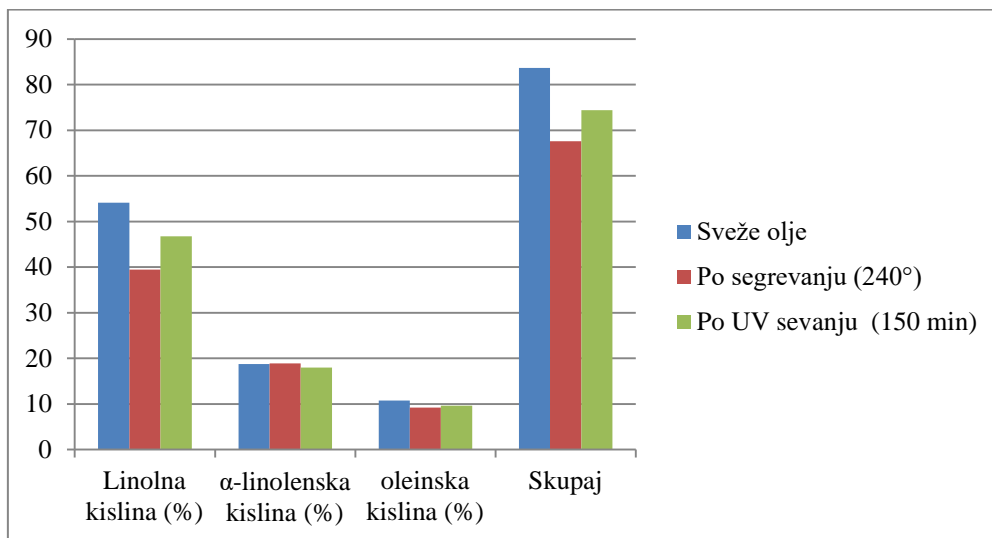
Kot vidimo iz tabele 8, je opazna precejšnja razlika v sestavi preučevanih olj. Analiza kaže, da so vsa konopljna olja bogata s tremi preiskovanimi maščobnimi kislinami (linolno,  $\alpha$ -linolensko in oleinsko kislino). Kot je bilo pričakovati, prevladuje linolna kislina, katere vrednost se giblje med 54,07% in 51,87%; sledi ji  $\alpha$ -linolenska kislina, z deležem med 16,60% in 19,22%. V vzorcih konopljinih olj je med preučevanimi najmanjši delež oleinske kisline (od 9,26 do 10,74%). Ti podatki se dobro ujemajo s podatki iz literature (Callaway, 1999). Skupni delež teh treh maščobnih kislin predstavlja med 79,93% in 81,64% vseh nenasičenih maščobnih kislin v preučevanih vzorcih.

Analiza vzorcev po 60 minutnem izpostavljanju temperaturam 240°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) je pokazala, da se je delež NMK bistveno zmanjšal. V poprečju med 10 in 20%, vendar spet ne pri vseh vzorcih enako.

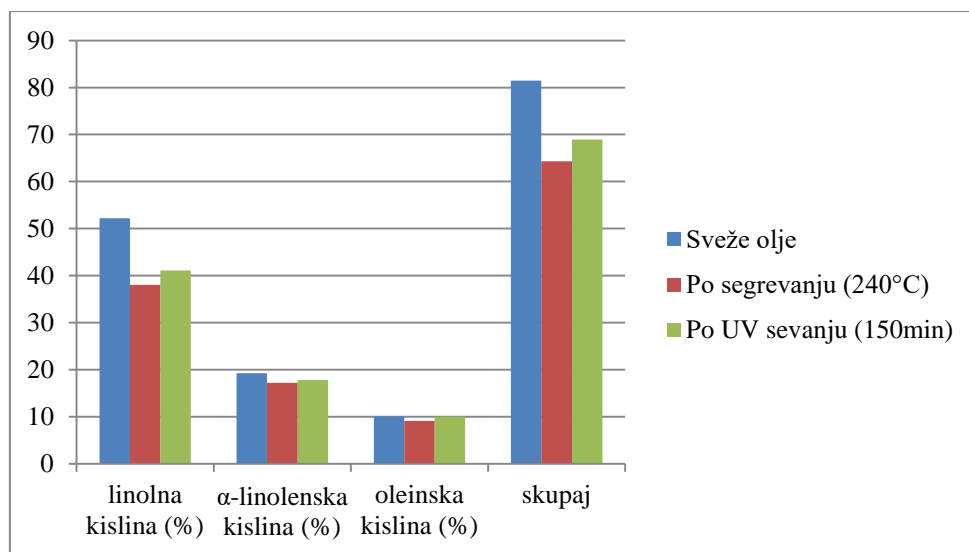
GRAF 3. SPREMINJANJE VREDNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN V KONOPLJINEM OLJU 1.



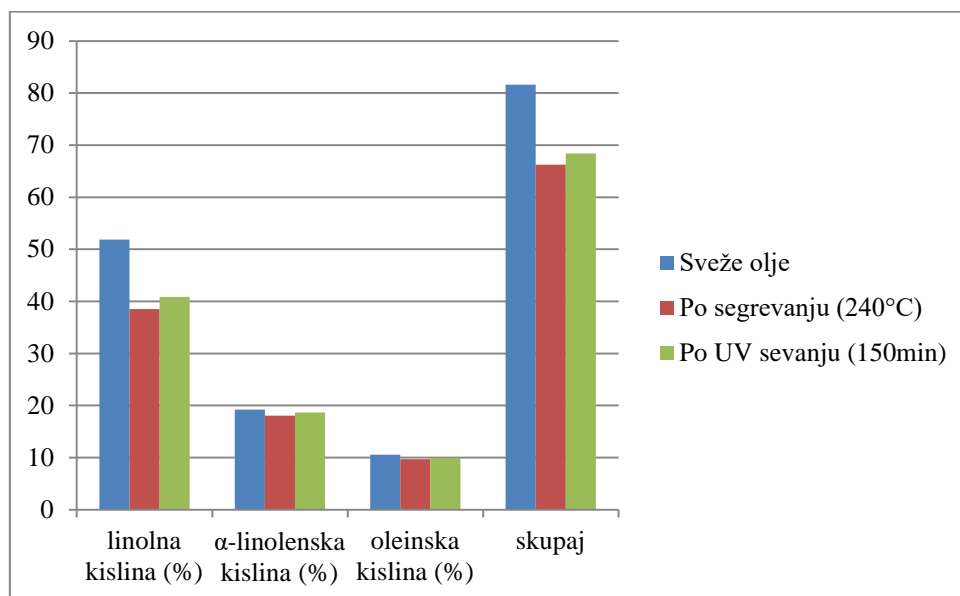
GRAF 4. SPREMINJANJE VREDNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN V KONOPLJINEM OLJU 2.



GRAF 5. SPREMINJANJE VREDNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN V KONOPLJINEM OLJU 3.



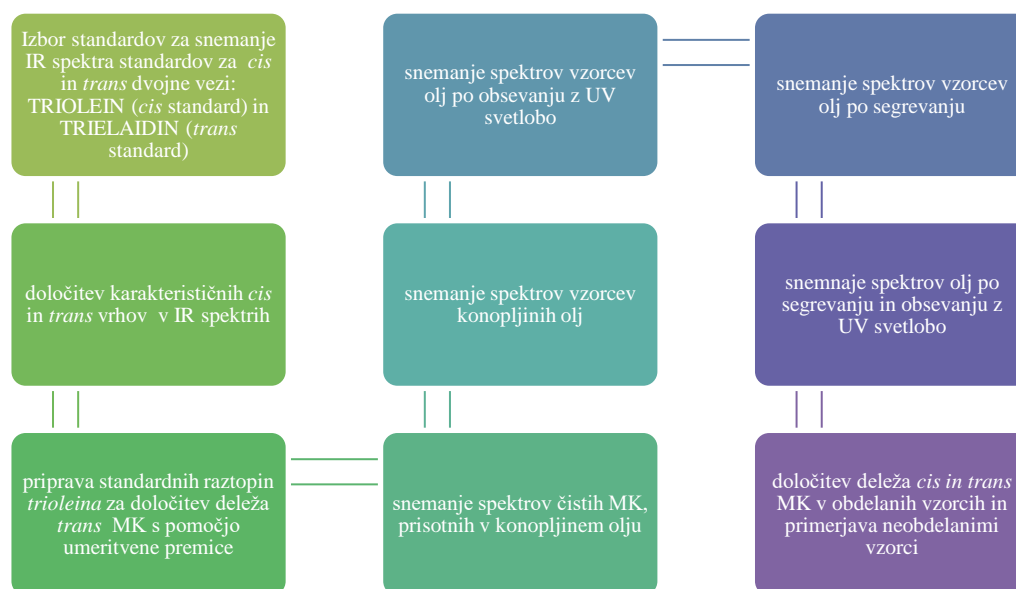
GRAF 6. SPREMINJANJE VREDNOSTI MAŠČOBNIH KISLIN V KONOPLJINEM OLJU 4.



Največje zmanjšanje beležimo pri vzorcu 1 (19,43%) in vzorcu številka 4 (15,39%). Sledi vzorec številka 3 (17,17%) in najmanj vzorec številka 2 (14,07%). Največji padec opazimo pri linolni kislini (2-krat nenasičena MK), najmanjši pa pri oleinski kislini (1-krat nenasičena MK). Proces segrevanja olj do tako visokih temperatur sproži oksidacijo maščob, ki pomeni razgradnjo MK; nastanek nestabilnih peroksidov in hidroksiperoksidov, ki v nadaljevanju razpadejo na aldehide, alkohole in druge hlapne ogljikovodike, to spremeni vonj olja (Dolenc, 2010), kar zelo hitro zaznamo kot t.i. »žarkost olja«. Lastnosti žarkega olja so odvisne od sestave olja, saj ta vpliva na sestavo razgradnih produktov, ki nastajajo v olju. Pri linolni kislini sta glavna razgradna produkta heksanal in hepta-2,4-dienal; pri linolenski kislini sta to heks-3-enal in deka-2,3,4-dekatrienal (Horvat, 2014).

Iz tabele 8 je razvidno, da je imelo izpostavljanje vzorcev olj UV sevanju (220-230 nm) na vse vzorce olj podoben učinek vendar v manjšem obsegu kot pri segrevanju. Pri vzorcu 1 je po segrevanju do 240°C prišlo do spremembe v vrednosti skupnih maščobnih kislin za 19,39%, medtem ko je pri UV sevanju prišlo do zmanjšanja za le 6,8%. Podoben trend je bil opažen tudi pri drugih vzorcih. Pri vzorcu 2 je med segrevanjem prišlo do 16,07% spremembe, med UV sevanjem pa do 9,23% spremembe. Tudi pri vzorcu 3 se je največja sprememba zgodila med segrevanjem, in sicer za 17,17%, med obsevanjem pa za 12,53%. Pri vzorcu 4 je med obsevanjem skupna vrednost maščobnih kislin padla za 13,26%, med segrevanjem pa za 15,39%

Ali se v tem procesu zgodi tudi izomerizacija? Na to vprašanje smo poskušali odgovoriti z ATR FT-IR spektroskopijo in delom, ki ga prikazuje organigram spodaj.



SLIKA 11. ORGANIGRAM DRUGEGA DELA NALOGE.

## 5.2 IR spektri standardov

Standardi za umeritveno krivuljo so bili: trielaidin (TE; Sigma-Aldrich, 99%) in triolein (TO; Sigma-Aldrich), čistoče 99%. Analitska tehnika je omogočala tehtanje do 0.0001 g natančno (Kern).

Da bi lahko določili, katera komponenta v sestavi konopljinega olja je prispevala največji delež k izomerizaciji (pretvorba *cis* v *trans*), smo visokim temperaturam in UV-A sevanju izpostavili tudi čiste snovi: oleinsko kislino (OK; Sigma-Aldrich, 65-88%), linolno kislino (LK; Sigma-Aldrich, 60-74%) in glicerol-trioleat (TO; Sigma-Aldrich, 65%)-standard za *cis* vez.

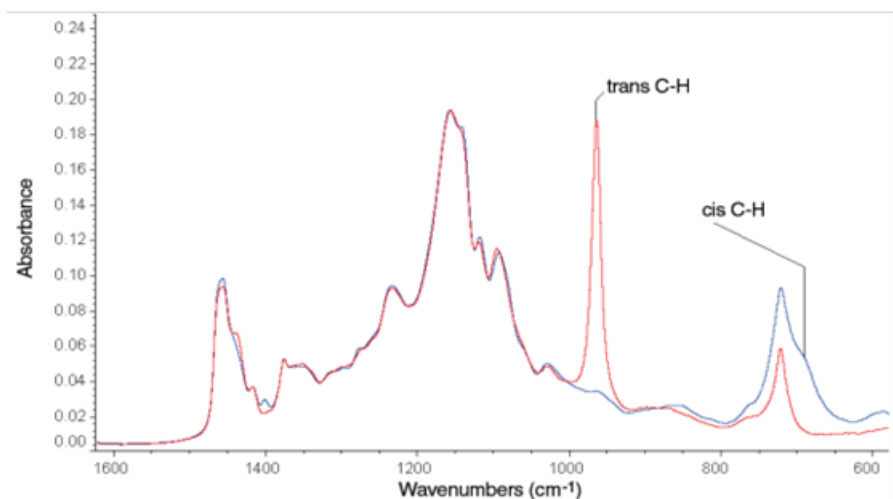
Analiza podatkov je bila mogoča s pomočjo regresijske analize (uporabe prvega ali drugega odvoda), saj se vrhovi v spektrih lahko prekrivajo. Odvodi za posamezne intervale so v grafu prikazani kot odvisnost višine vrha pri  $966\text{ cm}^{-1}$  (y-os) proti koncentraciji standarda izraženo v odstotkih (%) (x-os). Vendar smo kasneje uporabili

samo običajen Beer- Lambertov zakon v kombinaciji z površino signala pod izbranim vrhom ( $966\text{ cm}^{-1}$ ), saj bilo ujemanje dovolj veliko.

Diamantni kristal ATR nastavka smo vsakokrat očistili z propan-2-olom (Sigma-Aldrich, p.a.) ter papirnato brisačo.



SLIKA 12. PERKIN ELMER SPECTRUM TWO.



SLIKA 13. ATR IR SPEKTER TRIELAIDINA (100%) *TRANS* (rdeče) IN TRIOLEIN (100%) *CIS* (modro) (SHIMADZU, 2015).

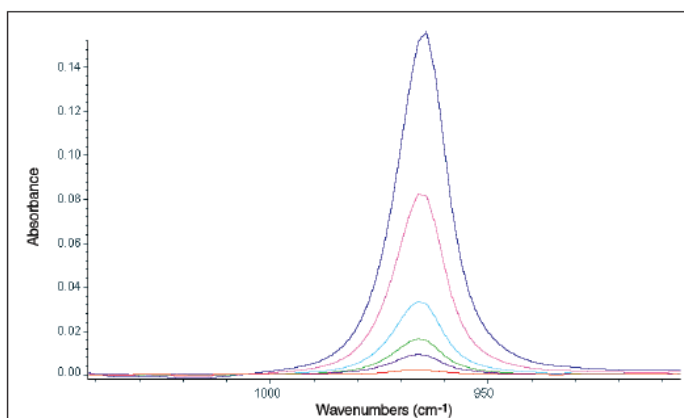
Umeritvena krivulja je bil pripravljena s trielaidinom v oleinski kislini: 0,50%, 1,0%, 2,0%, 5,0% in 10,0%. Iz posnetih spektrov standardnih raztopin smo za izris umeritvene krivulje izbrali le vrh pri  $966\text{ cm}^{-1}$ .

### 5.3 Priprava umeritvene krivulje za določanje *trans* geometrijske oblike

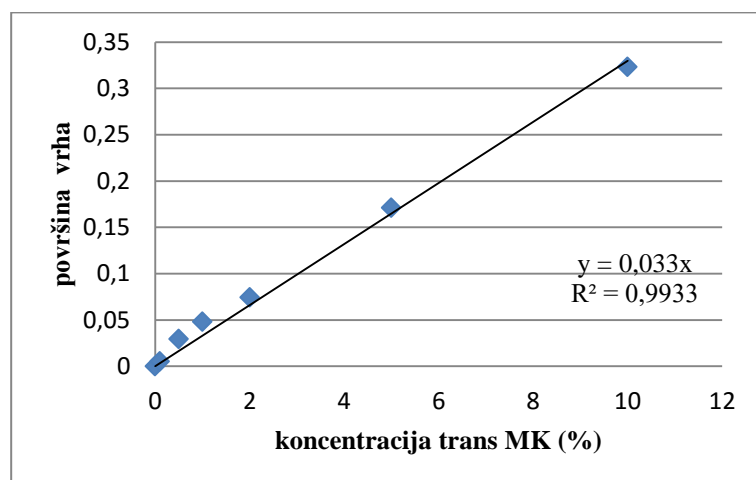
TABELA 9. REZULTATI MERITEV ABSORBANCE ZA STANDARDNE RAZTOPINE TRIELAIDINA V OLEINSKI KISLINI.

Koncentracija trielaidina (%)	Absorbanca	površina vrha pri 966 cm <sup>-1</sup> (+/-1 cm <sup>-1</sup> )
0,0	0,0001	0
0,10	0,0049	0,0050
0,50	0,0252	0,0292
1,0	0,0357	0,0481
2,0	0,0412	0,0742
5,0	0,0652	0,171
10,0	0,1487	0,323

GRAF 7. VIŠINA VRHA PRI 966 cm<sup>-1</sup> V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE TRIELAIDINA.



GRAF 8. UMERITVENA PREMICA ZA *TRANS*-MAŠČOBNE KISLINE (ATR - FTIR SPEKTROSKOPIJA).



Enačba:  $y = 0,033x$  je bila uporabljena za izračun deleža TMK pri obdelavi vzorcev konopljinega olja z UV svetlobi in povišanimi temperaturami.

#### 5.4 Segrevanje vzorcev konopljinega olja in čistih snovi

Pred segrevanjem vzorcev olja in čistih snovi smo določili temperature, do katerih bomo segrevali vzorce. Te temperature so bile: 100°C, 150°C, 200°C in 240°C. Vsakega od sedmih vzorcev smo razporedili v štiri čaše in jih označili, tako da smo skupaj imeli 28 čaš. Čaše smo prekrili z aluminijasto folijo, ki je preprečila vdor dnevne svetlobe in izhajanje toplote. Vzorce smo razporedili na štiri grelne plošče (Wisd WiseStir MSH-200) ter pričeli s segrevanjem na določeno temperaturo. V vzorec 4 smo dali tudi termometer, s katerega smo odčitavali temperaturo. Vzorce smo segreli do določene temperature, nato pa vzdrževali to temperaturo, dokler ni preteklo 30 minut. Po 30 minutah smo vzorce odstranili s toplote, odstranili aluminijasto folijo in pustili, da se vzorci ohladijo. Nato smo posneli spektre, vzorce ponovno prekrili z aluminijasto folijo in jih segrevali na isti temperaturi še dodatnih trideset minut ter tako preverili, ali ima na spremembe vpliv tudi čas segrevanja. Vzorce smo ponovno odstranili s plošče, jih ohladili in posneli spektre.



SLIKA 14. SEGREVANJE VZORCEV (VIR: LASTEN).

### **5.5 Obsevanje vzorcev olja in čistih snovi z UV-A svetlobo valov dolžine 230-240 nm**

---

Najprej smo digestorij prekrili z aluminijasto folijo, ki je preprečila vdor dnevne svetlobe in nudila zaščito za oči. UV-A luč smo pripeli na dve stojali tako, da je bila UV-A svetloba od vzorcev olj oddaljena 20 cm. V označene čaše smo dali nekaj 50 mililitrov vzorca konopljinca olja ter čaše postavili na stojalo, ki smo ga predhodno prav tako prekrili z aluminijasto folijo. Vzorce smo obsevali v časovnih intervalih po 30 minut. Po tridesetih minutah smo posneli spekter vsakega vzorca, vse čaše spet vrnili v digestorij, ter nadaljevali z obsevanjem. Postopek smo ponovili petkrat, tako da so bila olja vse skupaj obsevana 150 minut.



SLIKA 15. OBSEVANJE VZORCEV 1 (VIR: LASTEN).





SLIKA 16. OBSEVANJE VZORCEV 2 (VIR: LASTEN).

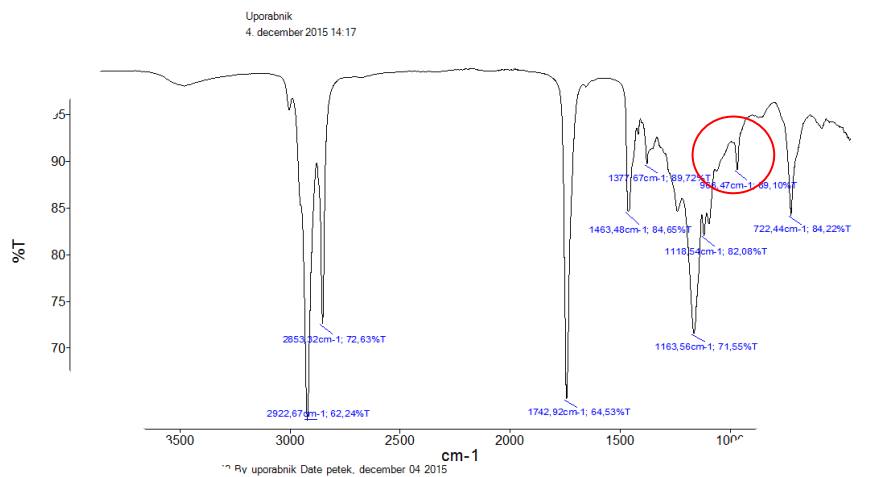


SLIKA 17. OBSEVANJE VZORCEV 3 (VIR: LASTEN).

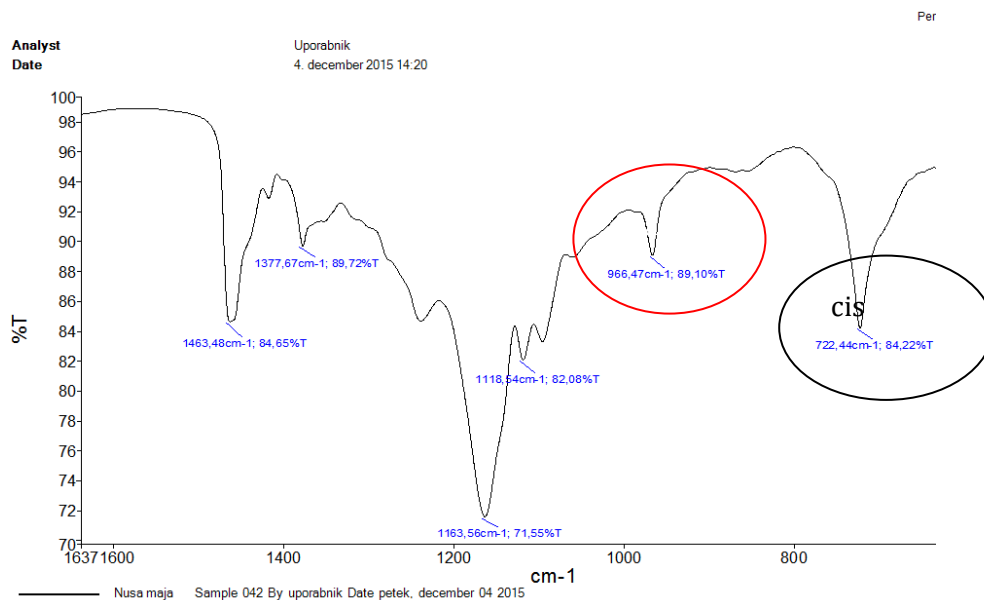


Slika 18. OBSEVANJE VZORCEV 4 (VIR: LASTEN).

## 5.4 Spektri standardov in vzorcev olja pred segrevanjem ali obsevanjem z UV-A svetlobo

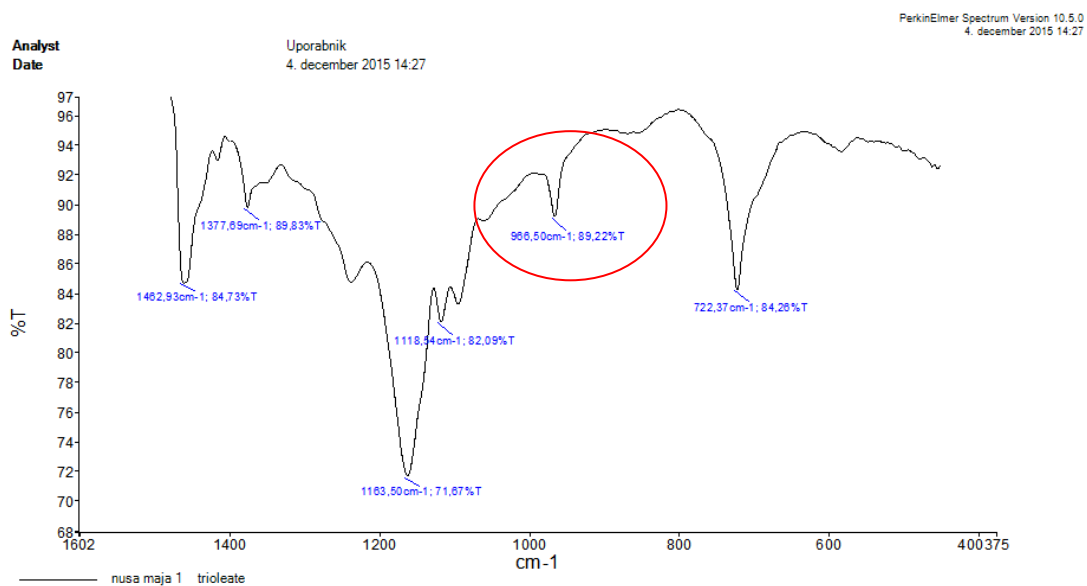


SLIKA 19. IR SPEKTER LINOLENSKE KISLINE PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM.



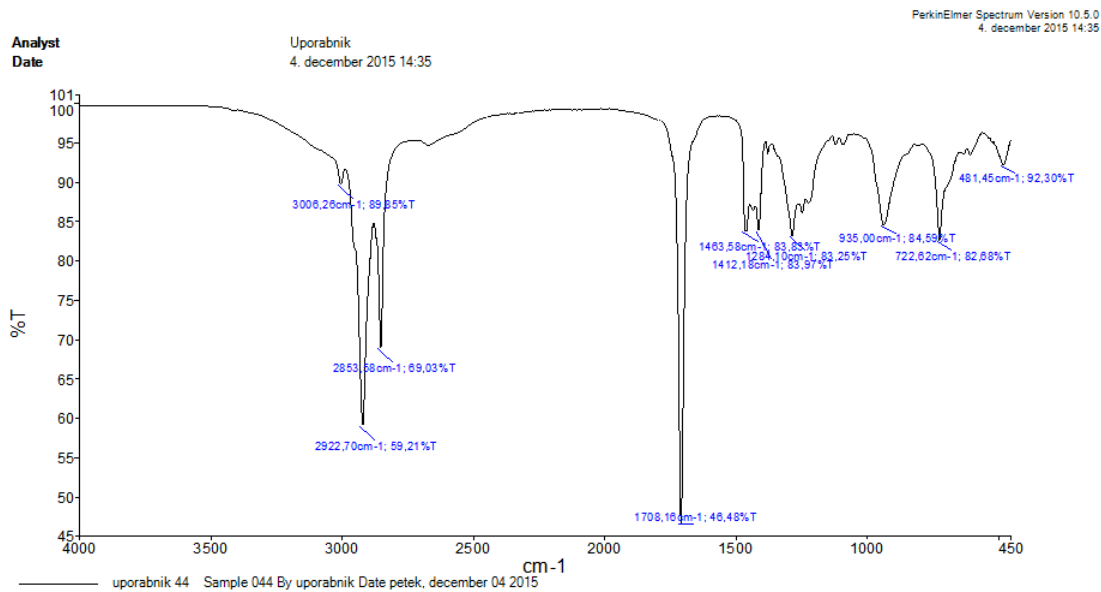
SLIKA 20. PRIBLIŽAN SPEKTER LINOLENSKE KISLINE PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM.

Iz slike 19 in 20 vidimo, da je v linolenski kislini že pred segrevanjem ali obdelavo bil prisoten tudi delež *trans* vezi, vendar je signal za *cis* veliko močnejši. Sklepamo lahko, da kemikalija, ki naj bi bila čista *cis* izomera to dejansko ni bila več. Podobno sliko je pokazal tudi spekter za glicerol trioletat (standard za *cis*). Približan spekter pokaže šibek signal pri  $966,5\text{ cm}^{-1}$ .

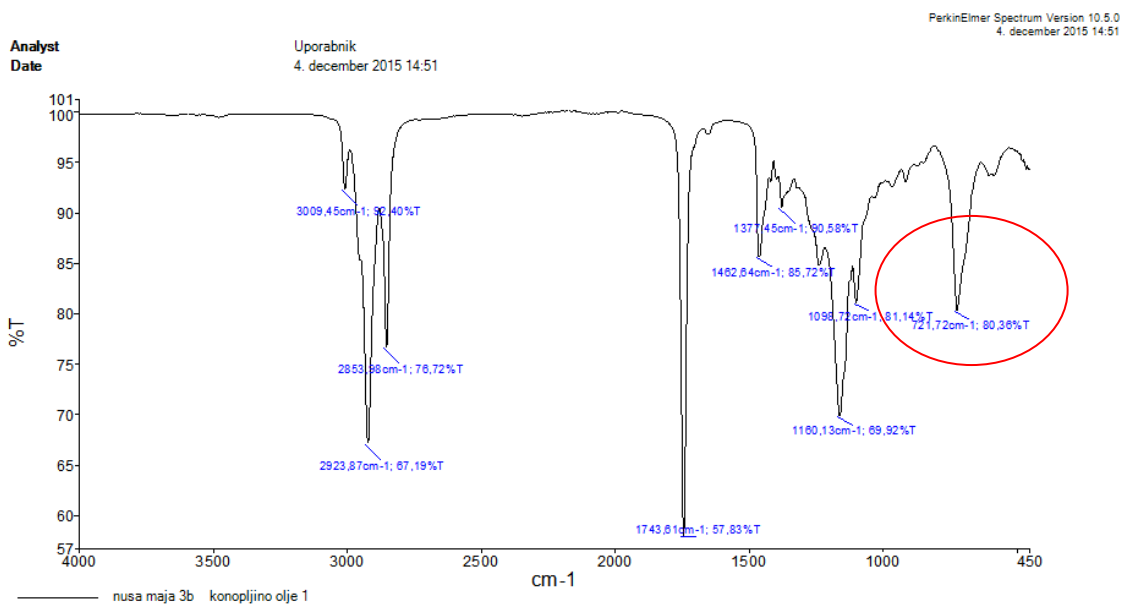


SLIKA 21. SPEKTER GLICEROL TRIOLEATA (TO) PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM.

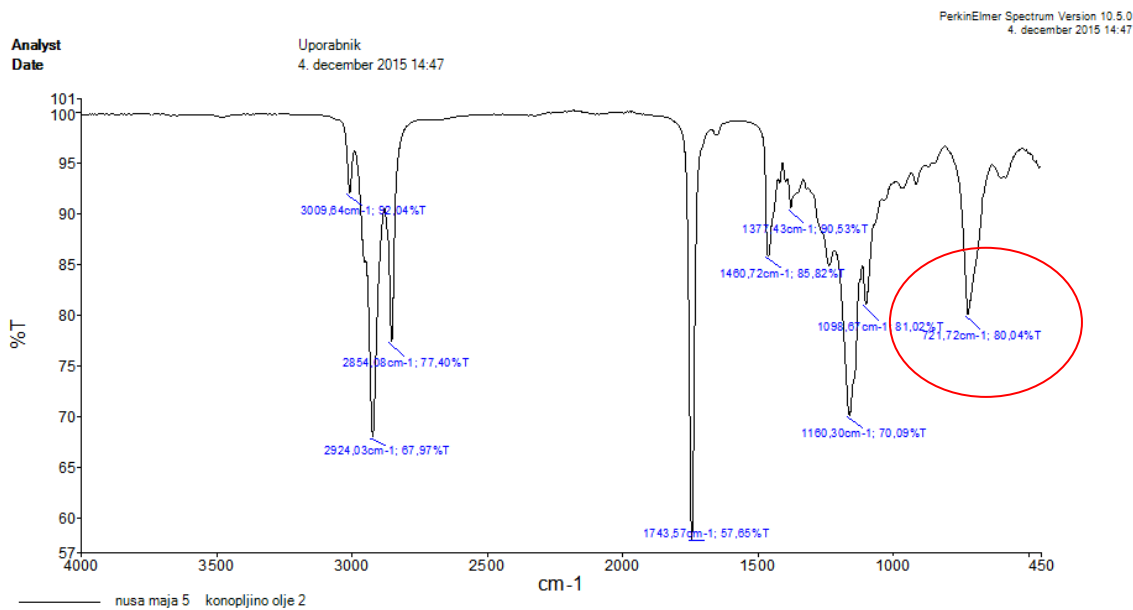
Za oleinsko kislino in vse vzorce preučevanih konopljinih olj iz spektrov (slike od 22 do 26) vidimo, da signala za *trans* obliko ni, pač pa vsi spektri imajo značilen signal za *cis* obliko ( $721\text{-}722\text{ cm}^{-1}$ ).



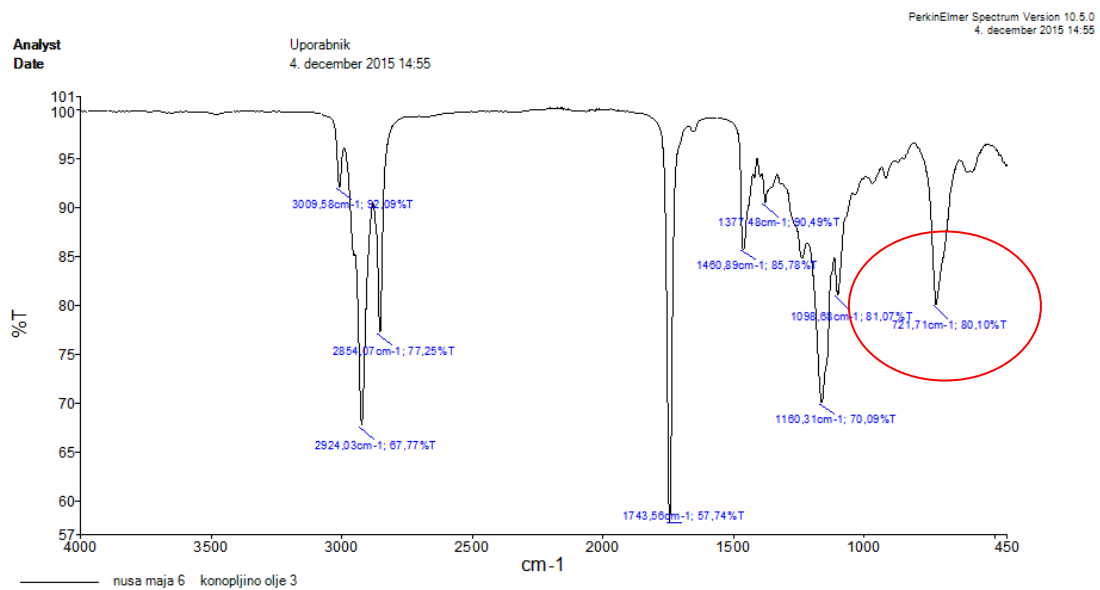
SLIKA 22. IR SPEKTER OLEINSKE KISLINE PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM.



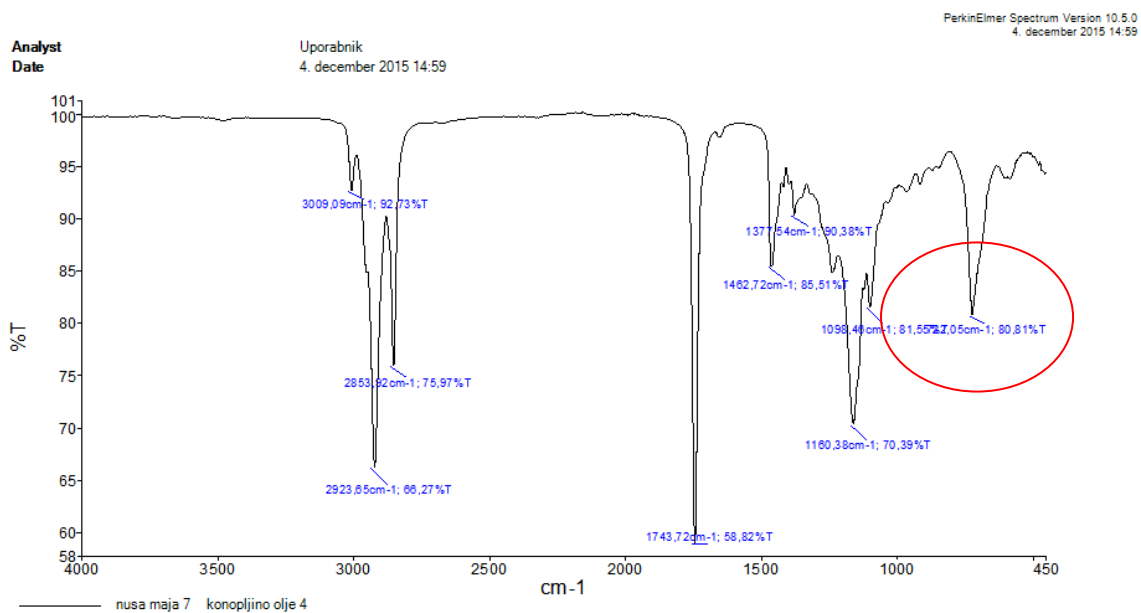
SLIKA 23. VZOREC KONOPLJINEGA OLJA 1 PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM.



SLIKA 24. VZOREC KONOPLJINEGA OLJA 2 PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM.



SLIKA 25. VZOREC KONOPLJINEGA OLJA 3 PRED SEGREVANJEM ALI OBSEVANJEM.



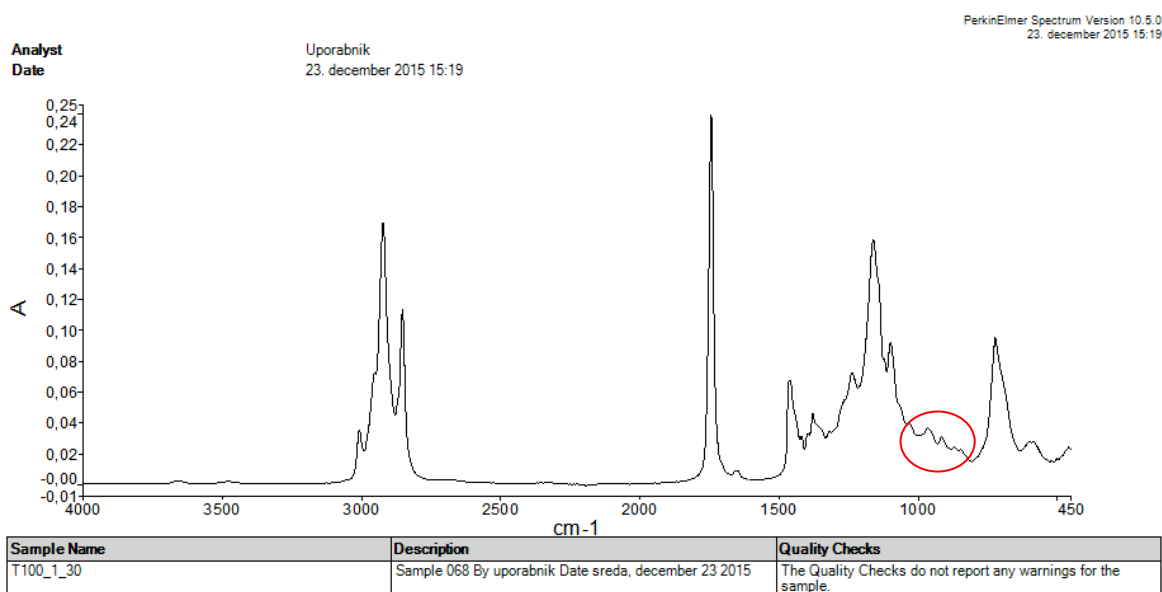
SLIKA 26. VZOREC KONOPLJINEGA OLJA 4 PRED SEGREVANJEM IN OBSEVANJEM.

## 5.5 IR spektri standardov in vzorcev olja po segrevanju

### 5.5.1 Konopljino olje 1

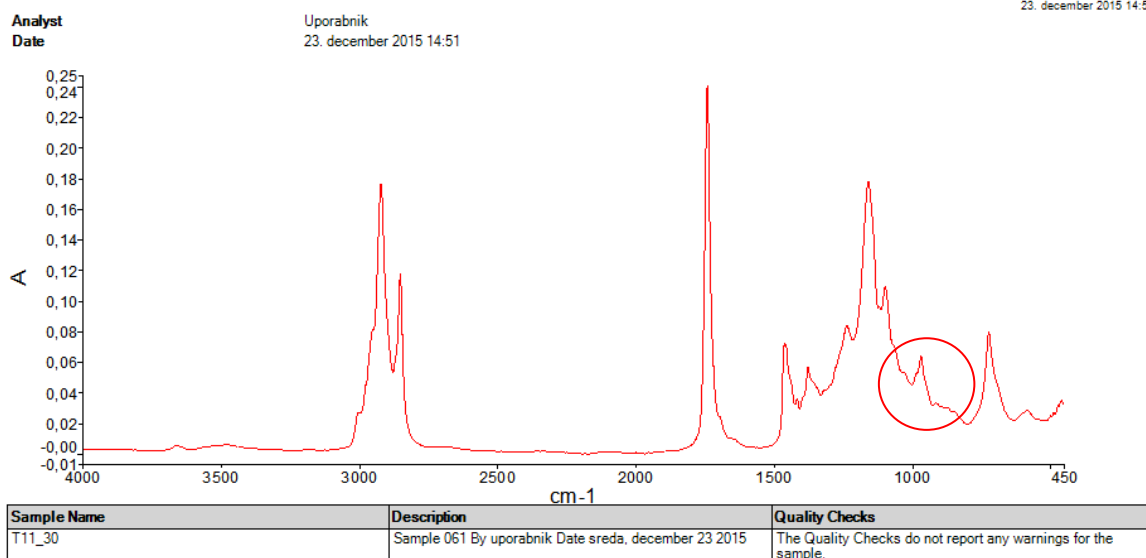
TABELA 10. KONOPLJINO OLJE 1 PO SEGREVANJU.

Temperatura $\pm 5^{\circ}\text{C}$	Absorbanca pri $966\text{ cm}^{-1}$	
	30 minut ( $\pm 1\text{ min}$ )	60 minut ( $\pm 1\text{ min}$ )
100°C	0.0365	0.0357
150°C	0.0488	0.0557
200°C	0.0491	0.0575
240°C	0.0637	<sup>19</sup>



SLIKA 27. KONOPLJINO OLJE 1 (30 MIN, 100°C) (VIR: LASTEN).

<sup>19</sup> Zaradi pomanjkanja vzorca meritve ni bilo možno opraviti.



SLIKA 28. KONOPLJINO OLJE 1 (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).

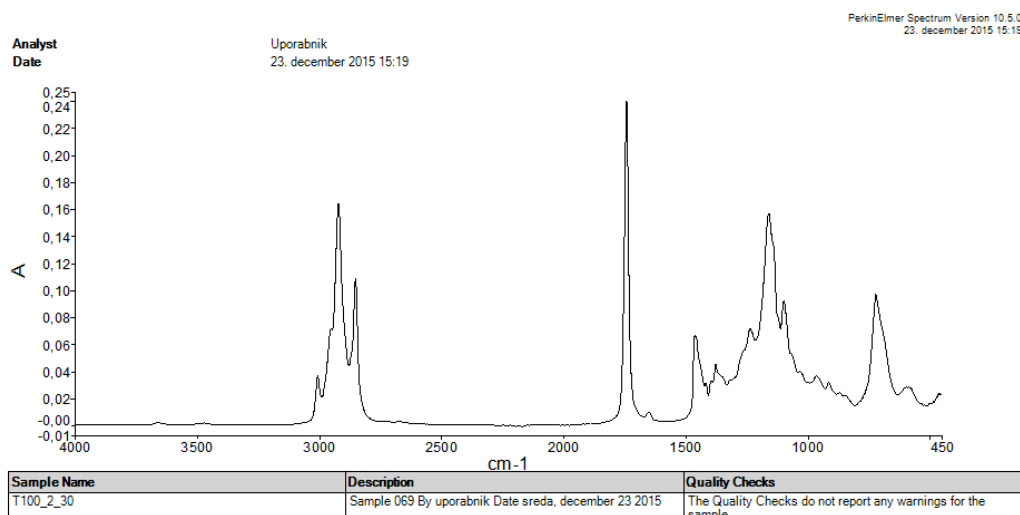
Primerjava obeh IR spektrov kaže na zelo podobno zgradbo, vendar opazimo, da se je signal pri  $966\text{ cm}^{-1}$  povečal in znižal signal pri  $722\text{ cm}^{-1}$ . Uporaba enačbe  $y = 0,033x$  pokaže, da se je koncentracija *trans* deleža MK pri vzorcu iz 1,08% povečala na 1,93%. Prav tako lahko iz tabele 10 opazimo, da nizke temperature (do  $100^{\circ}\text{C}$ ) ne vplivajo na izomerizacijo in, da se razlike začno pojavljati pri temperaturah nad  $150^{\circ}\text{C}$ . Razlika med 30 min segrevanjem ali 60 min segrevanjem je v deležu *trans* oblike 0,25% (1,49%; 1,74%).

### 5.5.2 Konopljino olje 2

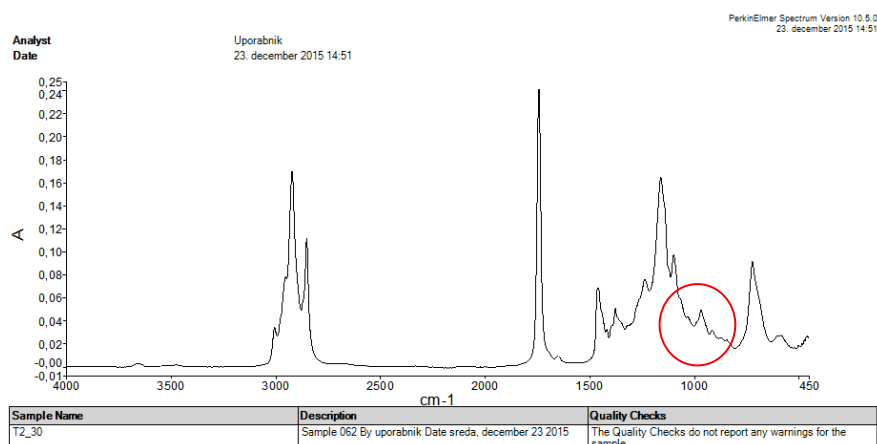
TABELA 11. KONOPLJINO OLJE 2 PO SEGREVANJU.

Temperatura	Absorbanca pri $966\text{ cm}^{-1}$	
	30 minut ( $\pm 1\text{min}$ )	60 minut ( $\pm 1\text{min}$ )
$100^{\circ}\text{C}$	0.0367	0.0361
$150^{\circ}\text{C}$	0.0364	0.0388
$200^{\circ}\text{C}$	0.0385	0.0444
$240^{\circ}\text{C}$	0.0494	0.0616





SLIKA 29. KONOPLJINO OLJE 2 (30 MIN, 100°C) (VIR: LASTEN).



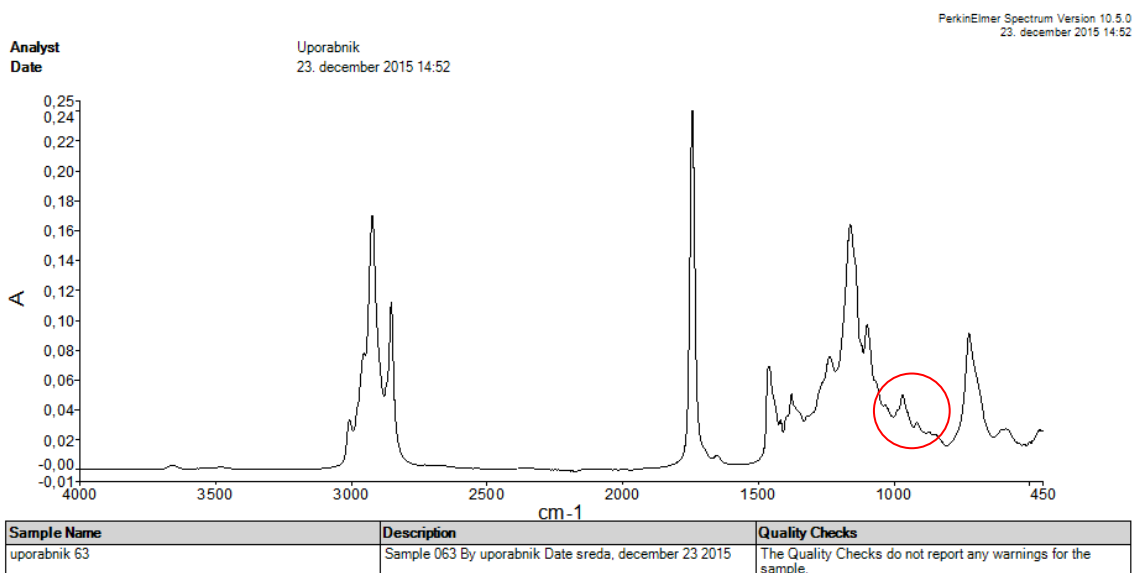
SLIKA 30. KONOPLJINO OLJE 2 (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).

Primerjava 2. vzorca konopljinoga olja pri segrevanju do 100 ali 240°C pokaže, da se pri višji temperaturi signal pri 966 cm<sup>-1</sup> okrepi in iz 1,10% doseže 1,50% *trans* deleža. Iz tabele 11 vidimo, da ima dolžina segrevanja vpliv na delež izomerizacije, saj je po 60 min segrevanja delež *trans* oblike dosegel 1,9%, torej 0,40% več. Tudi pri konopljinem olju št. 2 opazimo, da se razlike začnejo povečevati pri segrevanju nad 150°C.

### 5.5.3 Konopljino olje 3

TABELA 12. KONOPLJINO OLJE 3 PO SEGREVANJU.

Temperatura	Absorbanca pri 966 cm <sup>-1</sup>	
	30 minut (±1min)	60 minut (±1min)
100°C	0.0361	0.0356
150°C	0.0364	0.0386
200°C	0.0369	0.0405
240°C	0.0483	0.0613



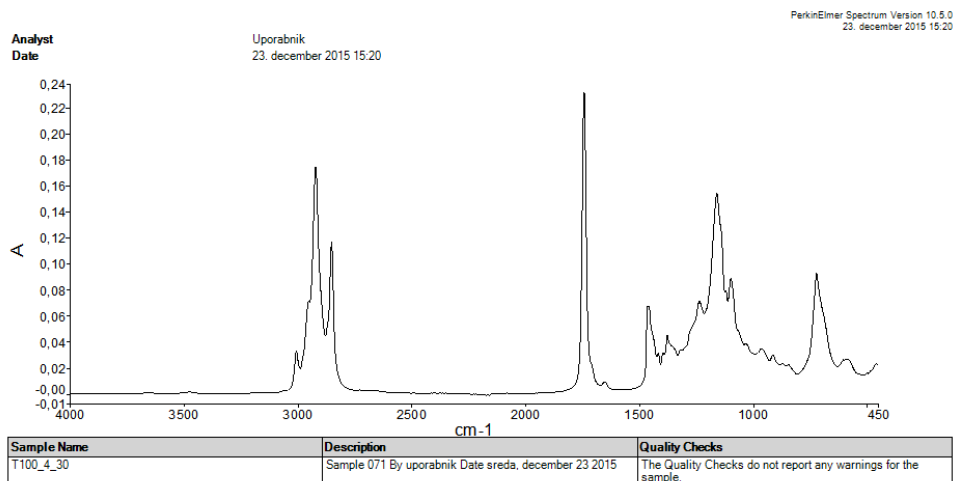
SLIKA 31. KONOPLJINO OLJE 3 (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).

Primerjava 3. vzorca konopljinega olja pri segrevanju do 100 ali 240°C pokaže, da se pri višji temperaturi signal pri 966 cm<sup>-1</sup> okrepi iz 1,094% na 1,46% *trans* deleža, kar je zelo podobno kot pri vzorcu številka 2. Tudi tukaj opazimo, da ima dolžina segrevanja vpliv na delež izomerizacije, saj je po 60 min segrevanja delež *trans* oblike dosegel 1.86%, torej spet razliko 0,40%. Tudi pri konopljinem olju št. 3 opazimo, da se razlike začno povečevati pri segrevanju nad 150°C.

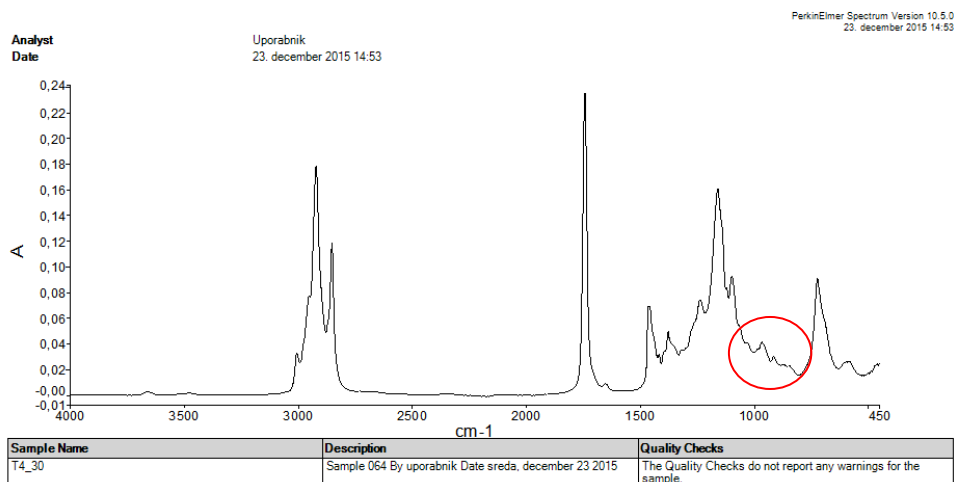
## 5.5.4 Konopljino olje 4

TABELA 13. KONOPLJINO OLJE 4 PO SEGREVANJU.

Temperatura	Absorbanca pri 966 cm <sup>-1</sup>	
	30 minut (±1min)	60 minut (±1min)
100°C	0.0348	0.0348
150°C	0.0345	0.0353
200°C	0.0345	0.0371
240°C	0.0413	0.0426

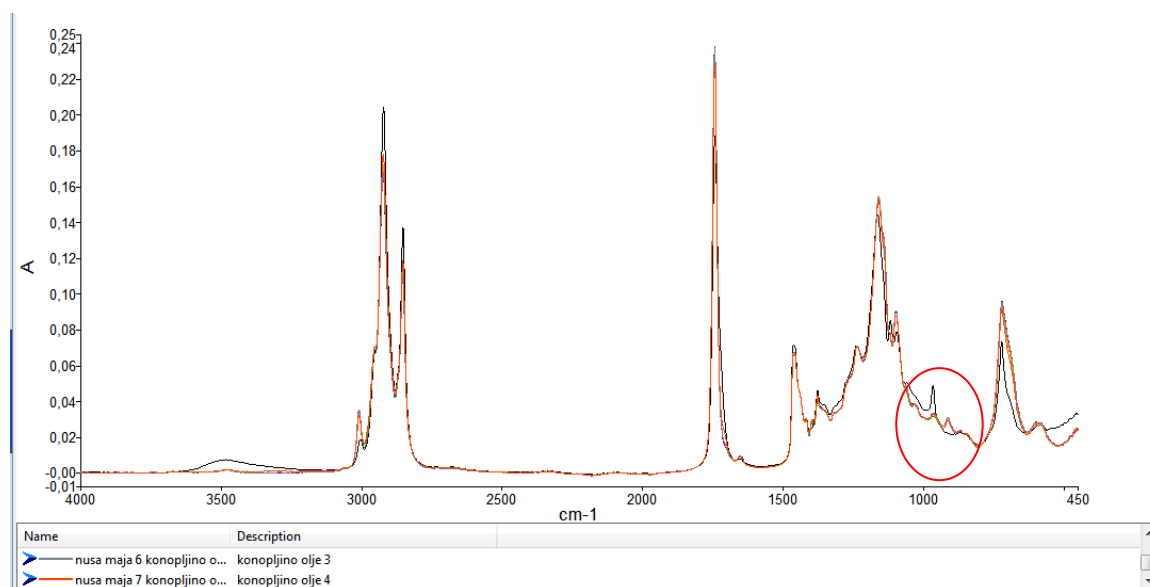


SLIKA 32. KONOPLJINO OLJE 4 (30 MIN, 100°C) (VIR: LASTEN).

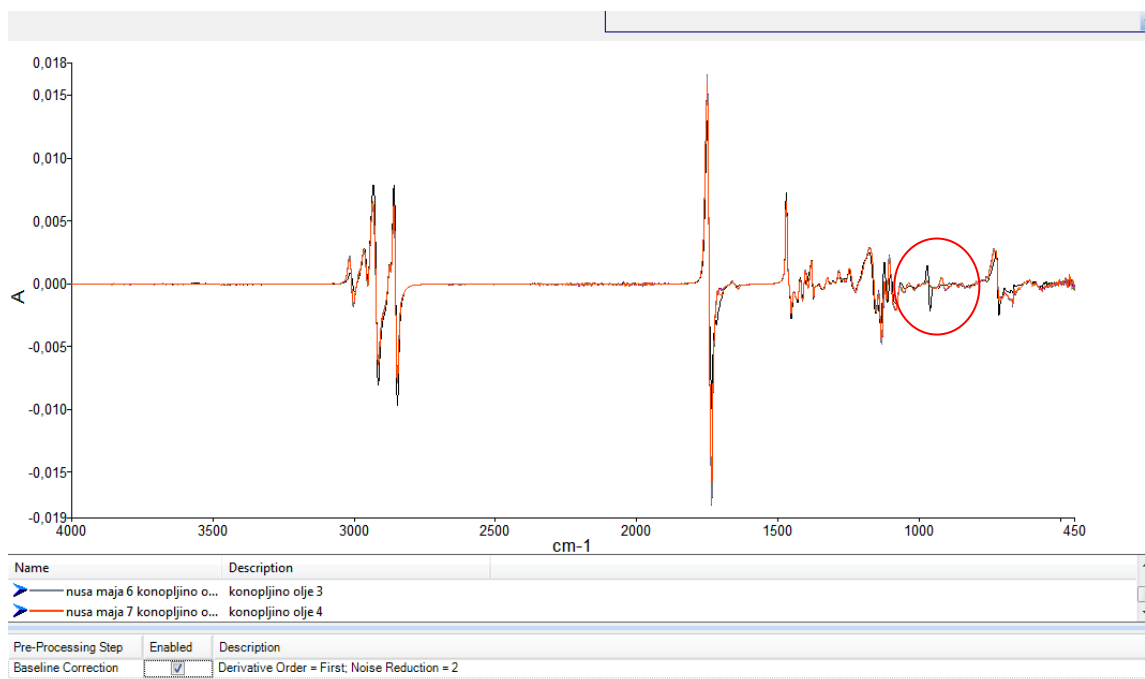


SLIKA 33. KONOPLJINO OLJE 4 (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).

Primerjava 4. vzorca konopljinega olja pri segrevanju do 100 ali 240°C pokaže, da se pri višji temperaturi signal pri 966 cm<sup>-1</sup> okrepi iz 1,05% na 1,25% *trans* deleža, kar je najmanj med vsemi vzorci. Opazimo, da po 60 min segrevanja do 240°C delež *trans* oblike dosegel le 1.29%, torej zelo majhno razliko.



SLIKA 34. PRIMERJAVA KONOPLJINEGA OLJA ŠT. 3 IN 4 PO SEGREVANJU NA 150°C (30 MIN) (VIR: LASTEN).



SLIKA 35. IZRAČUN PRVEGA ODVODA ZA OLJE ŠT. 3 IN 4 PO SEGREVANJU NA 150°C (30 MIN) (VIR: LASTEN).

## 5.6 Spektri oleinske in linolne kisline ter glicerol trioleta po toplotni obdelavi

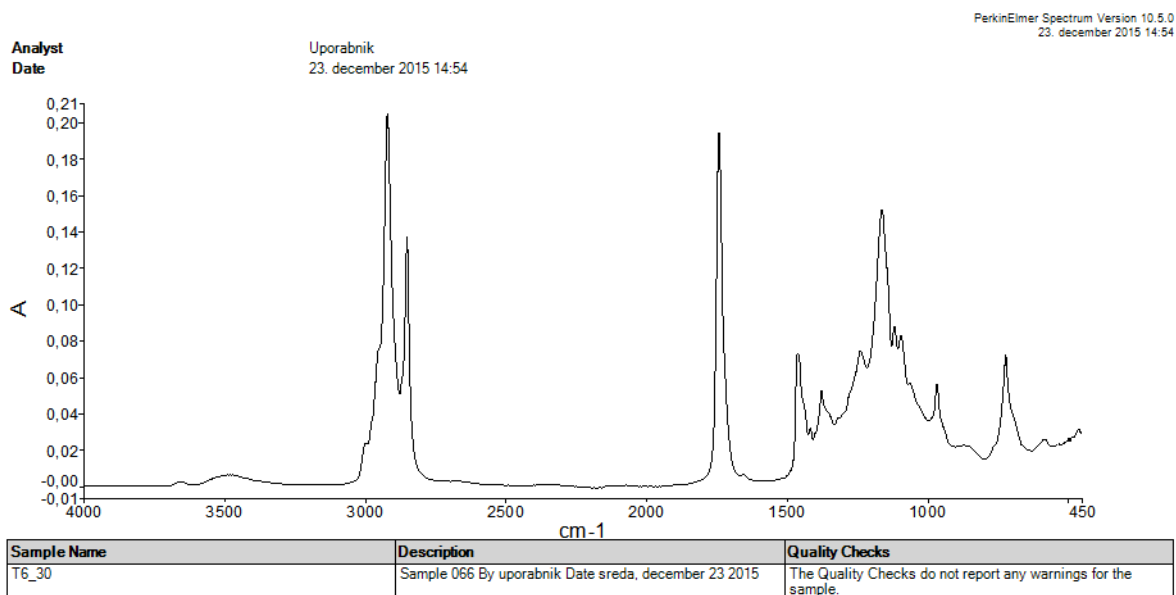
### 5.6.1 Oleinska kislina

Oleinska kislina pri toplotni obdelavi značilnega signala pri 966 cm<sup>-1</sup>ni pokazala tudi, ko je bila segreta do 240°C.

### 5.6.2 Glicerol triolet

TABELA 14. GLICEROL TRIOLEAT PO SEGREVANJU.

Temperatura	Absorbanca pri 966 cm <sup>-1</sup>	
	30 minut (±1min)	60 minut (±1min)
100°C	0.0528	0.0520
150°C	0.0516	0.0520
200°C	0.0519	0.0544
240°C	0.0562	0.0553



SLIKA 36. GLICEROL TRIOLEATE (30 MIN, 240°C) (VIR: LASTEN).

Za glicerol trioleat je bilo ugotovljeno, da segrevanje te spojine v obdobju do 30 ali 60 min na 240°C ne povzroči izomerizacije. Majhna nihanja in trend k povečevanju deleža *trans* oblike sicer je opazen, vendar ne v obsegu razlik opaženih pri konopljinem olju. Delež *trans* naraste iz 1,60% na 1,70%. Dolžina segrevanja ni vplivala na rezultate.

---

### 5.6.3 Linolna kislina

---

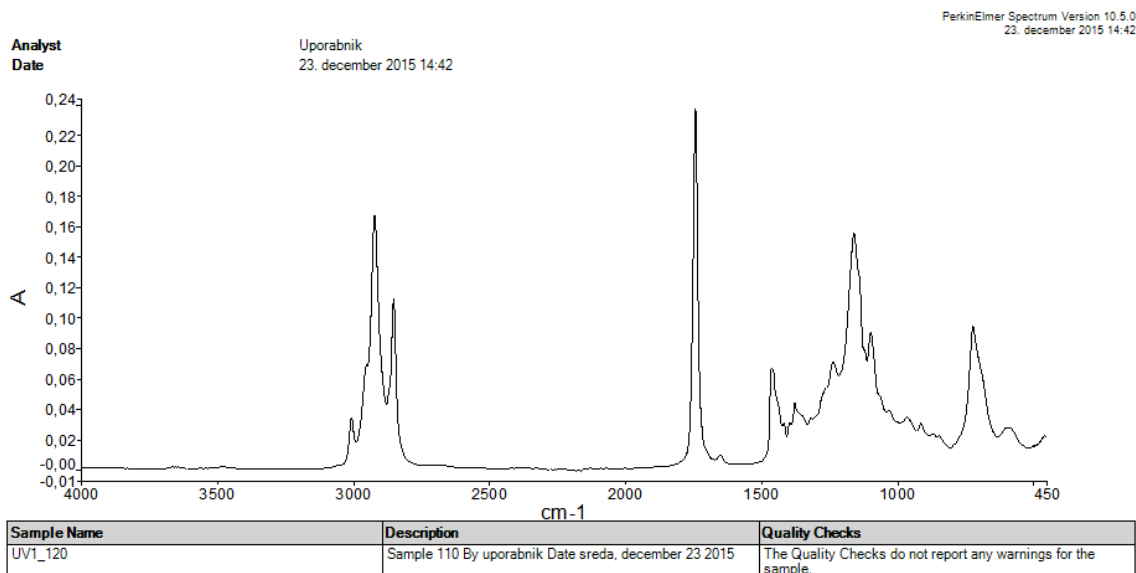
Linolna kislina pri segrevanju ni pokazala značilnega signala pri 966 cm<sup>-1</sup>.

## 5.7 Spektri vzorcev konopljinoga olja po obsevanju z UV svetlobo

### 5.7.1 Konopljino olje 1

TABELA 15. KONOPLJINO OLJE 1 PO OBSEVANJU.

Čas obsevanja (±1min)	Absorbanca pri 966 cm <sup>-1</sup>
30 min	0.0323
60 min	0.0349
90 min	0.0336
120 min	0.0347
150 min	0.0357



SLIKA 37. KONOPLJINO OLJE 1 (UV, 120 MIN) (VIR: LASTEN).

Iz tabele 15 lahko opazimo, da se je delež *trans* vezi le neznatno povečal; iz 0,99% na 1,08%. Zaključimo lahko, da obsevanje z UV svetlobo valovne dolžine od 230 nm ni prispevalo k izomerizaciji.

---

### 5.7.2 Konopljino olje 2

---

TABELA 16. KONOPLJINO OLJE 2 PO OBSEVANJU.

Čas obsevanja (±1min)	Absorbanca pri 966 cm <sup>-1</sup>
30 min	0.0317
60 min	0.0353
90 min	0.0343
120 min	0.0379
150 min	0.0361

Iz tabele 16 lahko opazimo, da se je delež *trans* vezi le neznatno povečal; iz 0,96% na 1,09%. Zaključimo lahko, da obsevanje z UV svetlobo valovne dolžine 230 nm ni prispevalo k izomerizaciji.

---

### 5.7.3 Konopljino olje 3

---

TABELA 17. KONOPLJINO OLJE 3 PO OBSEVANJU.

Čas obsevanja (±1min)	Absorbanca pri 966 cm <sup>-1</sup>
30 min	0.0319
60 min	0.0347
90 min	0.0341
120 min	0.0400
150 min	0.0354

Iz tabele 17 lahko razberemo, da je delež *trans* vezi pri obsevanju nihal: od 0,97 % do 1,21%. Zaključimo lahko, da obsevanje z UV svetlobo valovne dolžine 230 nm ni bistveno prispevalo k izomerizaciji.



---

### 5.7.4 Konopljino olje 4

---

TABELA 18. KONOPLJINO OLJE 4 PO OBSEVANJU.

Čas obsevanja (±1min)	Absorbanca pri 966 cm <sup>-1</sup>
30 min	0.0319
60 min	0.0342
90 min	0.0343
120 min	0.0396
150 min	0.0348

Podobne zaključke kot za vzorce olj 1, 2 in 3 lahko na osnovi rezultatov podamo tudi za olje številka 4. Rezultati nihajo in nakazujejo trend poviševanja, vendar je ta znotraj 0,3%.

## 5.8 Spektri oleinske in linolne kisline ter glicerol trioleta po obsevanju z UV svetlobo

---

### 5.8.1 Oleinska kislina

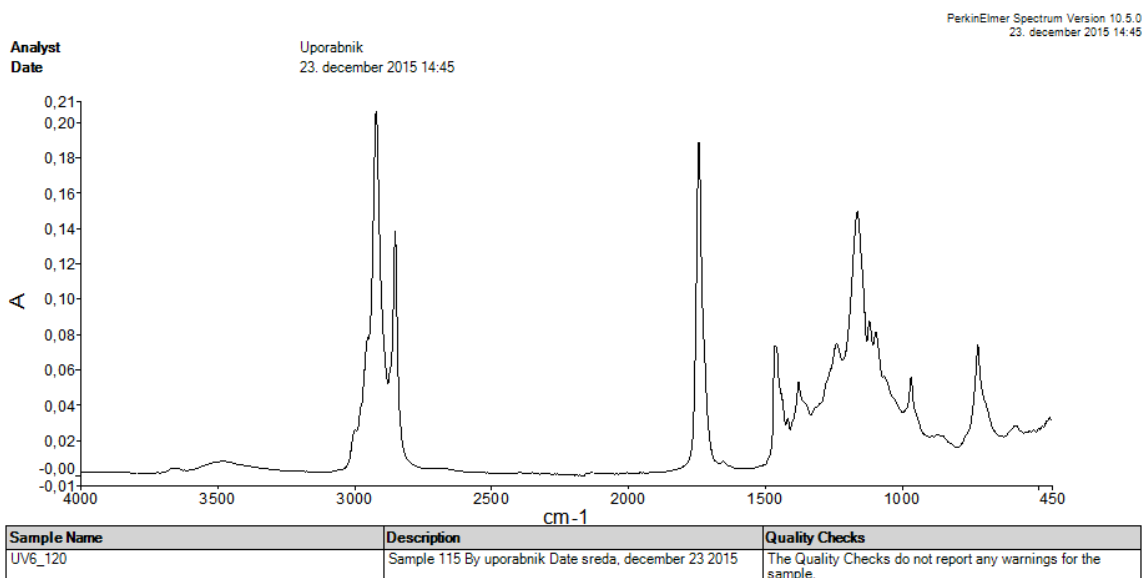
---

Oleinska kislina pri obsevanju z UV svetlobo ni pokazala značilnega signala pri 966 cm<sup>-1</sup>.

## 5.8.2 Glicerol trioleat

TABELA 19. GLICEROL TRIOLAT PO OBSEVANJU.

Čas obsevanja (±1min)	Absorbanca pri 966 cm <sup>-1</sup>
30 min	0.0502
60 min	0.0518
90 min	0.0511
120 min	0.0561
150 min	0.0528



SLIKA 38. GLICEROL TRIOLEATE (UV, 120 MIN) (VIR: LASTEN).

Za glicerol trioleat opazimo, da se delež *trans* oblike do 120 min povečuje in nato spet pade. V obdobju prvih 120 min je narastel iz 1,52% na 1,70%, kar je verjetno znotraj eksperimentalne napake.

---

### 5.8.3 Linolna kislina

---

Linolna kislina nima pri obsevanju z UV svetlobo ni pokazala značilnega signala pri 966  $\text{cm}^{-1}$ .

---

## 6 RAZPRAVA

---

Zaradi potrebe po hitri in zanesljivi analitični metodi določanja deleža TMK v maščobah in oljih, se v zadnjih petih letih vedno bolj uveljavlja FT-IR spektroskopija. Plinska kromatografija, ki sicer omogoča visoko občutljivost in natančnost, je zaradi priprave vzorcev, ki zahteva transesterifikacijo (priprava metilnih estrov maščobnih kislin), časovno zelo zahtevna. Zato sva v nalogi uporabili kombinacijo obeh metod (AOCS Cd 14e-09 metodo za ATR FT-IR).

Vsi vzorci so bili analizirani z PerkinElmer Two Spectrum instrumentom, ki ima tudi ATR vstavek (ang. *Attenuated total reflection*). Ta omogoča analizo tekočih in trdnih vzorcev brez predhodne priprave. Meritve so potekale v območju od 4000- 400  $\text{cm}^{-1}$ , z resolucijo 4  $\text{cm}^{-1}$ . Programska oprema omogoča berljivost spektrov do 0.001 A.U in integracijo površine pod izbranih vrhom (v našem primeru 966  $\text{cm}^{-1}$ ). Programska oprema: Spectrum Quant software za Spectrum Two. Vse meritve so potekale pri temperaturi od 23 do 25°C.

Konopljno olje je pri sobni temperaturi v tekočem stanju, zato dodatno termostatiranje ni bilo potrebno.<sup>20</sup> Najprej smo posneli spektre vseh štirih vzorcev konopljinega olja, nato spektre čistih snovi linolne, oleinske kisline, glicerol trioleata ter trioleina, kot standarda za *cis* dvojno vez. Kot standard za *trans* dvojno vez smo uporabili trielaidin, ki pri 966  $\text{cm}^{-1}$  pokaže značilen *trans*-vinilni vrh.

Rezultati meritev so pokazali, da so vsa konopljna olja bogata s tremi preiskovanimi maščobnimi kislinami (linolno,  $\alpha$ -linolensko in oleinsko kislino). V preučevanih vzorcih prevladuje linolna kislina, katere vrednost se giblje med 51,87% in 54,07%; sledi ji  $\alpha$ -linolenska kislina, z deležem med 16,60% in 19,22%. V vzorcih konopljinih olj je med preučevanimi najmanjši delež oleinske kisline (od 9,26% do 10,74%). Skupni delež teh

---

<sup>20</sup> Na trgu obstaja tudi *trans-fat* FT-IR analysis Pack za Spectrum Two (opomba avtoric), ki za potrebe te naloge ni bil na razpolago.

treh maščobnih kislin predstavlja med 79,93% in 81,64% vseh nenasičenih maščobnih kislin v preučevanih vzorcih. Podatki se dobro ujemajo s podatki iz literature (Callaway, 1999). S prehranskega vidika staimeli olji 3 in 4 najboljše sestavo.

Analiza vzorcev s plinsko kromatografijo in masno detekcijo po 60 minutnem izpostavljanju temperaturam 240°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) je pokazala, da se je delež nenasičenih MK v povprečju zmanjšal med 10 in 20%, vendar ne pri vseh vzorcih enako, kar pomeni, da njihova sestava ni povsem identična. Vsa preučevana konopljna olja so pri segrevanju spremenila tako barvo kot vonj, vendar IR analiza kaže, da ta proces v večjem obsegu ne sproži izomerizacije. Delež *trans* izomer se je povečal od 0,20% (vzorec številka 4) do 0,40% pri vzorcih številka 2 in 3. Povečanje smo opazili pri temperaturah nad 150°C ter pri segrevanju, ki je trajalo vsaj 60 min.

Pri čistih snoveh se delež *trans* vezi s segrevanjem ni bistveno povečal (znotraj 0,10%). Dolžina izpostavljenosti vzorcev povišanim temperaturam ni bistveno vplivala na delež *trans* izomer. Rezultati preučevanja povišanih temperatur sovpadajo z rezultati obsevanj z UV svetlobo. Pri vseh vzorcih je UV svetloba povzročila le neznatno povišanje deleža *trans* vezi v območju od 0,10 do 0,20% v skupnem deležu *trans* MK.

Zaključimo lahko, da uporaba visokih temperatur (do 240°C) in izpostavljanje konopljinemu olju UV sevanju ne prispeva bistveno k pretvorbi *cis* oblike v *trans*. V tem procesu pride do znižanja skupnega deleža nasičenih maščobnih kislin, ki pa je predvsem posledica oksidacije maščobnih kislin, zato pride do nastajanja škodljivih razgradnih produktov.

Rezultati, ki smo jih dobili, so v sozvočju z nekaterimi drugimi raziskavami. Tszuki s sodel. (2010) poroča o raziskavi šestih vrst jedilnih rastlinskih olj, ki so jih pet ur segrevali na 180°C. Delež *trans* maščobnih kislin se je povečal iz 2% na 5%. Liu s sodel. (2006) je 24 ur segreval sojino olje pri 230°C, vendar se delež *trans* MK ni povečal. Callaway (2015) je delal poskuse s konopljinim oljem, ki ga je segreval na 245°C 16 ur. Opazil je nastanek popolne *trans* linolenske kisline, vendar ne več kot 0,5% v skupnem deležu nenasičenih maščobnih kislin. Vendar v literaturi najdemo tudi zelo nasprotujoča si mnenja. Cihelkova s sodel. (2009) pravi, da povišane temperature lahko povzročijo *cis-trans* izomerizacijo sončničnega olja, kjer je to predvsem posledica izomerizacije

linolne kisline in to v precej večjem obsegu (do 10%). Tudi nekateri starejši viri (Mölleken, 1998) navajajo, da se ta proces lahko dogaja tudi v konopljinem olju pri segrevanju na 350°C (30 min) in sicer v mnogo višjem deležu (med 15- 20%).

Z eksperimentalnim delom na Univerzi v Nemčiji (Bergische Universität, 2015) so dokazali, da so nekatera konopljna olja zaradi antioksidantov manj občutljiva na oksidacijo. Zaradi vsebnosti dovolj *gamma*-tokoferolov, naj bi bili nekateri vzorci konopljinega olja stabilnejši med segrevanjem na 170-250°C. (Mölleken,1998). Tsuzuki (2010) navaja podobne ugotovitve tudi za olje žafranike in sicer, da je največji porast *trans* maščobnih kislin pri segrevanju med 250-350°C in manjši pri segrevanju do 200°C ali manj. Raziskave Inbaraja (2006) so pokazale, da pri segrevanju sojinega olja pri 200°C ne nastajajo *trans* maščobne kisline. Podobne rezultate so objavili tudi za rastlinska olja pri segrevanju na 170°C in 350°C za 30 min, ter pri 200°C in 220°C za 16 ur (Inbaraj, 2006).

Zato menimo, da lahko na osnovi rezultatov, ki smo jih dobili, postavimo zaključke.

## 7 ZAKLJUČEK

---

Z raziskavo smo želeli preučiti vpliv povišanih temperatur (od 100 do 240 °C) in UV-A sevanja na *cis* - *trans* izomerizacijo maščobnih kislin v izbranih vzorcih hladno stiskanega konopljinega olja. V ta namen smo olja segrevali na štirih različnih temperaturah (100, 150, 200 in 240°C) in sicer 30 in 60 min. V ločenem poskusu smo olja za enako časovno enoto izpostavili UV-A sevanju (230-240 nm). Enakim pogojem smo izpostavili tudi čisto linolno kislino, oleinsko kislino ter glicerol trioleat, s katerimi smo želeli preučiti, katera od sestavin konopljinega olja je najbolj občutljiva za izomerizacijo. Delež posameznih sestavin konopljinega olja smo določili s kombinacijo plinske kromatografije z masno spektrometrijo.

Ugotovljeno je bilo, da so vsa konopljna olja bogata z nenasičenimi maščobnimi kislinami (linolno, *α*-linolensko in oleinsko kislino). V preučevanih vzorcih prevladuje linolna kislina, katere vrednost se giblje med 51,87% in 51,87%; sledi ji *α*-linolenska kislina, z deležem med 16,60% in 19,22%. V vzorcih konopljinih olj je med preučevanimi najmanjši delež oleinske kisline (od 9,26 do 10,74%). Skupni delež teh treh

maščobnih kislin predstavlja med 79,93% in 81,64% vseh nenasičenih maščobnih kislin v preučevanih vzorcih.

Analiza vzorcev s plinsko kromatografijo z masno detekcijo po 60 minutnem izpostavljanju temperaturam 240°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) je pokazala, da se je delež nenasičenih MK v poprečju zmanjšal med 10 in 20%, vendar ne pri vseh vzorcih enako, kar pomeni, da njihova sestava ni povsem identična. Vsa preučevana konopljinna olja so po segrevanju spremenila tako barvo kot vonj, vendar IR analiza kaže, da ta proces v večjem obsegu ne sproži izomerizacije.

Delež *trans* izomer se je povečal od 0,20% (vzorec številka 4) do 0,40% pri vzorcih številka 2 in 3. Povečanje smo opazili pri temperaturah nad 150°C ter pri segrevanju, ki je trajalo vsaj 60 min. S tem smo samo deloma potrdili prvo in drugo hipotezo.

V tretji hipotezi smo predvidevali, da je oleinska kislina (18:1 *omega*-9) zaradi svoje simetrične zgradbe najmanj občutljiva na segrevanje, zato do izomerizacije iz *cis* v *trans* obliko pri temperaturah do 240°C in UV-A obsevanju ne bo prišlo. Ta hipoteza je potrjena. Rezultati meritev z IR ne kažejo značilnega *trans* signala. Na podoben način smo potrdili tudi četrto hipotezo - segrevanje linolne kisline do 240°C ne povzroči prehoda *cis* izomere v popolno *trans* obliko, torej *trans*-10 in *trans*-12. Razlog je lahko stabilnejša konfiguracija, ki jo konjugirana linolenska kislina pridobi s prehodom ene vezi v *trans* položaj (konjugacija).

Potrjena je bila tudi peta hipoteza - obsevanje linolne kisline z UV svetlobo valovne dolžine 230-240 nm bo povzročilo prehod vsaj ene od obeh dvojnih vezi v pozicijo *trans* ter delno tudi šesta hipoteza, ki pravi, da se bo sestava konopljinnega olja s segrevanjem do 240°C spremenila. Vendar večjega deleža skupnih TMK nismo dokazali. To velja tudi za hipotezo številka 7 - sestava bio konopljinnega olja se je z obsevanjem z UV-A svetlobo spremenila, vendar se delež TMK ni bistveno povečal.

## 8 DRUŽBENA ODGOVORNOST

---

Tema raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati se nanašajo na osnovna načela družbene odgovornosti. Osredotočili smo se na problem uživanja prevelikih količin *trans* maščobnih kislin in njihovih negativnih učinkov na človekovo zdravje. Konopljinu olje, zaradi svoje sestave predstavlja dobro alternativo, vendar samo, če je njegova uporaba primerna. Ugotovili smo, da segrevanje olja ali izpostavljenost UV žarkom ne povzroča izomerizacije (prehod *cis* v *trans*), vendar to še ne pomeni, da se sestava olja ne spremeni. Zato moramo biti pri dolgotrajnem segrevanju ali izpostavljanju visokim temperaturam vseeno pazljivi. Osebno bi to odsvetovali. Upamo, da bo tej temi v prihodnosti namenjeno čim več pozornosti, saj je s tem povezano tudi zdravje ljudi.

## 9 VIRI IN LITERATURA

---

### 9.1 Bibliografija

---

Ascherio A., Katan M. B., Zock P. L., Stampfer M. J., Willett W.C. (1999). Trans fatty acids and coronary heart disease. *The new England Journal of medicine*, 25: str. 1990-98.

Barcelos, R.C.S. et al. (2014) Cross-generational trans fat intake exacerbates UV radiation-induced damage in rat skin, str. 38.

Berlitz H.D., Grosch W., Schieberle P. (2009) *Food Chemistry*. 4<sup>th</sup> e. Berlin, Springer: str. 1070.

Berquin, I. M., Edwards, I. J., Chen Y. Q. (2008) Multi-target therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters*, 269, str. 363-77.

Callaway, J.C. (2004) *Hempseed as a nutritional resource: An overview*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Dyall, S. C., Michael-Titus, A. T. (2008) Neurological Benefits of Omega-3 Fatty Acids. *Neuromol. Med.*, 10, str. 219-35.

Fassett R. G., Gobe, G. C., Peake, Coombes, J. S. (2010) Omega-3 Polyunsaturated Acids in the Treatment of Kidney Disease. *Am. J. Kidney Dis. J. M.*, 56, str. 728-42.

Filip S., Vidrih R. (2010) Trans maščobne kisline v prehrani. V: *Zdrava prehrana in javno zdravje. Cvehtetovi dnevi javnega zdravja 2010*, Ljubljana, oktober 2010. Hlastan Ribič C.(ur.): Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za javno zdravje: str. 162-75.

Filip S., Hribar J., Vidrih R. (2011) Influence of natural antioxidants on the formation of trans-fatty-acid isomers during heat treatment of sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: str. 224-30

Hall J. A. (2012) Development of rapid *in situ* transesterification method for fatty acid analysis in microalgae. *Magistrska naloga*. Dalhousie university, Halifax, Nova Scotia.

Heinrichs, S. C. (2010) Dietary  $\omega$ -3 fatty acid supplementation for optimizing neuronal structure and function. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, str. 447-56.

Klofutar C. (1992) Fizikalno kemijske lastnosti triaciglicerolov. V: *Lipidi*. 14. Britenčevi živalski dnevi 92, Ljubljana, 4-5. Jun.1992. Klofutar C., Žlender B., Hribar J., Plestenjak A. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: str. 11-16.

Krečič Stres H. (2008) *Osnove živilske kemije*. Ljubljana, Biotehniški izobraževalni center: str. 69.

Kumerov F., Marn G. (2010). *Negativni učinki hidrogeniranih maščob*, Ljubljana, Mitax: str. 1.



- Liu, W.H., Inbaraj, S., Chen, B.H. (2006) Analysis and formation of trans fatty acids in hydrogenated soybean oil during heating.
- Lunder, M. (2015). Določanje sestave maščobnih kislin v jogurtu. Diplomsko delo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor.
- Lutter C.K. (2005) Breast feeding.V: Encyclopedia of human nutrition. Vol.1.2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Allen L., Prentice A. (eds.). Amsterdam, Elsevier: str. 232-36.
- McCarthy, J., Barr, D. in Sinclair, A. (2008) Determination of trans fatty acid levels by FTIR in processed foods in Australia, str. 391-395.
- Mölleken, H. (1998). Journal of the International Hemp Association: Trans-fatty acids in heated hemp seed oil, str. 21-23.
- Park P. W., Goins R. E. (1994), *In Situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. Journal of food science, 59: str. 1262-66.
- Parker, Gibson ,N. A, Brotchie, H. Heruc, G., Rees, A-M.. Hadzi-Pavlovic, D (2006) Omega-3 Fatty Acids and Mood Disorders. Am. J. Psychiatry, 163, str. 969-978.
- Pokorny J. (2006) Fats and oils: Science and applications. V: Handbook of food science, technology and engineering. Vol. 1. Hui Y.H., Manley C.H., Nip W.K. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 34.1.-34.19.
- Ratnayake, W.M.N. Determination of trans fatty acids in dietary fats, str. 61-65.
- Rose, D. P., Connolly ,J. M. (1999) Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. Pharmacology & Therapeutics, 83, str. 217-44.
- Saravanan, P., Davidson, N. C., Schmidt, E. B. , Calder, P. C. ( 2010) Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. Lancet, 375, str. 540-50.
- Simopoulos, A. P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am. J. Clin. Nutr., 54, str. 438-63.
- Simopoulos, A. P. (2002) Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and avtoimmune Disease. J. Am. Coll. Nutr.,21, str. 495-505.
- Singer, P., Shapiro, H., Theilla, M., Anbar, R., Singer, J. Cohen J. .(2008) Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. Intensive Care. Med, 34, str. 1580-92.
- Surette, M. E. (2008) The science behind dietary omega-3 fatty acids. CMAJ , 178, str. 177-80.
- Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P., Tew, K. D. (2002) Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. Biomed. Pharmacother.,56, str. 215-222.

Teale M. C. (2005): Omega 3 fatty acid research, Nova science publishers, New York: str. 7-25.

Tsuzuki, W., Matsuoka, A. in Ushida, K. (2010) Formation of trans fatty acids in edible oils during the frying and heating process, str. 976.

Wall, R., Ross P. R., Fitzgerald, G. F. Stanton (2010) Fatty acids from fish: the antiinflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids., Nutr.Rev.,68, str. 280-89.

Weston T.R., Derner J.D., Murrieta C. M., Rule D. C., Hess B.V. (2006) Comparison of catalysts for direct transesterification of fatty acids in freeze-dried forage samples. V: Proceedings, Western section, American society of animal science.

Zielińska A, Nowak (2014) Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. Chemik, 68 (2): str.103-10

Zhang L.,Li P,Sun X, Wang X, Xu B, Wang X, Zhang Q, Ding X (2014) Classification and adulteration detection of vegetable oils based on fatty acid profiles. Journal of agricultural and food chemistry, 62(34): str.8745-51

## 9.2 Spletni viri

---

Bodieko.si (2011). Konopljino olje in njegovi pozitivni učinki [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.hemp.com/hemp-education/uses-of-hemp/hemp-oil/> [Citirano: 22.12.2015, 18:35]

Cenim.se. Vidmar G. (2007) Trans maščobne kisline [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.cenim.se/prehrana/trans-mascobne-kisline/> [Citirano: 22.12.2015, 18:15]

Hemp.com. Hemp oil [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.hemp.com/hemp-education/uses-of-hemp/hemp-oil/> [Citirano: 26.12.2015, 14:35]

Hemp Foods America. Organic Hemp Oil. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://hempfoodsamerica.com/product/organic-hemp-oil/> [Citirano: 13.12.2015, 17:35]

Hieng, B (2012). Konopljino olje in njegovi pozitivni učinki [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.bodieko.si/bodi-eko-februar-2016#> [Citirano: 22.12.2015, 17:40]

Kobanara.si. Zakaj ekološka hladno stiskana olja [Online]Dostopno na URL naslovu: <http://www.cenim.se/prehrana/trans-mascobne-kisline/> [Citirano: 23.12.2015, 17:15]

Lekarnar.com. Iz konopljinega semena v konopljino olje [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.lekarnar.com/clanki/iz-konopljinega-semena-v-konopljino-olje> [Citirano: 2.12.2015, 17:25]

Maselj B.(2015). Kanabinoidi tarča razvoja novih zdravil [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.delo.si/znanje/znanost/kanabinoidi-tarca-razvoja-novih-zdravil.html> [Citirano: 13.12.2015, 15:45]

Nutritional Composition of Hemp Seed and Oil [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://nutiva.com/wp-content/uploads/2011/11/Hemp-Compositon-Chart1.pdf> [Citirano: 13.12.2015, 16:15]

RdB Nutrition. R. Barrington (2013) Conjugated Linoleic Acid [Online] Dostopno na URL naslovu: <http://www.robertbarrington.net/conjugated-linoleic-acid-improves-body-composition/> [Citirano: 23.12.2015,22:15]

RdB Nutrition. R. Barrington (2013). Conjugated linoleic acid. Improves body composition [Online] Dostopno na URL naslovu: <http://www.robertbarrington.net/conjugated-linoleic-acid-improves-body-composition> [Citirano: 23.12.2015,21:35]

Rihtarič, M.. Omega-3: Nenasičene maščobne kisline. [Online] Dostopno na URL naslovu: [http://www.lekarnaljubljana.si/public/datoteke/clanki\\_omega---zadnaj-verzija.pdf](http://www.lekarnaljubljana.si/public/datoteke/clanki_omega---zadnaj-verzija.pdf) [Citirano: 25.12.2015,14:10]

Sherman Hsu, C.-P. (1997) Infrared Spectroscopy [Online]. Dostopno na URL naslovu: [http://fp.okstate.edu/nanotech/Assignments/Readings/Char\\_Intro/reading%201.2%20ir-hsu.pdf](http://fp.okstate.edu/nanotech/Assignments/Readings/Char_Intro/reading%201.2%20ir-hsu.pdf) [Citirano: 25.12.2015, 16.35] str. 249-63.

The American Journal of Clinical Nutrition. M.W.Pariza (2004) Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid 1'2'3'4 [Online] Dostopno na URL naslovu: <http://ajcn.nutrition.org/content/79/6/1132S.full> [Citirano: 26.12.2015, 20:45]

The George Mateljan Foundation.What are cold pressed oils? [Online]Dostopno na URL naslovu: <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodtip&dbid=202> [Citirano: 26.12.2015, 19:30]

Tomšič, B. et al. (2007) Uporaba ATR IR spektroskopije pri proučevanju strukturnih sprememb celuloznih vlaken. ]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.tekstilec.si/wp-content/uploads/2013/01/Uporaba-ATR-IR-spektroskopije-pri-prouc%CC%8Cevanju-strukturnih-spremb-celuloznih-vlaken.pdf> [Citirano: 8.1.2015, 17:45]

VPD. Kaj so lipoproteini, HDL, LDL? [Online]. Dostopno na URL naslovu: [http://www.vpd.si/sl/Holesterol/Kaj\\_so\\_lipoproteini\\_HDL\\_LDL/](http://www.vpd.si/sl/Holesterol/Kaj_so_lipoproteini_HDL_LDL/) [Citirano: 24.12.2015, 16:15]

Wikipedia. (2016). Lomni količnik [Online]. Dostopno na URL naslovu: [https://sl.wikipedia.org/wiki/Lomni\\_koli%4%8Dnik](https://sl.wikipedia.org/wiki/Lomni_koli%4%8Dnik) [Citirano: 2.12.2015, 17:43]

Wikipedia. (2013) Prostaglandin Online]. Dostopno na URL naslovu: <https://sl.wikipedia.org/wiki/> [Citirano: 22.12.2015, 17:55]

William Reed Buisness Media (2016). RSPO to crack down on ‘palm oil free’ labels  
[Online] Dostopno na URL naslovu: <http://www.foodnavigator.com/> [Citirano:  
26.12.2015,20:10]

## PRILOGA 1- FARMAKOLOŠKI UČINKI *OMEGA-3* MAŠČOBNIH KISLIN

---

Nenasičene maščobne kisline so pomemben sestavni del vseh celičnih membran, saj vplivajo na fluidnost membran ter na encime in receptorje, vezane na celično membrano. Te maščobne kisline uravnavajo različne funkcije v telesu, vključno s krvnim tlakom, strjevanjem krvi, vnetnimi procesi, vplivajo pa tudi na pravilen razvoj in delovanje možganov (Wall s sodel., 2010; Simopoulus, 1991).

Arahidonska kislina (AA) in EPA sta prekursorja številnih eikozanoidov, med katere sodijo prostaglandini, tromboksani in levkotrieni. Omenjene spojine uravnavajo aktivacijo levkocitov in trombocitov, bronhokonstrikcijo, bolečino, sekrecijo v želodcu in vnetne procese. Eikozanoidi so tarča številnih zdravil, ki vplivajo na njihovo biosintezo in delovanje. Na metabolizem AA vplivajo nesteroidna protivnetna zdravila (acetilsalicilna kislina, ibuprofen), inhibitorji ciklooksigenaze 2 (rofekoksib, celekoksib) in antagonisti levkotrienov (montelukast, zafirlukast). *Omega-3* maščobne kisline pa direktno vplivajo na metabolizem AA, tako da jo izpodrinejo iz membrane celic (predvsem trombocitov, eritrocitov, nevtrofilcev, monocitov in jetrnih celic) in tekmujejo z njo za encime (ciklooksigenaza, lipooksigenaza), ki katalizirajo biosintezo eikozanoidov (Simopoulus, 1991; Surette, 2008). Že leta 1979 so ugotovili, da imajo iz EPA nastali eikozanoidi drugačne farmakološke učinke v primerjavi z eikozanoidi iz AA. Oboji sodelujejo pri uravnavanju obsega in trajanja vnetnega procesa, pri čemer eikozanoidi iz AA delujejo bolj provnetno in pospešujejo vnetje, medtem ko imajo eikozanoidi iz EPA veliko šibkejše provnetne značilnosti oziroma delujejo protivnetno, zato zmanjšujejo intenzivnost in trajanje vnetja. *Omega-3* maščobne kisline delujejo protivnetno tudi tako, da vplivajo na ekspresijo genov preko transkripcijskega faktorja *NFκB*, ki ima pomembno vlogo pri različnih vnetnih procesih in na receptorje, ki imajo pomembno vlogo pri celični diferenciaciji, rakavih obolenjih, vnetjih, občutljivosti na inzulin, aterosklerozi (Singer s sodel., 2008).

*Omega-3* nenasičene maščobne kisline znižajo nivo trigliceridov v plazmi pri ljudeh s hipertrigliceridemijo. Poleg tega znižajo tudi nivo lipoproteina zelo nizke gostote (VLDL) in rahlo zvišajo nivo LDL holesterola, vendar koncentraciji skupnega in HDL holesterola ostaneta nespremenjeni. Za hipolipidemični učinek so potrebni nekoliko višji odmerki *omega-3* maščobnih kislin, in sicer 3-5 g (EPA+DHA)/dan. Tako visokih količin EPA in DHA ne moremo dobiti s hrano, zato je potreben vnos s prehranskimi dopolnili (Fassett s sodel., 2010)

Simopoulusa (2002) in Fassett s sodel. (2010) potrjujejo, da *omega-3* maščobne kisline v višjih odmerkih inhibirajo agregacijo trombocitov, zmanjšajo viskoznost krvi in sintezo tromboksana A<sub>2</sub> ter zmanjšajo fluidnost membrane eritrocitov, hkrati pa povečujejo koncentracijo aktivatorja plazminogena in zmanjšujejo koncentracijo inhibitorja aktivatorja plazminogena.

Visoke vrednosti *omega-3* maščobnih kislin v prehrani otrok so povezane z boljšim mentalnim razvojem in boljšim vidom otrok. To dejstvo so nadalje potrdile tudi študije, v katerih so ugotovili, da so številne motnje v razvoju možganov, vključno s pomanjkanjem pozornosti, hiperaktivnostjo in motnjami v koordinaciji, povezane s pomanjkljivim oziroma neuravnovešenim vnosom *omega-3* maščobnih kislin. Prav zaradi vloge *omega-3* maščobnih kislin pri razvoju možganov lahko te maščobne kisline v določeni meri preprečujejo tudi nevrodegenerativne in psihične bolezni, vendar natančen mehanizem še ni povsem razjasnjen. Zelo verjetno je, da EPA in DHA delujeta preko različnih, med seboj se prepletajočih mehanizmov, ki vključujejo različne celične tarče (Heinrichs, 2010; Dyallin Michael-Titus, 2008).

Omenjene maščobne kisline zmanjšajo možnost nastanka ateroskleroze, nižajo krvni tlak, preprečujejo nastajanje strdkov, znižujejo nivo trigliceridov in zmanjšujejo vnetje. Zmanjšujejo tudi tveganje za ponovitev srčnega infarkta pri ljudeh, ki so ga že preboleli. Priporočen dnevni odmerek za preventivo pred srčno-žilnimi obolenji je približno 1 g EPA + DHA (Wall s sodel., 2010).

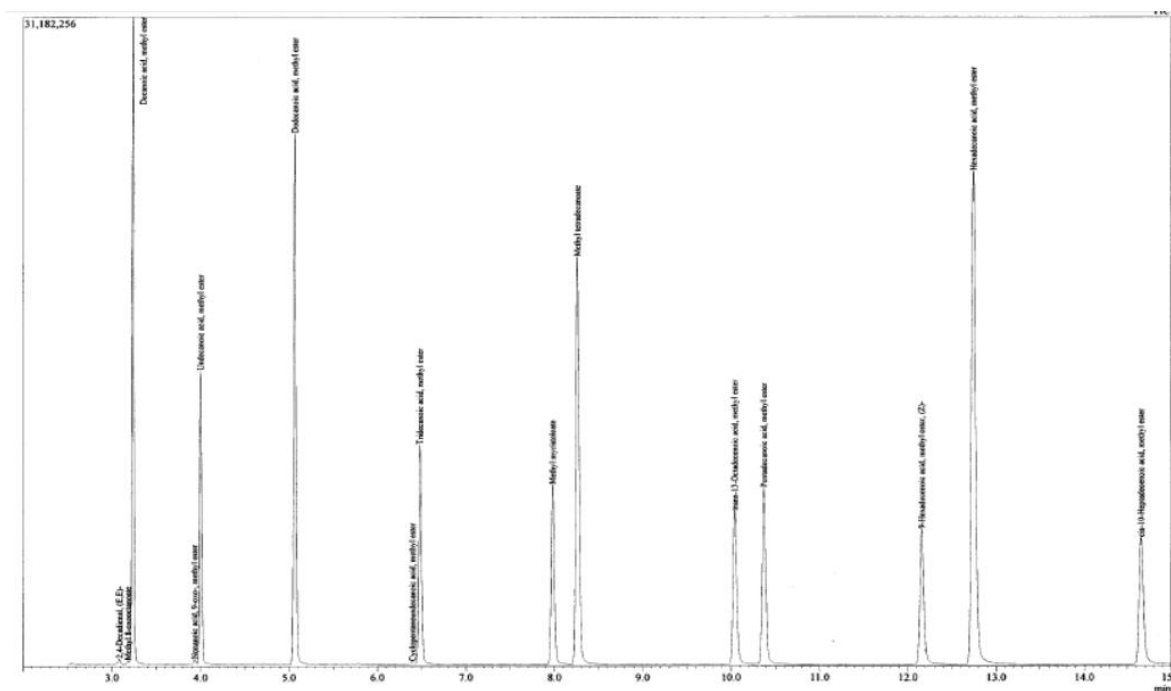
Antihipertenzivni učinek je kombinacija več učinkov *omega-3* maščobnih kislin. Pri povečanem vnosu teh maščobnih kislin so bile zabeležene spremembe v metabolizmu eikozanoidov, viskoznosti krvi in izguba natrija. Na znižanje krvnega tlaka pa naj bi vplivala tudi zmanjšana sinteza vazokonstriktorja tromboksana A<sub>2</sub>, povečana sinteza vazodilatatorja dušikovega oksida ter učinek na avtonomni živčni sistem (Saravanan s sodel., 2010; Tapiero s sodel., 2002).

Berquin (2008) poroča o številnih študijah na živalih, ki potrjujejo, da redno uživanje *omega-3* maščobnih kislin zmanjša tveganje za nastanek raka debelega črevesa, prostate in raka na prsih. Mehanizmi, ki to omogočajo vključujejo tako spremembe v lastnostih rakavih celic (proliferacija, invazija, apoptoza, metastaze), kot tudi spremembe v lastnostih gostiteljevih celic (vnetje, imunski odgovor, angiogeneza). Točni mehanizmi teh učinkov še ni povsem jasn, vendar že sedaj številni strokovnjaki podpirajo uporabo *omega-3* maščobnih kislin pri preventivi in zdravljenju raka ter kot prehransko podporo rakavim bolnikom, da se okrepi njihov imunski sistem in prepreči prevelika izguba telesne mase.

*Omega-3* maščobne kisline so pomembne tudi za rast, razvoj in delovanje živčnih celic. Zmanjšana količina DHA v obdobju razvoja možganov lahko vodi do napak v nevrogenezi, metabolizmu nevrotransmiterjev, oteženem učenju in do motenj vida. Zaradi možnosti vnosa težkih kovin v telo je za nosečnice, doječe matere in otroke priporočljivo, da se izogibajo prevelikemu uživanju rib, in uživajo več rastlinskih olj, ki so bogata z *omega-3* maščobnimi kislinami, kamor sodi tudi konopljinno olje (Parker s sodel., 2006).

## PRILOGA 2 – GC\_MS

GRAF 9. SPEKTER STANDARDA FAMA (1 – 15 MIN).



GRAF 10. SPEKTER STANDARDA FAMA (16 – 30 MIN).

