

PATRYCJA SŁOMCZYŃSKA, PAWEŁ SIUDEM, KATARZYNA PARADOWSKA

¹H NMR JAKO NARZĘDZIE DO OCENY JAKOŚCI OLEJÓW ROŚLINNYCH

Streszczenie

Wprowadzenie: Oleje roślinne pełnią ważną rolę zarówno w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, jak i kosmetycznym. Są nie tylko źródłem substancji odżywczych, lecz także mogą stanowić nośnik substancji bioaktywnych jako składnik kremów czy emulsji. Niektóre oleje, jak np. oliwa z oliwek *extra virgin*, czy olej arganowy z powodu dużego zapotrzebowania przez konsumentów, jak i wysokiej ceny, mogą być obiektem zafałszowań tańszymi i łatwiej dostępnymi olejami. Stąd potrzeba opracowywania nowych metod badawczych umożliwiających szybkie rozpoznawanie takich zafałszowań, ale również pozwalających na ocenę jakości oleju np. w zmiennych warunkach przechowywania. Standardowo do oceny profilu kwasów tłuszczowych w oleju wykorzystuje się chromatografię gazową (GC). W ocenie jakości oleju bierze się pod uwagę również parametry oleju takie jak: liczba kwasowa, liczba nadtlenkowa czy liczba jodowa. Jednak zamiast wykonywać wszystkie wspomniane badania, parametry te można wyznaczyć również bezpośrednio z widm ¹H NMR. Stąd duży potencjał zastosowań tej metody w szybkim, przesiewowym badaniu jakości olejów. Technika ¹H NMR zyskuje w ostatnich latach na znaczeniu w badaniach jakości i składu żywności, w tym olejów roślinnych. W badaniach olejów wykorzystuje się również wielowymiarowe techniki NMR, czy analizę innych jąder (¹³C NMR). Celem pracy jest przedstawienie zastosowań najpowszechniej wykorzystywanej techniki ¹H NMR.

Wyniki i wnioski: W artykule zawarto przykłady zastosowań tej metody w kontekście badań składu, jakości i autentyczności oliwy z oliwek, oleju konopnego i oleju arganowego jako olejów stosowanych (zarówno w kontekście spożywczym, medycznym lub kosmetycznym) oraz zyskujących coraz większą popularność wśród konsumentów.

Słowa kluczowe: ¹H NMR, oleje roślinne, oliwa z oliwek, olej konopny, olej arganowy

Wprowadzenie

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jest powszechnie stosowanym podejściem do identyfikacji, jakościowego i ilościowego oznaczania me-

P. Słomczyńska, Koło Naukowe „Free Radicals”; dr P. Siudem ORCID: 0000-0002-8674-3774; dr hab. K. Paradowska ORCID: 0000-0002-9613-856X, Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa.
Kontakt e-mail: pawel.siudem@wum.edu.pl

tabolitów lub substancji obecnych w mieszaninach czy w ekstraktach żywnościowych [20].

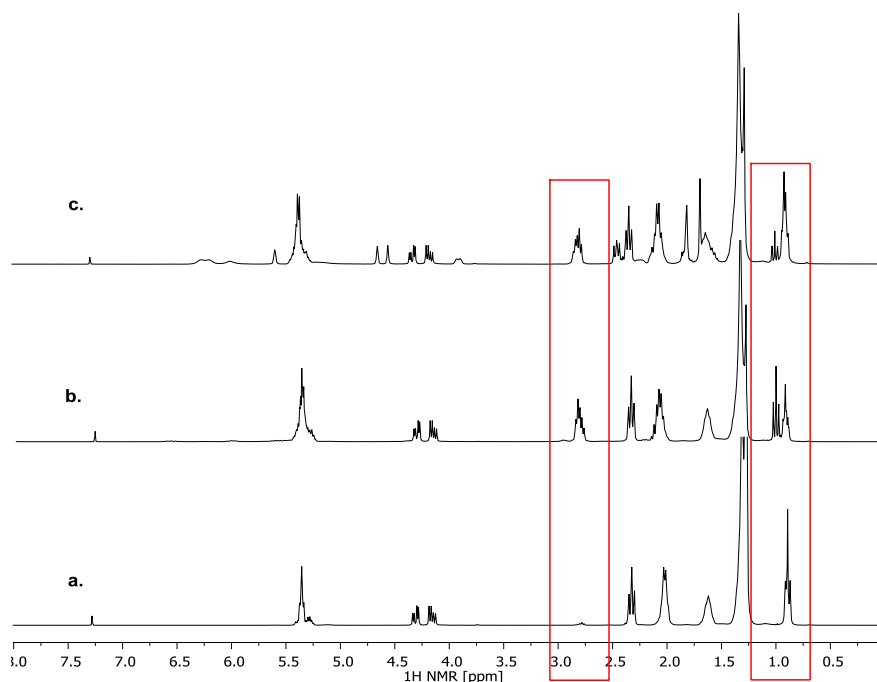
Technika NMR z powodzeniem może być stosowana do badania żywności, między innymi soków, win, przypraw czy miodów. Nie wymaga specjalnego przygotowania próbki, takich jak derywatywacja lub ekstrakcja. Mieszanina może być poddana badaniu jako całość, bez potrzeby rozdzielania na składniki, z niewielkim użyciem rozpuszczalnika. Dzięki zwiększeniu zdolności rozdzielczej aparatury można badać złożone układy, np. wyciągi roślinne czy mieszaniny. Na ogół takie mieszaniny to zestaw kilkudziesięciu substancji, których dokładna identyfikacja metodą NMR jest skomplikowana, bywa, że nawet niewykonalna. Jednakże widmo ^1H NMR daje możliwość określenia profilu składników, np. charakterystycznych dla rośliny (cukry, aminokwasy, kwasy fenolowe, kwasy tłuszczowe itd.). Celem pracy jest przedstawienie zastosowań najpowszechniej wykorzystywanej techniki ^1H NMR.

Powstaje coraz więcej prac, których celem jest zastosowanie metabolomiki opartej na technice ^1H NMR do oceny jakości np. suplementów diety [6], ale również produktów spożywczych, np. olejów roślinnych. Widmo ^1H NMR danego oleju oddaje obraz profilu metabolomicznego, co jednoznacznie wskazuje na pochodzenie, rodzaj oleju i/lub jego autentyczność oraz obrazuje różnice w składzie.

W analizie złożonych próbek stosuje się coraz częściej podejście nazywane *NMR fingerprinting*, czyli NMR-owskim „odciskiem palca”. Już rozpoznanie samego kształtu widma, bez przypisywania poszczególnych sygnałów, to dobry sposób odróżniania próbek biologicznych. Intensywność sygnałów odzwierciedla różnice w metabolizmie, które spowodowane są takimi czynnikami, jak warunki wzrostu, stadium rozwojowe lub genotyp [25]. Technika NMR może być stosowana z powodzeniem do pozyskiwania informacji o składzie próbek pochodzenia roślinnego, np. owoców [13], a także o procesach zachodzących w organizmie zwierzęcym [12]. „Widma-odciski” wielu próbek mogą być analizowane przy użyciu wielowymiarowych metod statystycznych, chemometrycznych (PCA). Na ogół jako technikę pomiarową stosuje się ^1H NMR, ponieważ rejestracja takiego widma zajmuje kilka minut.

Metoda *NMR fingerprinting* uznawana jest przez Komisję Europejską do kontroli autentyczności i źródeł żywności (np. łososia i pochodzących z niego produktów, jakości napojów alkoholowych, oliwy z oliwek i innych) [2]. Jądrowy rezonans magnetyczny (NMR) jest ważnym narzędziem w badaniu lipidów, olejów i tłuszczów spożywczych. Zastosowanie ^1H NMR w badaniu olejów, tłuszczów i lipidów spożywczych wzrosło, szczególnie ze względu na ogromną ilość informacji, które widma ^1H NMR w wysokim polu (np. 600 ÷ 800 MHz) mogą dostarczyć w bardzo krótkim czasie [17]. W widmie wszystkie atomy wodoru (protony) mające to samo otoczenie chemiczne lub to samo pole lokalne, wytwarzają sygnały o tej samej częstotliwości. Pozycja sygnału rezonansowego w widmie nazywana jest przesunięciem

chemicznym (δ [ppm]). Przesunięcie chemiczne (służące do określenia położenia sygnału w widmie NMR, odpowiadające częstotliwości rezonansowej jądra atomowego względem wzorca w polu magnetycznym), intensywność i wielość linii rezonansowych (multipletowość sygnałów, czyli rozszczepienie sygnału na kilka składowych w wyniku sprzężeń występujących między jądrami w próbce) zawierają szereg informacji na temat nierównocennych jąder ¹H występujących w próbce [11] (Ryc. 1). Przesunięcie chemiczne atomu lub grupy atomów mierzy się względem tetrametylosilanu (TMS).



Ryc. 1. Widma ¹H NMR (CDCl₃) wybranych olejów roślinnych: a) oliwa z oliwek, b) olej lniany, c) olej konopny.

Fig. 1. ¹H NMR spectra (CDCl₃) of selected vegetable oils a) olive oil, b) linseed oil, c) hemp oil.

Identyfikację składników obecnych w olejach przeprowadza się na podstawie analizy sygnałów ¹H NMR dla różnych grup protonów występujących w związkach. Ważne jest także oszacowanie udziału wielonienasyconych grup acylowych w lipidach (kwasów n-3 i n-6) ze względu na ich wpływ na stabilność oksydacyjną oraz wpływ na zdrowie człowieka. Parametr ten (ilość wielonienasyconych grup acylowych) to kryterium oceny jakości olejów, np. rybnych, w niektórych krajach, np. w Japonii [17]. Zatem ilość kwasów nienasyconych można z powodzeniem oszacować za pomocą ¹H NMR w prosty sposób.

Z punktu widzenia autentyczności próbek najbardziej interesującymi sygnałami protonowymi będą prawdopodobnie sygnały grup metylowych (CH_3) występujących w acylowych grupach i kwasach tłuszczowych. Grupy metylowe linolenowych łańcuchów acylowych (ALA, grupy metylowe kwasów tłuszczowych n-3) wyglądają nieco inaczej niż grupy metylowe innych łańcuchów kwasów tłuszczowych, np. LA (n-6). W widmie ^1H NMR olejów (Ryc. 1) widać sygnały przy wartości przesunięcia chemicznego δ 0,88 i 0,97 ppm. Są to sygnały pochodzące od grup CH_3 obecnych w LA (multiplet przy 0,88 ppm) i ALA (swoisty, rozpoznawalny triplet przy 0,97 ppm). Ponieważ oliwa z oliwek zawiera mniej kwasu ALA niż inne (brak charakterystycznego tripletu przy 0,97 ppm, Ryc. 1a), możliwe jest wykorzystanie tej informacji do rozróżnienia jej od innych olejów, np. lnianego (Ryc. 1b). Również widmo ^1H NMR oleju konopnego (Ryc. 1c) pokazuje sygnały odpowiadające głównym składnikom oleju. Obecność niektórych innych składników można wykryć, analizując sygnały o niskiej intensywności, które pojawiły się w linii podstawowej.

Najbogatszym i łatwo dostępnym źródłem ALA (n-3) są oleje z nasion roślin oleistych, przede wszystkim z ln (ok. 53 %), rzepaku (ok. 9 %) i soi (ok. 7 %) [4], ale także oleje konopne. Analiza widm ^1H NMR jest niezawodna, szybka i umożliwia analizowanie wielu składników na podstawie tylko jednego pomiaru. Analiza ^1H NMR to narzędzie charakteryzujące oleje na wiele różnych sposobów, m.in.:

- pozwala na wiarygodne ilościowe oznaczenie zawartości kwasów tłuszczowych w odniesieniu do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) i nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) [40];
- umożliwia ocenę zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w oleju [32] czy analizy procesów utleniania oleju [47];
- pozwala wyznaczyć parametry jakościowe oleju, jak np. liczba jodowa (zastosowanie techniki ^1H NMR do wyznaczenia liczby jodowej dało wartości zgodne z klasyczną metodą dla znacznej liczby próbek [18]. Klasyczna metoda jest czasochłonna i wymaga nakładu wielu odczynników chemicznych);
- może być wykorzystana do określenia zawartości składników o mniejszym stężeniu w oleju (np. polifenoli [38], skwalenu, steroli [42], kannabinoidów [5]).

Metodę można rozszerzyć na przemysł kosmetyczny, w którym również istotny jest skład produktu. Informacje o sygnałach widm ^1H NMR zebrane z danych literaturowych tworzą unikalną bazę, która może posłużyć w potwierdzeniu tożsamości badanej substancji lub przeciwnie – wykluczyć ją.

Oleje i tłuszcze roślinne składają się głównie z triacylogliceroli, mono- i diacylogliceroli, steroli, witamin, kwasów tłuszczowych i innych. Interesująca jest możliwość określenia stopnia nienasycenia i proporcji różnych grup acylowych w olejach.

Oleje – ogólna charakterystyka

Olej roślinny to tłuszcz pozyskiwany z nasion lub owoców niektórych roślin [14]. Oleje to zazwyczaj substancje w stanie ciekłym lub łatwo topniejące ciała stałe. Są nierozpuszczalne w wodzie, a dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach lipofilnych. Mają zróżnicowane pochodzenie i właściwości chemiczne. Najczęściej oleje roślinne stosowane są jako tłuszcze jadalne, lub składniki kosmetyków, a niektóre z nich jako suplementy diety czy składniki leków (np. w emulsjach olejowych). Bywają także wykorzystywane jako surowce do produkcji materiałów lakierniczych, malarskich i impregnacyjnych (np. olej lniany).

Każdy olej roślinny posiada swój charakterystyczny skład kwasów tłuszczowych i substancji towarzyszących, które mogą się różnić ilością nawet w obrębie jednego gatunku. Istotną zaletą tych olejów jest ich skład bogaty w nienasycone kwasy tłuszczowe oraz niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe z rodzin n-6 i n-3. Odgrywają one ważną rolę w syntezie prostaglandyn, prostacyklin, leukotrienów, lipoksymów i tromboksanów oraz uczestniczą w prawidłowym transporcie lipidów i cholesterolu we krwi, dlatego zawdzięcza się im działanie antyagregacyjne i obniżające ciśnienie tętnicze krwi [14]. Obecnie zwraca się uwagę na proporcje kwasów tłuszczowych z tych dwóch rodzin (n-6 i n-3). Zalecany stosunek pomiędzy kwasami tłuszczowymi n-6 i n-3 w diecie powinien wynosić 1:1 ÷ 2:1, a jako górną dopuszczalną granicę tego stosunku podaje się proporcję 5:1 [24]. Tymczasem rzeczywiste spożycie kwasów tłuszczowych n-6 w porównaniu z n-3 jest nawet 15-krotnie wyższe.

Istotnym czynnikiem mającym wpływ na skład oleju jest sposób jego wytwarzania. Najlepszą jakość przypisuje się olejom tłoczonym na zimno. Metoda ta polega na rozgniataniu nasion i tłoczeniu ich w prasie bez ogrzewania, a następnie przefiltrowaniu. Uważa się, że ta technika zapewnia niezmienny skład oleju, lecz otrzymany w ten sposób produkt ma stosunkowo wysoką tendencję do utleniania [14]. Najszybciej negatywnym przemianom, takim jak utlenianie czy polimeryzacja, ulegają wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które wykazują największą wrażliwość na warunki przechowywania (jak temperatura, dostęp powietrza i światła).

Światowa produkcja olejów roślinnych zwiększa się i sumarycznie w latach 2022 ÷ 2023 ma wynieść blisko 230 mln m³/rok [45].

Oliwa z oliwek - charakterystyka

Wyjątkowym olejem roślinnym jest oliwa pozyskiwana z owoców drzewa oliwnego (*Olea europaea*) występującego w klimacie śródziemnomorskim i subtropikalnym. Charakteryzuje się specyficznym smakiem, dużą opornością na utlenianie oraz działaniem hipolipemizującym i żółciopędnym [14]. W przeciwieństwie do oliwy z dojrzałych owoców, oliwa z zielonych oliwek posiada ostrzejszy smak i zapach. Oli-

wę możemy klasyfikować ze względu na kraj pochodzenia (oliwę włoską, hiszpańską czy grecką) oraz sposób produkcji.

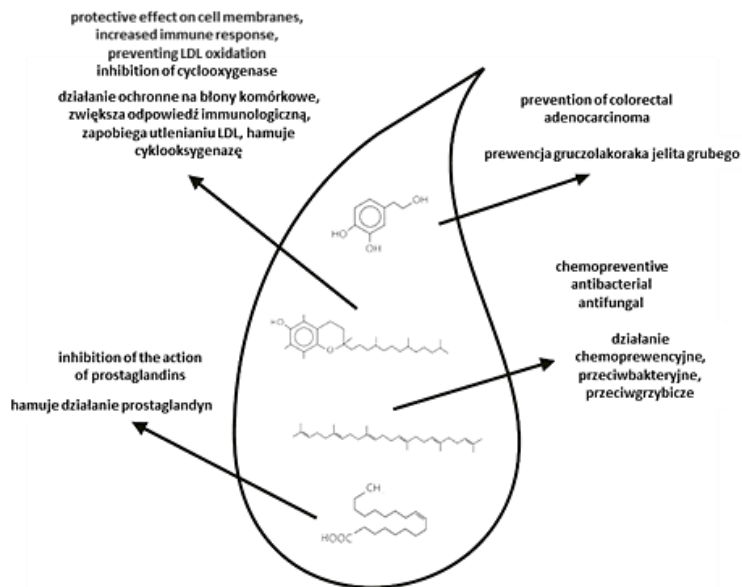
Oliwa *virgin* (tzw. dziewicza) jest pozyskiwana wyłącznie metodami mechanicznymi, aby nie powodować zmian w strukturze triacylogliceroli. Na jej podstawie wyróżniamy w zależności od zawartości wolnych kwasów tłuszczowych oliwy:

- nadające się do bezpośredniego spożycia (*Virgin olive oil*) – oliwa extra virgin (*Extra virgin olive oil* – EVOO), virgin (*Virgin olive oil*) i zwykła oliwa virgin (*Ordinary virgin olive oil*);
- nadające się do celów spożywczych po rafinacji (*Lampante virgin olive oil*) – oliwa rafinowana (*Rafined olive oil*) i oliwa (*Olive oil*).

Oliwa wyciekowa (*Olive-pomace oil*, *Oilo sansa di oliva*) jest otrzymywana w wyniku ekstrakcji, a następnie rafinacji i z tego względu wyróżniamy:

- surową oliwę wyciekową (*Crude olive-pomace oil*);
- rafinowaną oliwę wyciekową (*Rafined olive-pomace oil*);
- oliwę wyciekową (*Olive-pomace oil*).

W Europie wśród olejów jadalnych oliwa z oliwek jest najbardziej popularnym olejem roślinnym po oleju rzepakowym, sojowym i słonecznikowym. Oliwa *extra virgin* jest najbardziej znanym olejem nierafinowanym. Wyniki badań naukowych potwierdzają korzystne oddziaływanie oliwy i diety śródziemnomorskiej na zdrowie, szczególnie ludności zamieszkującej tereny położone nad Morzem Śródziemnym [26] (Ryc. 2).



Ryc. 2. Właściwości biologiczne wybranych składników oliwy z oliwek.

Fig. 2. Biological properties of selected olive oil components.

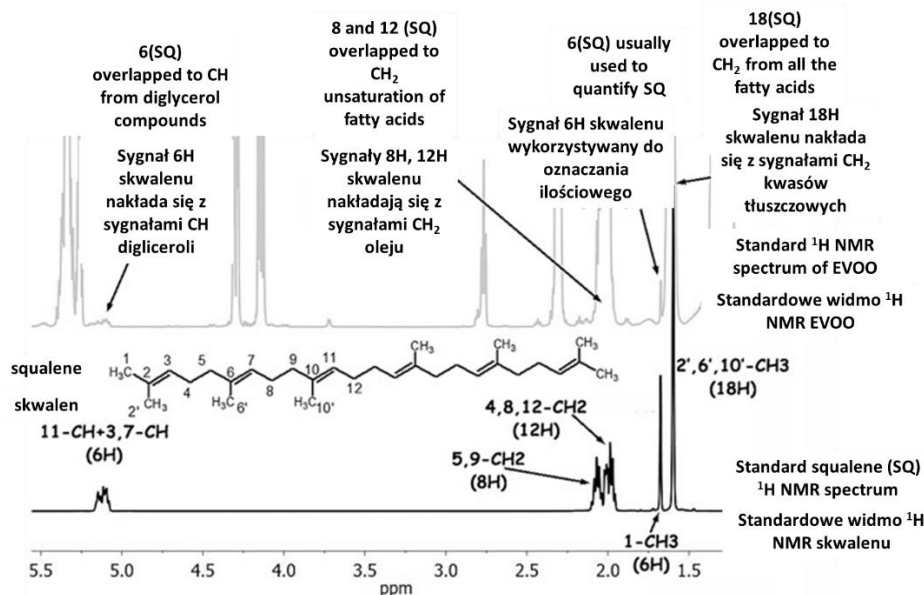
Badania WHO potwierdziły, że w okresie od 1980 do 2014 roku populacja osób otyłych podwoiła się, z czego znacząca liczba dotyczyła dzieci [22]. Przyczynia się do tego dieta wysokotłuszczowa, bogata w tłuszcze pochodzenia zwierzęcego i pochodzące od tropikalnych roślin, np. olej palmowy. Konsekwencją złego żywienia jest wiele chorób metabolicznych, m. in. cukrzyca typu 2, nadciśnienie, miażdżyca, a także zakrzepica. Od dawna uważa się dietę śródziemnomorską za przykład profilaktyki chorób cywilizacyjnych [39]. Istotnym składnikiem tej diety jest oliwa z oliwek pochodzących z odpowiedniej uprawy. Badania jednoznacznie wykazały, że na skład oliwy ma wpływ nie tylko odmiana rośliny, ale także nawodnienie rośliny oraz miejsce uprawy. Główną zaletą oliwy jest dobrze poznane działanie antyoksydacyjne, za które odpowiadają jednonienasycone kwasy tłuszczowe (mające jedno podwójne wiązanie w łańcuchu, np. kwas oleinowy), tokoferole oraz polifenole [39]. Spośród tokoferoli α -tokoferol wykazuje najsilniejsze działanie ochronne na błony komórkowe, a dzięki dodatkowej grupie fenolowej hamuje cyklooksygenazę, zwiększa odpowiedzi immunologiczne i reguluje agregację płytek krwi. Wpływa również na poziom triglicerydów w osoczu i zapobiega utlenianiu LDL, co zmniejsza ryzyko rozwoju miażdżycy oraz poprawia stan organizmu osób chorych na cukrzycę typu 2. Wykryto również, że kwas oleinowy hamuje działanie prostaglandyn, co wpływa na wzrost masy kostnej i zmniejszenie ryzyka złamań osteoporotycznych. Obiecującym odkryciem jest działanie ochronne skwalenu i polifenoli przeciw niektórym rodzajom raka. Hydroksytyrozol i oleuropeina stabilizują rodnik hydroksylowy, dlatego uczestniczą w prewencji gruczolakoraka jelita grubego. Największe znaczenie odżywcze dla człowieka posiada oliwa *extra virgin*, dlatego jest częstym tematem badań w zakresie zafałszowań przez producentów.

Badania oliwy z oliwek z zastosowaniem techniki ¹H NMR

Wraz z rosnącym zainteresowaniem konsumentów zdrowotnymi właściwościami oliwy z oliwek *Extra Virgin* (EVOO) wzrasta jego produkcja, co implikuje ryzyko fałszowania składu tego cennego produktu. Grupa z uniwersytetu w Barcelonie podjęła się tematu wykorzystania różnych metod spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w celu precyzyjnego określenia składu i pochodzenia danej oliwy z oliwek [30]. Podsumowali najważniejsze badania zawartości związków polifenolowych obecnych w EVOO, którym przypisuje się również działanie prozdrowotne.

EVOO składa się z triacylogliceroli (ponad 98%) oraz pozostałych składników (około 1 ÷ 2 %), takich jak skwalen (Ryc. 3), α -tokoferol, fitosterole, związki fenolowe, karotenoidy oraz alkohole alifatyczne i terpenowe, które stanowią niezmydlającą się frakcję oleju. Skład chemiczny tej frakcji może różnić się zarówno jakościowo, jak i ilościowo w zależności od gatunku roślin, warunków klimatycznych, procedur eks-

trakcji i rafinacji oraz warunków przechowywania [8], które również w dużym stopniu wpływają na właściwości organoleptyczne jakości i stabilność oleju.



Ryc. 3. Zastosowanie ^1H NMR w ilościowym oznaczeniu skwalenu w olejach w tym EVOO; Prawa autorskie 2017 Wiley. Wykorzystano za zgodą Archimede Rotondo i in. Quick unreferenced NMR quantification of Squalene in vegetable oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* [37].

Fig. 3. Application of ^1H NMR in the quantitative determination of squalene in oils, including EVOO; Copyright 2017 Wiley. Used with permission from Archimede Rotondo et al. Quick unreferenced NMR quantification of Squalene in vegetable oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* [37].

Wykazano, że zastosowanie metody NMR umożliwia precyzyjne zidentyfikowanie, a także oznaczenie ilości lignanów i flawonoidów obecnych w EVOO [30]. W celu uzupełnienia informacji jakościowych i ilościowych danych zastosowano metody chromatograficzne: GC-MS i półpreparatywnego HPLC. Na ich podstawie określono obecność poszczególnych substancji np. apigeniny, luteoliny, pinoresinolu, 1-acetoksy-pinoresinolu oraz syringaresinolu. Zoptymalizowano rozpuszczalniki do rejestracji widm ^1H NMR oleju EVOO. Pokazano, że rodzaj deuterowanego rozpuszczalnika wpływa na identyfikację składu oliwy. W następnych latach wykorzystano tę metodę do oznaczenia ilościowego aglikonu ligustrozydu w EVOO pochodzenia greckiego, kalifornijskiego, hiszpańskiego, włoskiego i z oliwek Hojiblanca [35]. Wykorzystano również metodę ^1H NMR do ilościowego oznaczenia alkoholi i kwasów fenolowych: waniliny, kwasu p-kumarowego, alkoholu homowanilinowego [30].

Istotną trudnością w oznaczeniu ilościowym NMR okazały się nakładające się sygnały związków obecnych w złożonych mieszaninach. W tym celu opracowano

techniki wielowymiarowe, które niwelowały nakładające się sygnały i wysoką gęstość spektralną. Przykładem takiej metody jest MaxQ NMR, czyli NMR w maksimum kwantowym [30], która skupia się na sygnałach sześcioczłonowych pierścieni aromatycznych, m. in. polifenoli. Dzięki wysokiej czułości i brakowi wymogu fizycznego rozdzielania polifenoli z mieszaniny może znaleźć zastosowanie w badaniach jakościowych oliwy z oliwek oraz pozwoli określić jej wiek, pochodzenie, a także stwierdzić, czy została zafałszowana.

Zespół profesora Photisa Daisa przeprowadził szczegółowy przegląd opisanych dotychczas artykułów na temat użytych metod spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w celu określenia jakości EVOO [10]. Uczni wskazali problemy, jakie mogą wystąpić podczas oznaczeń z wykorzystaniem metody ¹H NMR oraz porównali wyniki uzyskane z techniki ¹H NMR z innymi metodami instrumentalnymi. Zwrócili uwagę, że dostępne szeregi operacji matematycznych są pracochłonne, trudne do zrozumienia, a nawet czasem są błędnie opisane. Jedną z form uniknięcia pomyłek w odczycie widma NMR jest łączenie różnych metod analitycznych. W praktyce w badaniu olejów stosuje się często połączenie chromatografii gazowej i NMR. Chromatografia gazowa (GC) w porównaniu z NMR wymaga jednak wstępnej obróbki, derywatywacji i ekstrakcji próbki, co jest czasochłonne i nie pozwala na wysoką powtarzalność wyników. Dodatkowo problemem są jednostki, którymi wyraża się wyniki ilościowe – GC wykorzystuje procenty masowe, a NMR – stężenia względne w procentach molowych. Korzystniejszą jednostką okazują się jednostki wagowe, które w przystępniejszy sposób informują konsumenta o wartościach odżywczych produktu. Jednak istotną zaletą metody ¹H NMR jest oznaczanie steroli roślinnych. Uzyskane wyniki są niemal identyczne jak przy GC, a czas analizy skraca się z połowy dnia do połowy godziny.

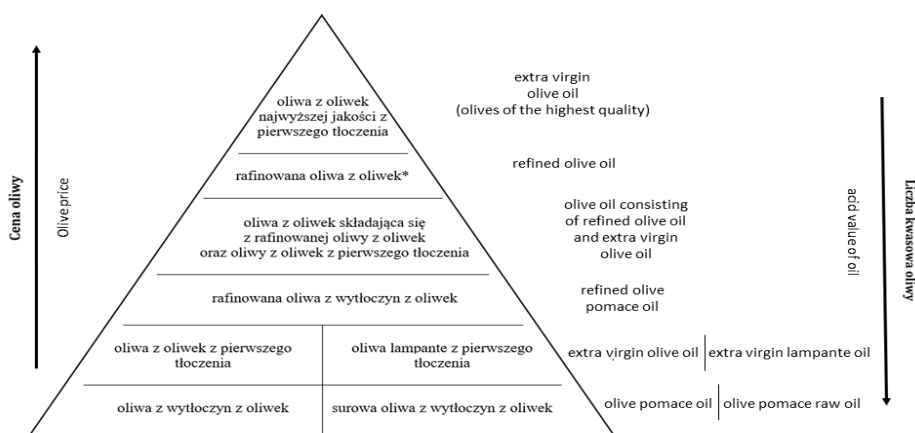
Choć od opublikowania tego artykułu minęło już 10 lat, to problem jest nadal aktualny. Świadczą o tym liczne doniesienia naukowe pojawiające się na przestrzeni ostatnich lat, opisujące zastosowanie techniki ¹H NMR w badaniach EVOO. Obecnie wykorzystuje się analizę ¹H NMR do badania mieszanek oliwy z oliwek [7, 15], oceny pochodzenia geograficznego [21], badania profilu związków występujących w niewielkich ilościach w oliwie (steroli, skwalenu, alkoholi tłuszczowych, wosków, polifenoli) [30, 38] czy badania stabilności oliwy podczas przechowywania [1].

Na podstawie analizy widm ¹H NMR jesteśmy w stanie wykazać istotne różnice w profilu związków steroidowych, które najprawdopodobniej są związane z odmianą EVOO, pochodzeniem geograficznym i stopniem dojrzałości. Jedną z modyfikacji metod jest dodanie jonów srebra w postaci AgFOD (FOD = 4,4,5,5,6, 6,6-heptafluoro-1-(2-tienylo)-1,3-heksanedienon). W widmach rejestrowanych przy 300 MHz otrzymano wyraźnie rozdzielone sygnały protonów allilowych, co wynikało z różnych sił kompleksowania jonami srebra (nasycenie wiązań *cis* i *trans*). Takie podejście anali-

tyczne mogłoby mieć szczególne zastosowanie w przemyśle spożywczym ze względu na stosunkowo niski czas i koszty [10].

EVOO swoje odżywcze właściwości zawdzięcza bogatemu składowi w aktywne metabolity, które przy zastosowaniu metod chemometrycznych i ^1H NMR można określić profilowaniem metabolicznym. Powstające widma charakteryzują się wysoką czułością i rozdzielczością. Wyróżnia się dwa kierunki metabonomiki: profilowanie celowe, metaboliczne i metabonomię ilościową, które wykrywają i oznaczają ilościowo wybrane metabolity w widmie oraz *metabolic fingerprinting*, który traktujemy jako chemiczny odcisk palca EVOO. Metaboliczny odcisk palca nie wymaga szczegółowej analizy poszczególnych sygnałów w widmie i analizy ilościowej, dlatego jest obiecującą metodą do identyfikacji surowców ze względu na różne kryteria pochodzenia w celu określenia np. autentyczności produktu.

Ważną kwestią w przypadku oliwy z oliwek jest aspekt regulacji kwalifikacji oliwy z oliwek przez różne organizacje. Komisja Unii Europejskiej wyróżnia osiem klas oliwy z oliwek, z których każda ma swoje normy jakości odnoszące się do właściwości fizykochemicznych i organoleptycznych (Ryc. 4). Dostępne bazy zawierające charakterystykę oliwy muszą być jednak co roku aktualizowane ze względu na postępujące zmiany klimatyczne, które oddziałują na wzrost roślin.



Ryc. 4. Rodzaje klas oliwy z oliwek według Unii Europejskiej [46].

Fig. 4. Types of olive oil grades according to the European Union [46].

Do oceny jakości oraz identyfikacji olejów i tłuszczów stosuje się oznaczenia takie jak m.in. [43]:

- liczba jodowa, która jest miernikiem stopnia nienasylenia tłuszczu,
- liczba nadtlenkowa, która jest wskaźnikiem stopnia utlenienia, czyli zjełczenia tłuszczu,

- liczba kwasowa, która pozwala ocenić udział wolnych kwasów tłuszczowych w badanej masie tłuszczu.

W ocenie jakości oliwy z oliwek często ocenia się kwasowość w procentach w przeliczeniu na kwas oleinowy [3]. Im niższa wartość kwasowości, tym lepsza jakość użytych surowców do produkcji oliwy. Należy jednak pamiętać, że rafinacja znacząco obniża kwasowość, ale nie poprawia właściwości oliwy.

Typy zafałszowań oliwy z oliwek

Oliwa z oliwek jest bardzo cennym surowcem i dzięki swojej rosnącej popularności w różnego rodzaju dietach jest narażona na częste fałszowanie w celu zwiększenia nieetycznie zysków. Nieukierunkowane podejście analizy NMR pozwala na zbadanie całego zestawu cząstek obecnych w próbce, co jest wykorzystywane w klasyfikacji oliwy. Zauważono, że odmiany botaniczne oliwek różnią się ilością triacylogliceroli, w tym celu poddano analizie ¹H NMR trzynaście olejów, m. in. olej rzepakowy, kukurydziany, arachidowy, sezamowy, oliwkowy i słonecznikowy, aby wyróżnić kluczowe różnice w widmach różnych olejów [44]. Zafałszowanie do 10 % rafinowanym olejem z orzechów laskowych było możliwe do wykrycia, a 84,92 % wynosiła dokładność w identyfikacji zafałszowania mieszkanką trzech nasion. Połączenie metody ¹H NMR z ³¹P NMR wykazała dolną granicę zafałszowania do 5 %. W innym ośrodku badacze podjęli się sklasyfikowania 200 próbek komercyjnych 100-procentowo włoskich mieszanek oliwy z oliwek, które obejmowały 126 oliw monokulturowych. Uzyskano bazę danych, która zawierała scharakteryzowane oliwy w zależności od zbiorów i stworzyła użyteczne narzędzie w weryfikacji potencjalnych zafałszowań [36].

W innym badaniu analizowano dwadzieścia osiem oliw z oliwek [34]. W tym celu poddano analizie ¹H NMR dziesięć olejów z nasion oraz siedem jednogatunkowych i mieszanych oliw EVOO w celu zbadania oliw fałszowanych innymi olejami. Wyniki zestawiono z użyciem analizy głównych składowych (PCA). Jedną z form fałszowania oliwy jest rozcieńczenie oliwy lub całkowite zastąpienie jej innymi olejami, co może się wiązać z ryzykiem np. reakcji alergicznej u pacjentów z nadwrażliwością na zatajone substancje. Oleje ze słonecznika i krokosza barwierskiego charakteryzuje podobny skład do oliwy z oliwek, ale można je rozróżnić, analizując stosunek zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju, szczególnie stosunku ALA do kwasu oleinowego. Dla oliwy charakterystyczne jest wysokie stężenie kwasu oleinowego przy niskim poziomie ALA.

Wyniki powyższego badania z zastosowaniem PCA wykazały, że widma olejów z nasion wyraźnie różniły się od widm oliwy z oliwek. Region odpowiadający za identyfikację oleju z orzechów laskowych przesunął się wraz ze stężeniem oliwy z oliwek. Do rozcieńczenia oliwy najprawdopodobniej użyto czterech olejów: arachidowego, krokoszowego, słonecznikowego lub rzepakowego. Z dwudziestu ośmiu deklarowa-

nych oliw z oliwek aż dwie okazały się zafałszowane. Pierwszą próbkę rozcieńczono olejem arachidowym lub olejem z pestek winogron. Druga próbka najpewniej została zafałszowana mieszanką różnych olejów.

Możliwe jest również fałszowanie oliwy oliwami pochodzącymi z innych regionów. Analiza oliwy z oliwek pod względem pochodzenia geograficznego różnych regionów Libanu wykazała wzrost stężenia jednonienasyconych kwasów tłuszczowych na północy Libanu [28]. W badaniach autentyczności przebadano 12 oliw z Włoch, Grecji, Tunezji i Hiszpanii oraz 25 komercyjnie dostępnych włoskich oliw z oliwek [9]. Zastosowano metodę ^1H NMR. Uzyskane wyniki wykazały, że większość oliw zawiera składniki charakterystyczne dla oliwy z Grecji i Hiszpanii. Dodatkowo wykryto, że włoskie EVOO charakteryzuje się wyjątkowo wysoką zawartością kwasu oleinowego oraz polifenoli. Kwas oleinowy należy do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych typu n-9. Na skład oliwy wpływa również metoda ekstrahowania – metoda ultradźwiękowa z ekstrakcją w wymienniku termicznym zwiększyła ilość biofenoli w oliwie.

Opisane badania obrazują jak bardzo powszechne jest fałszowanie oliw oraz aplikacyjne zastosowanie metody NMR w celu rozróżniania olejów, w tym przypadku z krokosza barwierskiego i słonecznikowego. Problem fałszowania powinien być nagłaśniany, aby konsumenci byli świadomi potencjalnego ryzyka dla zdrowia.

Olej konopny

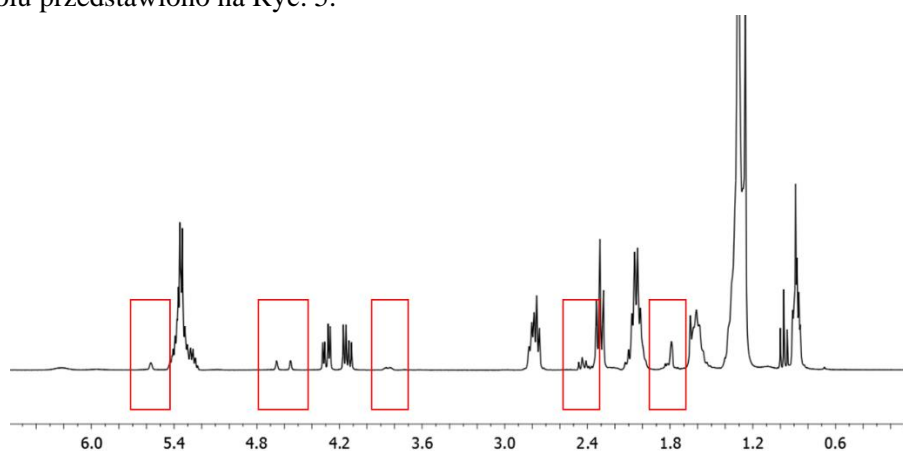
Innym olejem cieszącym się popularnością w ostatnich czasach jest olej konopny, który od niedawna jest wykorzystywany w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz kosmetycznym. Za korzystne działanie na organizm odpowiada optymalny stosunek kwasów tłuszczowych n-6 do n-3 (3:1) [27].

Olej z nasion konopi wykazuje właściwości prozdrowotne ze względu na wysoką zawartość niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych. W około 80 % składa się z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) [24], w tym m.in. LA i ALA. Stosunek LA:ALA wynosi ok. 3:1, jak rekomenduje się w zdrowej diecie. W 2012 roku Porto i in. opisali skład kwasów tłuszczowych oleju konopnego ekstrahowanego CO_2 w stanie nadkrytycznym [33]. Tak otrzymany olej charakteryzuje się wyższą zawartością PUFA: LA (59,23 ÷ 59,77 %), ALA (17,95 ÷ 18,20 %) oraz stopieniem nienasylenia aż do 92 %.

W celu weryfikacji profilu kwasów tłuszczowych oraz wpływu pozostałych czynników wpływających na jakość oleju wykorzystano szybką metodę analizy jakościowej, jaką jest ^1H NMR [41]. Zastosowano również technikę ^1H NMR do badania jakości oleju konopnego od razu po otwarciu opakowania oraz trzydzieści dni po otwarciu przechowywanych w dwóch przedziałach temperaturowych: $2 \pm 8^\circ\text{C}$ i $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Pierwsze widma różniły się między sobą, co mogło być spowodowane innym zastoso-

waniem olejów i różnym pochodzeniem wykorzystanych surowców. Różnice wystąpiły również w intensywności sygnałów dla tych samych próbek po okresie trzydziestu dni. Istotne były warunki przechowywania oleju przez wysoką zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych, które powinny być kontrolowane.

Technika ¹H NMR umożliwia również stwierdzenie obecności, a nawet oznaczenie ilości kannabinoidów obecnych w oleju. Może być stosowana w analizie oleju wzbogacanego w kannabidiol, zyskującego coraz większą popularność wśród konsumentów. Widmo oleju konopnego z widocznymi sygnałami pochodzącymi od kannabidiolu przedstawiono na Ryc. 5.



Ryc. 5. Widmo ¹H NMR (CDCl₃) oleju konopnego wzbogacanego w CBD (kannabidiol); sygnały pochodzące od CBD zaznaczono.

Fi. 5. ¹H NMR spectrum (CDCl₃) of CBD (cannabidiol) enriched hemp-seed oil; resonances from CBD are marked.

Zainteresowanie badaniem i potwierdzeniem składu obecnych na rynku olejów cały czas rośnie, a wykorzystywanie olejów roślinnych w kosmetykach stało się atrakcyjną cechą produktu. Konsumenty chętniej wybierają produkty pochodzenia naturalnego, zwłaszcza nowe tropikalne odmiany roślin. Producenci, chcąc zwiększyć swoje zyski, często korzystają z nielegalnych modyfikacji składu produktu lub rezygnują z kontroli warunków ich przechowywania.

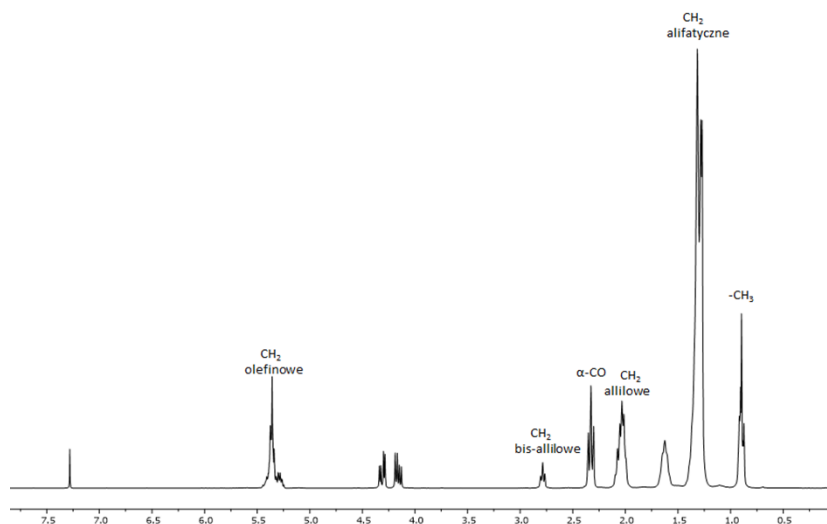
Ocena jakości olejów w kosmetyce

Od setek lat oleje roślinne są dość powszechnie stosowane w kosmetyce. Dobrym przykładem takiego oleju jest olej arganowy otrzymywany z nasion drzewa arganii żelaznej (*Argania spinosa*) [16]. Drzewo arganowe należy do endemitów i rośnie wyłącznie w południowo-zachodniej części Maroka, dlatego jest też tak cennym surowcem do pozyskiwania oleju, który narażony jest na fałszowanie składu w celach zarob-

kowych. To niezwykle odporne drzewo było również uprawiane doświadczalnie w górzystych regionach Izraela. Roślina ta, ze względu na olej, znalazła zastosowanie w afrykańskiej medycynie ludowej.

Tradycyjnie olej był pozyskiwany przez berberyjskie kobiety poprzez prażenie nasion na wolnym ogniu. Następnie były wyrabiane w kamiennym młynie z ciepłą wodą i rozdzielany z frakcji płynnej na drodze dekantacji. Obecnie na skalę produkcyjną wykorzystuje się metodę tłoczenia nasion na zimno. Charakteryzuje go skład bogaty w substancje aktywne takie jak: nienasycone kwasy tłuszczowe typu n-9 i n-6 (w tym kwas oleinowy w ilości ok. 50%), tokoferole (głównie γ -tokoferol) czy polifenole (kwas ferulowy). Olej arganowy zawiera także skwalen (węglowodór wykazujący podobieństwo do karotenów i koenzymu Q10) [29]. Składniki te odpowiadają za nawilżenie, ochronę błon komórkowych przed utlenianiem lipidów i działaniem reaktywnych form tlenu.

Olej arganowy jest szeroko stosowany w przemyśle kosmetycznym i dlatego nieustannie rośnie popyt na jego produkcję, co może prowadzić do zafałszowań składu oleju w celach ekonomicznych [19]. Obok badań składu i autentyczności celem prowadzonych badań jest także określenie stabilności oksydacyjnej olejków arganowych za pomocą pomiarów nadtlenu i wodoronadtlenków sprzężonych dienów jako wskaźników analitycznych, zarówno olejów arganowych spożywczych, jak i kosmetycznych. Ich stabilność oksydacyjną określono również przez monitorowanie względnych zmian ich profili kwasów tłuszczowych za pomocą ^1H NMR [23]. Wykazano, że



Ryc. 6. Widmo ^1H NMR oleju arganowego w CDCl_3 .

Fig. 6. ^1H NMR spectrum of argan oil in CDCl_3 .

produkty kosmetyczne i spożywcze mają podobny profil i zawartość przeciwutleniaczy fenolowych, witamin i skwalenu. Niemniej jednak wskazano, że stosunek alifatycznych do bisallilowych grup CH₂ kwasów tłuszczowych jest znacznie wyższy w olejach arganowych niż w innych olejach roślinnych (Ryc. 6), co prawdopodobnie ma związek z ich wyższą stabilnością termiczną. Względne ilości alifatycznych grup CH₂ w stosunku do bisallilowych, określone przez ¹H NMR dla czterech różnych olejów roślinnych i arganowego [23] wynoszą: 33,6 % dla oleju rzepakowego, 12,5 % dla sojowego, 23,2 % dla słonecznikowego [31] i 37,3 % dla arganowego.

Typowy olej arganowy, składa się głównie z mieszanych estrów triacylogliceroli (TAG) jednonienasyconych (MUFA), wielonienasyconych (PUFA) i nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA). Olej zawiera też w mniejszej ilości składniki takie, jak wolne kwasy tłuszczowe, polifenole, tokoferole, sterole, skwaleń i alkohole triterpenowe. Do badania składu oleju arganowego stosowano różne techniki analityczne (HPLC, LC-MC oraz spektroskopię NMR). Nadal istnieje zapotrzebowanie na proste, solidne i tanie metody analityczne, którymi moglibyśmy sprawdzić i zapewnić jakość produktu oraz wykryć zafałszowania na poziomach istotnych z handlowego punktu widzenia. Analizując widma ¹H NMR autentycznych czterdziestu siedmiu olejów arganowych, trzydziestu sześciu mieszanek oleju arganowego i oleju słonecznikowego (zmieszanych w różnych proporcjach wagowych) oraz dwudziestu ośmiu olejów arganowych z deklarowanym przez producenta czystym składem wykazano, że w przypadku widm autentycznego oleju arganowego występują wysokie zawartości jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (głównie oleinowego). Na tej podstawie określono profile jednonienasyconych (MUFA), wielonienasyconych (PUFA) i nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) obecnych w tym oleju [19]. Najbardziej stabilne są kwasy tłuszczowe nasycone i jednonienasycone, a najmniej – wielonienasycone. Do tłuszczów jednonienasyconych zaliczamy takie jak m.in.: kwas oleinowy, kwas palmitynooleinowy, kwas erukowy. Natomiast do zbioru związków określanymi jako PUFA (kwasów wielonienasyconych) zaliczamy min: LA, ALA, GLA, EPA (kwas eikozapentaenowy), DHA (kwas dokozaheksaenowy). Trzy badane oleje wykazały wyższe wartości nasyconych kwasów tłuszczowych przy zachowaniu odpowiedniego stosunku jednonienasyconych do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych charakterystycznego dla oleju arganowego. Ponadto widma przedstawiały niezidentyfikowane sygnały, które sugerują obecność dodatkowych substancji. Ostateczne wyniki tego badania potwierdziły autentyczność składu dla dwudziestu czterech olejów, a cztery z nich uznano za zafałszowane innymi olejami roślinnymi ze względu na wysokie zawartości ALA, który naturalnie w oleju arganowym występuje w ilościach śladowych.

Podsumowanie

O jakości i pochodzeniu oleju roślinnego decydującym głównym parametrem jest skład kwasów tłuszczowych. Szablonową metodą analityczną wykorzystywaną w celu określenia składu kwasów tłuszczowych jest chromatografia gazowa (GC). Jednakże w ciągu ostatnich 20 lat wykazano, iż metoda magnetycznego rezonansu jądrowego, a w szczególności ^1H NMR uzyskała znaczenie również w tych badaniach. Oleje można badać zarówno jakościowo, jak i ilościowo, biorąc pod uwagę zarówno profil kwasów tłuszczowych, jak i poziom składników drugorzędnych. W połączeniu z metodami statystycznymi i chemometrycznymi analiza widm ^1H NMR pozwala na uzyskanie wielu cennych informacji o badanym oleju pod kątem jego składu, jakości, obecności zanieczyszczeń czy pochodzenia. W pracy przedstawiono przegląd publikacji poświęconych zastosowaniu metody ^1H NMR w profilowaniu kwasów tłuszczowych w wybranych olejach roślinnych. Znajomość profilu substancji aktywnych w danym produkcie to klucz do klasyfikowania i oceny jego jakości. Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego w analizie produktów spożywczych jest potężnym narzędziem do wykrywania zafałszowań. Doskonale nadaje się do analiz tego typu produktów ze względu na dużą przepustowość próbek, możliwość rozróżniania na podstawie różnic strukturalnych metabolitów o podobnych masach oraz możliwość badania próbek zarówno w stanie natywnym, jak i przy niewielkim ich przygotowaniu.

Literatura

- [1] Alonso-Salces R.M., Gallo B., Collado M.I., Sasía-Arriba A., Viacava G.E., García-González D.L., Toschi T.G, Servili M., Berrueta L. Á.: ^1H -NMR fingerprinting and supervised pattern recognition to evaluate the stability of virgin olive oil during storage. *Food Control*, 2021, 123, 1-13.
- [2] Alonso-Salces R.M., Moreno-Rojas J.M., Holland V.M., Reniero F., Guillou C., Serra F., Segebarth, N.: *NMR and Isotopic Fingerprinting for Food Characterisation*. European Commission, 2007, EUR 22724, 1-24.
- [3] Aydar A., Bağdatlıoğlu N., Köseoğlu O.: Effect of ultrasound on olive oil extraction and optimization of ultrasound-assisted extraction of extra virgin olive oil by response surface methodology (RSM). *Grasas y Aceites*, 2017, 68 (2), 1-11.
- [4] Barceló-Coblijn G., Murphy E.J.: Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress Lipid Res.*, 2009, 48 (6), 355-374.
- [5] Barthlott I., Scharinger A., Golombek P., Kuballa T., Lachenmeier D.W.: A quantitative ^1H NMR method for screening cannabinoids in CBD oils. *Toxics*, 2021, 9 (6), 1-20.
- [6] Bourafai-Aziez A., Jacob D., Charpentier G., Cassin E., Rousselot G., Moing A., Deborde C.: Development, Validation, and Use of ^1H -NMR Spectroscopy for Evaluating the Quality of Acerola-Based Food Supplements and Quantifying Ascorbic Acid. *Molecules*, 2022, 27 (17), 5614, 1-19.
- [7] Calò F., Girelli C.R., Angilè F., Del Coco L., Mazzi L., Barbini D., Fanizzi F.P.: ^1H -NMR profiling shows as specific constituents strongly affect the international EVOO blends characteristics: The case of the Italian oil. *Molecules*, 2021. 26 (8), 1-15.

- [8] Cañabate-Díaz B., Carretero A.S., Fernández-Gutiérrez A., Vega A.B., Frenich A.G., Vidal J.M., Martos J.D.: Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chem.*, 2007, 102 (3), 593-598.
- [9] Del Coco L., Schena F.P., Fanizzi F.P.: ¹H nuclear magnetic resonance study of olive oils commercially available as Italian products in the United States of America. *Nutrients*, 2012, 4 (5), 343-355.
- [10] Dais P., Hatzakis E. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. *Anal. Chim. Acta*, 2013, 765, 1-27.
- [11] Eads T.M., Croasmun W.R.: NMR applications to fats and oils. 1988.
- [12] Ellis D.I., Dunn W.B., Griffin J.L., Allwood J.W., Goodacre, R.: Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenom.*, 2007 8 (9), 1243-1266.
- [13] Fotakis C., Kokkotou K., Zoumpoulakis P., Zervou M.: NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview. *Food Res. Inter.*, 2013, 54 (1), 1184-1194.
- [14] Gertig H.: Bromatologia. Zarys nauki o żywności i żywieniu. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2015.
- [15] Girell, C.R., Calò F., Angilè F., Mazzi L., Barbini D., Fanizzi F.P.: ¹H NMR spectroscopy to characterize Italian extra virgin olive oil blends, using statistical models and databases based on monocultivar reference oils. *Foods*, 2020, 9 (12), 1-15.
- [16] Guillaume D. Charrouf Z.: Argan oil and other argan products: Use in dermocosmetology. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, 113 (4), 403-408.
- [17] Guillén M.D., Ruiz A.: High resolution ¹H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends Food Sci. Technol.*, 2001, 12 (9), 328-338.
- [18] Guillén M.D., Ruiz A.: Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2003, 105 (11), 688-696.
- [19] Gunning Y., Jackson A.J., Colmer J., Taous F., Philo M., Brignall R.M., El Ghali T., Defernez M., Kemsley E.K.: High-throughput screening of argan oil composition and authenticity using benchtop ¹H NMR. *Magnetic Resonance Chem.*, 2020, 58 (12), 1177-1186.
- [20] Hatzakis E.: Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in food science: A comprehensive review. *Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2019, 18 (1), 189-220.
- [21] Ingallina C., Cerreto A., Mannina L., Circi S., Vista S., Capitani D., Spano M., Sobolev A.P., Marini, F.: Extra-virgin olive oils from nine Italian regions: An ¹H NMR-chemometric characterization. *Metabolites*, 2019, 9 (4), 1-12.
- [22] Kengne A.P., Benthani J. i in. Trends in obesity and diabetes across Africa from 1980 to 2014: an analysis of pooled population-based studies. *Int. Epidemiol.*, 2017, 46 (5), 1421-1432.
- [23] Khallouki F., Mannina L., Viel S., Owen R.W.: Thermal stability and long-chain fatty acid positional distribution on glycerol of argan oil. *Food Chem.*, 2008, 110 (1), 57-61.
- [24] Kolanowski W., Długolancuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3-znaczenie zdrowotne w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2007, 40 (3), 229-237.
- [25] Krishnan P., Kruger N., Ratcliffe R.: Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J. Exp. Botany*, 2005, 56 (410), 255-265.
- [26] Lairon D., Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, 51 (10), 1209-1214.
- [27] Leizer C., Ribnicky D., Poulev A., Dushenkov S., Raskin I.: The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *J. Nutraceuticals, Funct. Med. Foods*, 2000, 2 (4), 35-53.
- [28] Merchak N., El Bacha E., Khouzam R.B., Rizk T., Akoka S., Bejjani J: Geoclimatic, morphological, and temporal effects on Lebanese olive oils composition and classification: A ¹H NMR metabolomic study. *Food Chem.*, 2017, 217, 379-388.

- [29] El Monfalouti H., Guillaume D., Denhez C., Charrouf Z.: Therapeutic potential of argan oil: a review. *J.Pharm. Pharmacol.*, 2010, 62 (12), 1669-1675.
- [30] Olmo-Cunillera A., López Yerena A., Lozano Castellón J., Tresserra Rimbau A., Vallverdú Queralt A., Pérez M.: NMR spectroscopy: A powerful tool for the analysis of polyphenols in extra virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.*, 2020, 100 (5), 1842-1851.
- [31] Owen R., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Bartsch H.: Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.* 2000, 38 (8), 647-659.
- [32] Di Pietro M.E., Mannu A., Mele A.: NMR determination of free fatty acids in vegetable oils. *Processes*, 2020, 8 (4), 1-15.
- [33] Da Porto C., Decorti D., Tubaro F.: Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Ind. Crops Prod.*, 2012, 36 (1), 401-404.
- [34] Ray C.L., Gawenjs J.A., Greenleaf C.M., A new method for olive oil screening using multivariate analysis of proton NMR spectra. *Molecules*, 2021, 27 (1), 1-13.
- [35] Romero C., Brenes M., Yousfi K., García P., García A., Garrido, A.: Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (3), 479-484.
- [36] Rongai D., Sabatini N., Del Coco L., Perri E., Del Re P., Simone N., Marchegiani D., Fanizzi, F.P.: ¹H NMR and multivariate analysis for geographic characterization of commercial extra virgin olive oil: A possible correlation with climate data. *Foods*, 2017, 6 (11), 1-10.
- [37] Rotondo A., Salvo A., Gallo V., Rastrelli L., Dugo G.: Quick unreferenceed NMR quantification of Squalene in vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2017, 119 (11), 1-6.
- [38] Ruiz-Aracama A., Goicoechea E., Guillén M.D.: Direct study of minor extra-virgin olive oil components without any sample modification. ¹H NMR multisuppression experiment: A powerful tool. *Food Chem.*, 2017, 228, 301-314.
- [39] De Santis S., Clodoveo M.L., Corbo F.: Correlation between chemical characterization and biological activity: an urgent need for human studies using extra virgin olive oil. *Antioxidants*, 2022, 11 (2), 1-11.
- [40] Siudem P., Wawer I., Paradowska K.: Rapid evaluation of edible hemp oil quality using NMR and FT-IR spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 2019, 1177, 204-208.
- [41] Siudem, P., Zielinska A., Kowalska V., Paradowska K.: ¹H NMR and chemometric methods in verification of hemp-seed oil quality. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2022, 212, 1-5.
- [42] Shi T., Zhu M., Zhou X., Huo X., Long Y., Zeng X., Chen Y.: ¹H NMR combined with PLS for the rapid determination of squalene and sterols in vegetable oils. *Food Chem.* 2019, 287, 46-54.
- [43] Triyasmono L., Schollmayer C., Schmitz J., Hovah E., Lombo C., Schmidt S., Holzgrabe U.: Simultaneous determination of the saponification value, acid value, Ester value, and iodine value in commercially available red fruit oil (*Pandanus conoideus*, lam.) using ¹H qNMR spectroscopy. *Food Anal. Methods*, 2023, 16 (1), 155-167.
- [44] Vigli G., Philippidis A., Spyros A., Dais P.: Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51 (19), 5715-5722.
- [45] Worldwide production major vegetable oils, <https://www.statista.com/statistics/263933/production-of-vegetable-oils-worldwide-since-2000/>, [dostęp 2023-09-11].
- [46] Wspólne Rozporządzenie Delegowane Komisji Europejskiej, 2022/2104 z dnia 29 lipca 2022 r. uzupełniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1308/2013 w odniesieniu do norm handlowych dotyczących oliwy z oliwek oraz uchylające rozporządzenie Komisji (EWG) nr 2568/91 i rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) nr 29/2012.

- [47] Wu G., Han S., Li X., Karrar E., Xu L., Jin Q., Zhang H., Wang, X.: Effect of the phenolic extract of *Camellia oleifera* seed cake on the oxidation process of soybean oil by 1H nuclear magnetic resonance during frying. LWT-Food Sci. Technol., 2021., 150, 1-9.

¹H NMR AS A TOOL FOR VEGETABLE OIL QUALITY ASSESSMENT

S u m m a r y

Background. Vegetable oils play an important role in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. They are not only a source of nutrients, but also a carrier of bioactive substances as an ingredient of creams or emulsions. Some oils, like extra virgin olive oil or argan oil, due to high consumer demand and high prices, may be subject to adulteration by using cheaper and easily accessible oils. Hence, the need to develop new research methods enabling the quick identification of such adulterations, but also enabling the assessment of oil quality, e.g. in variable storage conditions. Typically, gas chromatography (GC) is used to assess the profile of fatty acids. Oil parameters such as acid number, peroxide value and iodine number are also assessed to determine oil quality. Nevertheless, instead of performing all the above-mentioned tests, these parameters can also be determined directly from ¹H NMR spectra. Hence, there is great potential for using this method in quick screening of oil quality. The ¹H NMR technique has been growing in importance in recent years in researching the quality and composition of food, including vegetable oils. Multidimensional NMR techniques and analysis of other nuclei (¹³C NMR) are also used in the study of oils. The aim of this work is to present the applications of the most commonly used ¹H NMR technique.

Results and Conclusions. The article contains examples of the application of this method in testing the composition, quality and authenticity of olive oil, hemp oil and argan oil as oils used (both in the food, medical or cosmetic context) and becoming more and more popular among consumers.

Key words: ¹H NMR, vegetable oils, olive oil, hemp oil, argan oil 