Optimizacija i validacija HS SPME GC MS metode za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu

Lovrić, Anja-Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:504396

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016. Anja-Matea Lovrić

700/USH

OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA HS-SPME/GC-MS METODE ZA ODREĐIVANJE ALKOHOLA, PIRAZINA I FURANA U BEZGLUTENSKOM KRUHU

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Hruškar Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i uz pomoć stručne suradnice Saše Ajredini, mag. ing.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno podrucje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA HS-SPME/GC-MS METODE ZA ODREĐIVANJE ALKOHOLA, PIRAZINA I FURANA U BEZGLUTENSKOM KRUHU

Anja-Matea Lovrić, 700/USH

Sažetak: *Cilj ovog istraživanja bilo je provesti optimizaciju i validaciju metode za određivanje spojeva iz skupine alkohola (17), pirazina (4) i furana (3) u uzorcima bezglutenskog kruha pomoću mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (HS-SPME) i plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS). Optimizacija metode obuhvaćala je ispitivanje utjecaja temperature (40, 50 i 60 °C) i vremena ekstrakcije (30, 45 i 60 min) na količinu ekstrahiranih ciljanih spojeva. Validacija metode je provedena pri optimalnim uvjetima mikroekstrakcije, pri čemu su ključni parametri validacije bili selektivnost, linearnost, preciznost te granica detekcije i granica kvantifikacije. Temperatura 60 °C i vrijeme 60 min pokazali su se optimalnim uvjetima za provođenje mikroekstrakcije ciljanih spojeva. Rezultati provedenih validacijskih eksperimenata dokazali su da je metoda selektivna, linearna unutar radnog područja, precizna i osjetljiva pri određivanju svih ciljanih spojeva. Budući da su zadovoljeni svi postavljeni kriteriji prihvatljivosti, može se zaključiti da je optimizirana HS-SPME/GC-MS metoda prikladna za određivanje alkohola, pirazina i furana u bezglutenskom kruhu.*

Ključne riječi: *aromatski spojevi, bezglutenski kruh, HS-SPME/GC-MS, optimizacija, validacija*
Rad sadrži: 62 stranice, 76 slika, 7 tablica, 56 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar*
Pomoć pri izradi: *Saša Ajredini, mag. ing., stručni suradnik*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Doc. dr. sc. *Marina Krpan*
2. Prof. dr. sc. *Mirjana Hruškar*
3. Izv. prof. dr. sc. *Damir Stanzer*
4. Doc. dr. sc. *Leo Gracin* (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF HS-SPME/GC-MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF ALCOHOLS, PYRAZINES AND FURANS IN GLUTEN-FREE BREAD

Anja-Matea Lovrić, 700/USH

Abstract: *The aim of this study was to optimize and validate the method for the determination of alcohols (17), pyrazines (4) and furans (3) in gluten-free bread using solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Method optimization included determination of the influence of different temperatures (40, 50 and 60 °C) and extraction times (30, 45 i 60 min) on the amount of extracted compounds. Method was validated under optimal microextraction conditions, while key validation parameters were selectivity, linearity, and precision, limit of detection and limit of quantification. Temperature of 60 °C and time 60 min showed to be optimal conditions for microextraction of target compounds. Results of validation experiments confirmed method's selectivity, linearity under working range, precision and sensitivity in determination of all target compounds. Since all validation citeria have been met, it can be concluded that optimized HS-SPME/GC-MS method is suitable for determination of alcohols, pyrazines and furans in gluten-free bread.*

Keywords: *aroma compounds, gluten-free bread, HS-SPME/GC-MS, optimization, validation*
Thesis contains: 62 pages, 76 figures, 7 tables, 56 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Mirjana Hruškar, Full professor*
Technical support and assistance: *Saša Ajredini, BSc, Research assistant*

Reviewers:
1. PhD. *Marina Krpan,* Assistant professor
2. PhD. *Mirjana Hruškar,* Full professor
3. PhD. *Damir Stanzer,* Associate professor
4. PhD. *Leo Gracin,* Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 29 September 2016

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. BEZGLUTENSKI KRUH 2

2.2. METODE ODREĐIVANJA HLAPLJIVIH SPOJEVA U KRUHU 5

2.2.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi 6

2.2.2. Plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) 7

2.3. VALIDACIJA METODE 8

2.3.1. Selektivnost 9

2.3.2. Linearnost i područje 10

2.3.3. Preciznost 10

2.3.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO 13

3.1. MATERIJALI I METODE 13

3.1.1. Priprema 20 %-tne otopine soli 13

3.1.2. Priprema otopine za analizu 13

3.2. EKSTRAKCIJA I ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA 15

3.2.1. Izdvajanje hlapljivih spojeva 15

3.2.2. GC-MS analiza 15

3.2.3. Linearni retencijski indeks 16

3.2.4. Identifikacija hlapljivih spojeva 16

3.3. VALIDACIJA METODE 16

3.3.1. Selektivnost 17

3.3.2. Linearnost 18

3.3.3. Preciznost 19

3.3.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije 20

3.3.5. Analiza i obrada podataka 20

4. REZULTATI I RASPRAVA 21

4.1. LINEARNI RETENCIJSKI INDEKS 21

4.2. OPTIMIZACIJA METODE 23

4.3. VALIDACIJA METODE 29

4.3.1. Selektivnost 29

4.3.2. Linearnost i ponovljivost 37

4.3.3. Intermedijarna preciznost 51

4.3.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije 55

5. ZAKLJUČCI 57

6. LITERATURA 58

1. UVOD

Kruh je namirnica čija je zastupljenost u prehrani ljudi značajna. Iako se kruh proizveden od pšeničnog brašna konzumira diljem svijeta, postoje pojedinci oboljeli od celijakije koji su osjetljivi na gluten u pšenici i srodnim žitaricama. Celijakija je postala bolest današnjice na koju nije imuna niti jedna dobna skupina, a trenutno jedini način liječenja predstavlja potpuno uklanjanje proizvoda koji sadrže gluten iz prehrane. S obzirom na sve veći broj ljudi s dijagnozom celijakije, sve više raste i potražnja za bezglutenskim proizvodima.

Miris je jedna od najvažnijih karakteristika nekog prehrambenog proizvoda koja utječe na njegovu poželjnost konzumacije od strane potrošača. Loše senzorske karakteristike bezglutenskih proizvoda prisutnih na tržištu navode istraživače i proizvođače na djelovanje u smjeru njihovog poboljšanja. Kako bi poboljšali aromatski profil bezglutenskog kruha, potrebno je istražiti hlapljive spojeve koji na njega utječu. Za određivanje hlapljivih spojeva u kruhu najčešće se primjenjuje „headspace“ mikroekstrakcija na čvrstoj fazi u kombinaciji s plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom zbog jednostavnosti pripreme, malih troškova i velike osjetljivosti.

Cilj ovog istraživanja bilo je provesti optimizaciju i validaciju metode za određivanje spojeva iz skupine alkohola, pirazina i furana u uzorcima bezglutenskog kruha pomoću prethodno navedene metode „headspace“ mikroekstrakcije na čvrstoj fazi uz primjenu plinske kromatografije-masene spektrometrije. Dobivenim rezultatima potvrdit će se jesu li zadovoljeni ključni parametri validacije te je li metoda prihvatljiva za njenu namijenjenu svrhu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BEZGLUTENSKI KRUH

Kruh i proizvodi od žitarica smatraju se najkonzumiranijom hranom u svijetu. Konzumiraju se u različitim oblicima, ovisno o kulturalnim navikama (Cayot, 2007). Iako se koriste brašna raznih vrsta žitarica, pšenično brašno se najčešće primjenjuje u proizvodnji kruha. Pšenica sadrži proteine glutenin i glijadin koji se za vrijeme miješanja i razvijanja tijesta razvijaju u gluten (Gan i sur., 1990).

Celijakija je imunološki posredovana enteropatija potaknuta konzumacijom glutena u genetski osjetljivih pojedinaca, a javlja se kod oko 1 % svjetske populacije (Catassi i Fasano, 2008). Doživotno isključenje glutena iz prehrane je jedini poznati način za liječenje celijakije, čime su oboljeli primorani koristiti samo bezglutenske proizvode. Bezglutenski proizvodi ili ne sadrže pšenicu, pir, raž, ječam, zob, ili su izrađeni od sastojaka tih žitarica koje su posebno obrađene tako da je uklonjen gluten (Moroni i sur., 2009). Kako se povećavaju zdravstveni zahtjevi potrošača, tako se povećava i interes za proizvodnju proizvoda za posebne prehrambene potrebe. Jedan od takvih primjera je i bezglutenski kruh (Poinot i sur., 2009).

S tehnološkog gledišta, zamjena glutenskog brašna bezglutenskim nije trivijalan zadatak. Gluten posjeduje jedinstvena visokoelastična svojstva koja su presudna za zadržavanje vode u tijestu i plina tijekom fermentacije (Arendt i Dal Bello, 2011). Većinu danas komercijalno dostupnih bezglutenskih kruhova odlikuje niska kvaliteta, mrvljivost i loša svojstva kore, kao i loš okus i tekstura u ustima (Gallagher i sur., 2003). Kako bi bezglutenski kruh bio bolje prihvaćen od strane potrošača, postoji potreba za razvojem inovativnih receptura za izradu takvog kruha s dobrim senzorskim svojstvima (Poinot i sur., 2009). Budući da se uglavnom temelje na škrobu, bezglutenski kruhovi imaju vrlo niske sadržaje raznih hranjivih tvari i vrlo brzo stare (Ahlborn i sur., 2005). U većini slučajeva sadrže niže razine nekih vitamina B skupine, željeza i prehrambenih vlakana u odnosu na slične proizvode koji sadrže gluten (Thompson, 2000; Yazynina i sur., 2008). Jedan od načina poboljšanja visokoelastičnih svojstava je dodatak hidrokoloida zbog njihova potencijala za formiranje trodimenzionalne mreže polimera u vodenim otopinama (Lazaridou i sur., 2007; BeMiller, 2008). Nakon mnogih istraživanja različitih hidrokoloida kao što su hidroksipropil-metil-celuloza, metil-celuloza, rogač, guar guma, ksantan i pektin, celuloza se čini najučinkovitija s obzirom na utjecaj na volumen kruha i konačnu tvrdoću kruha (Gujral i sur., 2003; Lazaridou i sur., 2007; Schober i sur., 2008).

Dodatkom proteina, npr. mlijeka u prahu ili jaja, može se povećati prehrambena vrijednost kruha – povećava se sadržaj kalcija, udio proteina te poboljšava okus i tekstura (Kenny i sur., 2001). Iako dodavanje aditiva (proteina i enzima) daje uspješne rezultate, visoka cijena predstavlja njihov nedostatak, a i neki od sastojaka (npr. proteini) mogu izazvati alergije. Nadalje, dodatak aditiva nije u skladu sa zahtjevima potrošača za prirodnim proizvodima. To je pokrenulo razvoj alternativnih tehnologija u proizvodnji kvalitetnih bezglutenskih proizvoda. Jedna od njih je dodatak kiselog tijesta bezglutenskom kruhu (Moroni i sur., 2009). U optimiziranim omjerima, kiselo tijesto može poboljšati volumen, teksturu, nutritivnu vrijednost i produljiti trajnost kruha te zaštititi kruh od plijesni i bakterija kvarenja (Gobbetti i sur., 2005). U traženju alternativnih receptura za kvalitetnijim bezglutenskim kruhovima, Morais i sur. (2014) su ispitali senzorski profil prebiotičkog kruha. Prebiotici su hranjive tvari koje bakterije upotrebljavaju za rast i razmnožavanje, a koje se ne razgrađuju u gornjem dijelu probavnog sustava, dospijevaju u debelo crijevo gdje se nalazi većina bakterija te na taj način povoljno utječu na zdravlje. Upotreba prebiotičkih sastojaka može biti prednost zbog povećanja prehrambene vrijednosti, pojačavanja okusa proizvoda i poboljšanja ostalih senzorskih svojstava bezglutenskog kruha.

2.2. AROMATSKI PROFIL KRUHA

Aromatski profil kruha je jedan od najvažnijih čimbenika pri odluci potrošača o konzumaciji proizvoda. On je najvećim dijelom rezultat proizvodnog procesa. Do nastanka aromatskih spojeva dolazi prilikom fermentacije tijesta kvascima ili bakterijama mliječne kiseline, djelovanja enzima, oksidacije lipida i toplinskih reakcija koje se odvijaju prilikom pečenja, najviše Maillardovih reakcija i reakcija karamelizacije. Receptura, odnosno primijenjeni sastojci također mogu znatno utjecati na sveukupni miris kruha (Pozo-Bayón i sur., 2006).

Prateći preferencije potrošača, mnoga istraživanja su provedena u svrhu poboljšanja mirisa, okusa, teksture i trajnosti kruha (Bárcenas i sur., 2003). Tako su razvijene mnoge metode za identifikaciju spojeva odgovornih za okus i miris kruha (Cayot, 2007) te je zabilježeno više od 540 hlapljivih spojeva u kruhu (Ruiz i sur., 2003). Kvantitativno, najvažnije grupe spojeva odgovornih za aromu kruha su alkoholi, aldehidi, esteri, ketoni, kiseline, pirazini i pirolini, a tu su i furani, ugljikovodici i laktoni (Cayot, 2007; Pozo-Bayón i sur., 2006; Seitz i sur., 1998).

Alkoholi su skupina spojeva koji se u pšeničnom kruhu pojavljuju u najvišim koncentracijama, a najviše nastaju tijekom procesa fermentacije (Jensen i sur., 2011), što je u skladu s istraživanjem hlapivih spojeva na različitim vrstama komercijalnih kruhova koje su proveli Seitz i sur. (1998). Visoka koncentracija alkohola, skupine spojeva važnih za formiranje mirisa kruha, nastaje fermentacijom *Issatchenkia orientalis* u kombinaciji s *Lactobacillus brevis* ili *Lactobacillus plantarum*, dok se diacetil stvara u značajnim količinama fermentacijom s *L. plantarum* i *Pediococcus pentosaceus* (Moroni i sur., 2009).

Fermentacija je proces pri kojem nastaju neki od najznačajnijih aromatskih spojeva (Frasse i sur., 1992). Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* tijekom fermentacije prevodi 95% fermentabilnih šećera iz brašna u etanol i ugljikov dioksid. Preostalih 5% sudjeluje u sekundarnim reakcijama fermentacije gdje piruvat iz glikolize prelazi u više alkohole, kratkolančane masne kiseline i karbonilne spojeve. Iz tih spojeva također mogu nastati aromatski spojevi (Pozo-Bayón i sur., 2006). Produljenom fermentacijom tijesta povećava se koncentracija 3-metil butanola i 2-fenil etanola (Hansen i Hansen, 1996) koji su direktno povezani s fermentacijskom aktivnosti kvasca.

Toplinske reakcije u proizvodnji kruha uključuju karamelizaciju i ne-enzimsko posmeđivanje, čime se stvaraju hlapljivi spojevi značajni za aromatski profil kruha, kao što su furani, pirazini, piroli i Streckerovi aldehidi (Pozo-Bayón i sur., 2006).

Više spojeva arome može se dobiti obogaćivanjem tijesta za kruh kiselim tijestom. Bakterije mliječne kiseline kataliziraju reakcije deaminacije, transaminacije i dekarboksilacije, čime nastaju aminokiseline koje su prekursori za nastanak aromatskih spojeva. Tako put deaminacije arginina u *Lactobacillus spp.* dovodi do povećane proizvodnje ornitina, prekursora nastanka 2-acetil pirolina, spoja odgovornog za aromu kore svježe pečenog pšeničnog kruha (Gänzle i sur., 2007). Hansen i Hansen (1996) su proveli istraživanje s više vrsta mikroorganizama, kvasaca i bakterija mliječne kiseline i pri različitim uvjetima fermentacije kiselog tijesta. Utvrdili su da je dodatkom kiselog tijesta pšenični kruh imao više spojeva arome: 2- i 3-metil-1-butanola, 2-metil propanske kiseline, 3-metil butanske kiseline i 2-fenil etanola. Uravnotežen aromatski profil kruha s dodatkom kiselog tijesta nastaje pravilnim kombiniranjem kvasaca i bakterija mliječne kiseline prilikom procesa kiseljenja (Hansen i Schieberle, 2005).

Nadalje, 3-metilbutanal, 2,3-butandion, 4-hidroksi-2,5-dimetil-furanon, fenil acetaldehid, 2-nonenal, 2,4-dekadienal i octena kiselina značajno doprinose mirisu kore kruha (Schieberle i Grosch, 1992).

2.2. METODE ODREĐIVANJA HLAPLJIVIH SPOJEVA U KRUHU

Od prethodno spomenutih 540 hlapljivih spojeva, samo mali dio spojeva značajno utječe na cjelokupni aromatski profil kruha (Cayot, 2007; Pozo-Bayón i sur., 2006). Mnoge metode i analitičke tehnike razvijane su s ciljem kvalifikacije i kvantifikacije tih spojeva.

Najstarija tehnika korištena za ekstrakciju hlapljivih spojeva kruha je ekstrakcija organskim otapalom (ekstrakcija tekuće-tekuće) (Rychlik i Grosch, 1996; Schieberle i Grosch, 1994; Zehentbauer i Grosch, 1998), dok su destilacija (Ruiz i sur., 2003) i vakuum destilacija rjeđe upotrebljavane tehnike (Frasse i sur., 1992). Primijenjena ekstrakcijska tehnika ovisi o cilju analize, tj. je li cilj ekstrahirati što je više moguće hlapljivih spojeva iz uzorka ili dobiti ekstrakt koji prema senzorskim karakteristikama odgovara samom uzorku. Potonji je dobio naziv reprezentativni uzorak, a s tim su ciljem Poinot i sur. (2009) izumili umjetna usta (engl. *artificial mouth*) pomoću kojih se oponašaju uvjeti kojima je kruh podvrgnut u ljudskim ustima, u svrhu ekstrahiranja onih spojeva koji su odgovorni za aromatski profil kruha.

Hlapljivi spojevi kruha koji značajno doprinose cjelokupnom mirisu i okusu karakterizirani su kombinacijom „headspace“ ekstrakcije i olfaktometrijske metode, poznatijom kao AEDA (engl. *Aroma Extract Dilution Analysis*) (Schieberle, 1995).

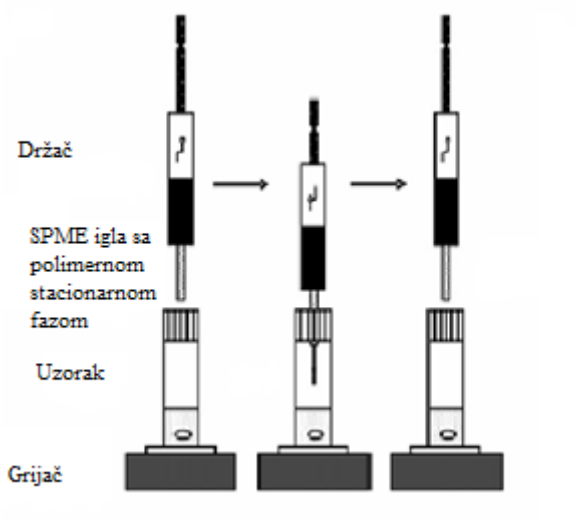
Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Microextraction*, SPME) je osobito korisna, svrsishodna alternativna metoda u usporedbi s drugim metodama koje su skuplje i sporije. Tako je SPME postala tehnika koja se preferira u analizama arome, s obzirom da ne koristi otapalo, omogućuje brzo uzorkovanje s malim troškovima i jednostavnost pripreme uzorka. Osjetljiva je, selektivna i omogućuje niske granice detekcije (Ho i sur., 2006). Također, s vlaknom smještenim iznad uzorka (engl. *„headspace“*, HS), SPME je nedestruktivna i neinvazivna metoda za određivanje hlapljivih i djelomično hlapljivih spojeva (Ruiz i sur., 2003). S obzirom na mogućnost ekstrahiranja na niskim temperaturama, „headspace“ mikroekstrakcija na čvrstoj fazi pruža dobru procjenu aromatskog profila u odnosu na ljudsku percepciju (Ho i sur., 2006).

2.2.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Mikroekstrakciju na čvrstoj fazi izumili su Pawliszyn i suradnici 1989. na Sveučilištu u Waterloo-u, Kanada (Arthur i Pawliszyn, 1990). SPME je razvijena za rješavanje potreba za brzom pripremom uzoraka u laboratoriju i na mjestu istraživanog sustava. Omogućuje uzorkovanje, ekstrakciju i koncentriranje u jednom koraku bez otapala (Rouessac i Rouessac, 2007). U ovoj tehnici, mala količina ekstrakta se veže na kruti nosač tijekom definiranog vremenskog perioda (Pawliszyn, 2012).

Osnovni načini za ekstrakciju koji se mogu izvesti korištenjem SPME su direktna ekstrakcija i „headspace“ mikroekstrakcija vršnih para. U direktnoj ekstrakciji se vlakno uranja u uzorak gdje se analiti prenose izravno iz matriksa uzorka na ekstrakcijsku fazu. U „headspace“ ekstrakciji, vlakno se postavlja u prostor iznad otopine uzorka. Samo relativno hlapljivi spojevi se ekstrahiraju, a metoda je povoljna za uzorke s velikim interferencijama u molekularnoj masi (Pawliszyn, 2012). Tip vlakna koji se koristi utječe na selektivnost ekstrakcije: polarna vlakna koriste se za polarne spojeve, a nepolarna za nepolarne spojeve. Osim o polarnosti i debljini filma, udio ekstrahiranih spojeva ovisi i o vremenu ekstrakcije, kao i o udjelu hlapljivih spojeva u uzorku (Soria i sur., 2009). Cjelokupni prijenos mase na vlakno je ograničen brzinama prijenosa mase iz uzorka na vlakno. Dakle, hlapljivi analiti se ekstrahiraju brže nego djelomično hlapljive tvari jer su u većoj koncentraciji u prostoru iznad uzorka, što doprinosi bržem prijenosu mase (Pawliszyn, 2012).

1 do 2 cm duga vlakna napravljena od odgovarajućeg polimera, nanesenog na nosač od SiO_2 nalaze se zaštićena čeličnom iglom na uređaju nalik injekciji. Nakon probijanja septuma bočice u koju je prethodno stavljena određena količina uzorka, pritiskom na klip držača, izvlači se vlakno u uzorak. Nakon točno određenog vremenskog perioda, vlakno se ponovno uvlači u iglu. Zatim se igla uvodi u injektor plinskog kromatografa, ispušta se vlakno te se spojevi desorbiraju i odvajaju na kromatografskoj koloni (Pawliszyn, 2012). Na slici 1. nalazi se prikaz uređaja za HS-SPME.



Slika 1. Prikaz uređaja za HS-SPME (Anonymus, 2012)

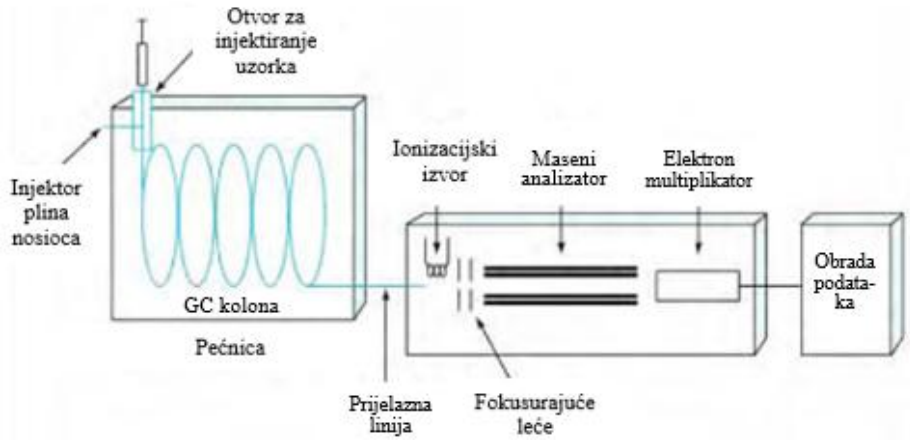
2.2.2. Plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

Plinska kromatografija - masena spektrometrija (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GS-MS) kombinira snagu visoke rezolucije odvajanja komponenti s vrlo selektivnim i osjetljivim detektorom mase. Jedna od glavnih snaga GC-MS-a je mogućnost identifikacije nepoznatih spojeva korištenjem kemijske i elektron-ionizacijske baze podataka (Grob i Barry, 2004).

Plinski kromatograf se sastoji od injektora, kolone i detektora povezanog s termostatski kontroliranom pećnicom koja onemogućava pregrijavanje kolone (Rouessac i Rouessac, 2007). Kao i u svim kromatografskim procesima, plinska kromatografija se bazira na distribuciji analita između dvije faze. Čim se injektira u kolonu, uzorak se razdvaja između stacionarne (tekuće) i mobilne (plinske) faze. Ovisno o svojoj molekularnoj strukturi, različiti spojevi se različito vežu na stacionarnu fazu, dok mobilna faza (plin nosioc) omogućava kretanje kroz kolonu (Wittkowski i Matissek, 1993). Koriste se kapilarne kolone, a ograničavajući faktor s obzirom na odabir kolone je maksimalna brzina protoka u vakuumskom sustavu spektrometra. Za standardne instrumente, protok obično nije veći od 1 mL min^{-1}. Kapilarna plinska kromatografija omogućava direktno povezivanje kromatografske kolone s masenim spektrometrom upravo zbog smanjenja brzine protoka (Grob i Barry, 2004).

Plinoviti uzorak s kolone se usmjerava do izvora iona. Svrha izvora iona je da daje energiju neophodnu za ionizaciju aktivnih molekula, dok se održava na dovoljno visokoj temperaturi kako bi se spriječila kondenzacija analita. Dva tipa ionizacije koji se koriste u

GC-MS analizama su elektronska ionizacija i kemijska ionizacija (Wittkowski i Matissek, 1990). Ioni iz izvora ulaze u maseni analizator (filter mase) gdje se razdvajaju na temelju omjera m/z. Dva tipa masenih analizatora se koriste u GC-MS analizama, magnetski sektor i kvadrupol (Grob i Barry, 2004). Razdvojeni ioni putuju od analizatora do masenog detektora. Detektor korišten u masenoj spektrometriji mora imati brz odgovor i treba prevesti male struje iona u signale koji se mogu snimiti. Najpopularniji detektor je tzv. „electron multiplier“ (Grob i Barry, 2004). Podaci se prikazuju u obliku kromatograma. Najčešće korišten format s punim rasponom masa prilikom skeniranja je TIC (engl. *Total-Ion Current*) kromatogram čiji signal predstavlja zbroj ionske struje za pikove detektirane u svakom masenom spektru (Grob i Barry, 2004). Na slici 2. se nalazi shematski prikaz rada GC-MS uređaja.



Slika 2. Shematski prikaz rada GC-MS uređaja (FAO/WHO, 2006)

2.3. VALIDACIJA METODE

Riječ validacija potječe iz latinskog „validus“ što znači vrijedno, moćno, snažno te sugerira da je nešto dokazano istinito i korisno. Internacionalna organizacija za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*, ISO) definira validaciju kao potvrdu istraživanja, odnosno objektivan dokaz da je ispunjen određeni zahtjev za specifično korištenje. Ova definicija primarno podrazumijeva provedbu detaljnog ispitivanja te pruža dokaz da analitička metoda, kada je primijenjena ispravno, pruža rezultate koji služe svrsi. Ona potvrđuje učinkovitost analitičke metode s visokom razinom točnosti (Araujo, 2009).

Važnost validacije metode je naglašavana od kasnih 40-ih kada su American Chemical Society i Merck & Co. istaknuli važnost matematike i statistike kao nužnih preduvjeta uspješnog razvoja i optimizacije novih analitičkih metoda. To je definiralo put implementacije

validacijskih metoda u analitičkim laboratorijima od kasnih 70-ih te je diljem svijeta postalo priznato da je validacija metode važan korak u svakom laboratoriju koji se bavi razvojem i uspostavljanjem standardnih metoda. U ranim 80-im, istaknuto je da su definicije karakterističnih parametara za validaciju metode različite među postojećim organizacijama, a 1990. godine stvorena je Međunarodna konferencija za harmonizaciju (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH) kao jedinstveni projekt kako bi se okupila regulatorna tijela Europe, Japana i SAD-a s ciljem postizanja boljeg usklađivanja parametara, zahtjeva te metodologija za validaciju analitičkih metoda (Araujo, 2009). U skladu s time je međunarodno prihvaćeno da laboratorij mora poduzeti prikladne mjere kako bi osigurao pružanje podataka zahtijevane kvalitete. Takve mjere uključuju:

- korištenje validirane metode za provođenje analize,
- korištenje unutarnjih procedura kontrole kvalitete,
- sudjelovanje u shemama ispitivanja osposobljenosti,
- akreditaciju po međunarodnom standardu, uobičajeno ISO/IEC 17025.

Treba napomenuti da je akreditacija prema ISO/IEC 17025 specifično usmjerena na uspostavu sljedivosti mjerenja, kao i provođenje raspona ostalih tehničkih i menadžerskih zahtjeva uključujući sve gore navedene (Thompson i sur., 2002).

Validacija metode obuhvaća testiranje svih pretpostavki na kojima se analitička metoda temelji i uspostavlja te dokumentiranje karakteristika i izvođenja metode. Time se demonstrira je li metoda prikladna za određenu analitičku svrhu (Thompson i sur., 2002). Neki od tih parametara su specifičnost/selektivnost, linearnost i područje linearnosti, točnost, preciznost (ponovljivost, intermedijarna preciznost i reproducibilnost), granica detekcije i granica kvantifikacije.

2.3.1. Selektivnost

Prema definiciji, selektivnost se odnosi na sposobnost određivanja analita bez interferencije očekivanih drugih komponenata prisutnih u uzorku (ICH, 2005; Araujo, 2009). Tipično, prisutne komponente uključuju metabolite, nečistoće, razgradne produkte, komponente matriksa, itd. U idealnim uvjetima bi selektivnost trebala biti određena za svaku važnu nečistoću koja je vjerojatno prisutna u uzorku (Thompson i sur., 2002). Jedan pristup za

određivanje selektivnosti metode je dokazivanje odsutnosti odziva u praznom matriksu, odnosno interferencija analitu ili internom standardu. Drugi pristup je baziran na pretpostavci da za kvantitativne metode može biti prihvaćeno malo smetnji, sve dok točnost i preciznost ostaju unutar određenih granica prihvatljivosti (Peters i sur., 2007).

Za razliku od selektivnosti, specifičnost se odnosi na određivanje samo jednog, specifičnog analita u uzorku (Araujo, 2009).

2.3.2. Linearnost i područje

Prema definiciji, linearnost analitičkog postupka je mogućnost metode da daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku unutar definiranog područja metode (ICH, 2005).

Kao dokaz linearnosti potrebno je iskazati koeficijent korelacije, odsječak na y-osi, nagib regresijskog pravca i zbroj kvadrata odstupanja te priložiti grafički prikaz. Kako bi kriterij prihvatljivosti bio zadovoljen, koeficijent korelacije mora biti veći ili jednak 0,999 (Araujo, 2009).

Područje metode se definira kao raspon koncentracija u kojem se postiže prihvatljiva preciznost, točnost i linearnost analitičke metode (Thompson i sur., 2002). ICH (2005) preporuča minimalno specifično područje koje najčešće obuhvaća koncentracijski raspon od 80 do 120 % od očekivane koncentracije analita, a može se odrediti iz podataka dobivenih utvrđivanjem linearnosti. Mjerenje se provodi u najmanje 5 točaka s 3 do 6 ponavljanja te bi kalibracijski standardi trebali biti ravnomjerno raspoređeni u rasponu koncentracija koje se očekuju u uzorku (ICH, 2005). Za mnoge bioanalitičke metode rasponi koncentracija su najčešće široki, npr. 1-100, 1-1000 ili čak i širi. U širokim kalibracijskim rasponima, relativno mala odstupanja od pretpostavljenog modela mogu dovesti to značajnih pogrešaka u predviđenim koncentracijama kod kalibracijskog raspona (Hartmann i sur., 1998).

2.3.3. Preciznost

Preciznost je izraz slaganja između neovisnih rezultata dobivenih pod propisanim uvjetima eksperimenta. Ona predstavlja raspršenost pojedinačnih rezultata oko aritmetičke sredine. Izražava se standardnom devijacijom, relativnom standardnom devijacijom, varijancom ili standardnom pogreškom aritmetičke sredine. Ukazuje na podudaranje mjernih vrijednosti, a određuje se iz najmanje devet mjerenja (pri tri koncentracije u tri ponavljanja)

koja pokrivaju definirano području metode (područje linearnosti) ili iz najmanje šest mjerenja pri najvišoj koncentraciji (Thompson i sur., 2002). Ispituje se koristeći homogene, mjerodavne uzorke. Ako nije moguće dobiti homogeni uzorak, koriste se umjetno pripremljeni uzorci (ICH, 2005).

Ovisno o uvjetima u kojima se preciznost određuje, može se izraziti kao ponovljivost, intermedijarna preciznost i reproducibilnost (ICH, 2005). Uvjeti ponovljivosti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu te kratko razdoblje provođenja metode, ali uz dnevno svježe uzorke, standarde, mobilnu fazu i reagense. Intermedijarna preciznost (međupreciznost) označava varijabilnost mjernog procesa u duljem razdoblju i indicira varijacije unutar istog laboratorija, npr. u različitim danima ili kroz nekoliko tjedana, s raznim analitičarima ili opremom, primjenom različitih instrumenata, standarda i reagensa različitih proizvođača. Reproducibilnost (obnovljivost) je preciznost dobivena između različitih laboratorija. Ona se procjenjuje tako da alikvote jednog homogenog uzorka analiziraju razni analitičari u raznim laboratorijima koristeći radne uvjete i uvjete okoline koji se od laboratorija do laboratorija mogu razlikovati, ali su još uvijek unutar specificiranih parametara metode. Taj se parametar određuje u svrhu normiranja metode i rijetko je sastavni dio validacije koju provodi sam laboratorij. Kriteriji prihvatljivosti ovise o vrsti analize, matriksu uzorka i koncentraciji analita koji se određuje (Araujo, 2009; Lazarić, 2012).

2.3.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granične vrijednosti određivanja su najmanje koncentracije ili količine analita čija se prisutnost može odrediti s određenom sigurnošću analitičkog postupka.

Granica detekcije (engl. *Limit Of Detection*, LOD) definirana je kao najniža količina analita u uzorku koji se pouzdano može detektirati, ali ne nužno kvantificirati određenom analitičkom metodom (Araujo, 2009). Procjena LOD vrijednosti ovisi o tome radi li se o instrumentalnoj ili ne-instrumentalnoj metodi (Araujo, 2009). Vizualna procjena se može koristiti i za instrumentalne i za ne-istrumentalne metode. Granica detekcije kod vizualne metode određuje se analizom uzoraka s poznatim koncentracijama analita i uspostavom minimalnog signala na kojem se analit pouzdano može detektirati. Nadalje, određivanje LOD vrijednosti na temelju omjera signala i šuma primjenjuje se samo za analitičke postupke. Omjer signala i šuma određuje se usporedbom rezultata ispitivanja uzoraka poznate koncentracije analita s rezultatima za slijepe uzorke te se ustanovi minimalna razina kod koje

se analit pouzdano može detektirati. Prihvaća se odnos signal/šum bazne linije od 2 : 1 ili 3 : 1. LOD se može odrediti i na temelju standardne devijacije signala i nagiba, gdje se omjer standardne devijacije i nagiba množi sa 3,3 (ICH, 2005).

Granica kvantifikacije (engl. *Limit Of Quantification*, LOQ) je definirana kao najniža koncentracija analita koja se može odrediti s prihvatljivom razinom preciznosti i točnosti (Swartz i Krull, 1997). Ona je često i koncentracija najnižeg kalibracijskog standarda. Procjena LOQ ovisi o tome da li se radi o instrumentalnom ili ne-instrumentalnom postupku. Za instrumentalne postupke uobičajeno se mjeri veličina odziva uzoraka i računa se standardna devijacija tog odziva. Množenjem vrijednosti standardne devijacije s 10 dobije se procjena granice kvantifikacije, a parametar se validira analizom prikladnog broja uzoraka za koje se zna da su blizu te granice (ICH, 2005). Često se računa kao najniža koncentracija analita kojoj je omjer signala i šuma bazne linije 10. U kromatografiji se za LOQ obično zahtijeva da visine pikova budu 10 do 20 puta veće od šuma bazne linije. Može se prikazati i kao koncentracija koja daje omjer signala i šuma bazne linije 10 : 1 s 10 % preciznosti ili 20 : 1 s 5 % preciznosti (ICH, 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Priprema 20 %-tne otopine soli

Otopina soli pripremljena je vaganjem 10 g NaCl-a s točnošću ± 0,0001 g. Sol je otopljena u 35 mL demineralizirane vode, dobivenoj otopini je prilagođen pH na 3 pomoću 0,05 M otopine limunske kiseline te je dodana demineralizirana voda do ukupnog volumena od 40 mL. Otopina soli je pripremana svakodnevno kako bi bila svježa.

3.1.2. Priprema otopine za analizu

Otopina za analizu se sastoji od bezglutenskog kruha, otopine standarda, internog standarda te prethodno pripremljene 20 %-tne otopine soli. U staklenu vijalicu volumena 20 mL u koju je prethodno postavljen magnet, kvantitativno je preneseno 0,2500 g uzorka kruha vagano s točnošću ± 0,0001 g. Dodano je 10 μL internog standarda koncentracije 0,9455 mg mL^{-1} te određeni volumen otopine standarda, ovisno o željenoj koncentraciji. Zatim je dodana 20 % otopina NaCl do ukupnog volumena koji je iznosio 5 mL. Vijalica je zatvorena PTFE čepom (Crimp N20 Al, septa silikon/PTFE) te je time uzorak spreman za ekstrakciju.

Bezglutenski kruh korišten za analize pripremljen je sa slijedećim sirovinama: integralno rižino brašno, Advent, Hrvatska; kukuruzni škrob, Agrana, Austrija; integralno proseno brašno, Werz, Njemačka; brašno žutog graška, Only Nature, EU; kukuruzni ekstrudat, Naše Klasje, Hrvatska; biljna mast, Zvijezda, Hrvatska; hidrokoloidi Wellence Gluten Free 47129 i Methocell K4M Food Grade, The Dow Chemical Company, SAD; morska sol, Solana Pag, Hrvatska; prašak za pecivo, Dr. Oetker, Mađarska; emulgator MONO 40, Juchem, Njemačka; šećer, Viro d.o.o., Hrvatska; instant suhi pekarski kvasac, Di-go, Kvasac d.o.o., Hrvatska; bjelanjak u prahu, Elcon, Prehrambeni proizvodi d.o.o.; vodovodna voda.

Tablica 1. Podaci o korištenim standardima

Proizvod	CAS	Proizvođač	Čistoća (%)
1-butanol*	71-36-3	Merck	99,5
2-metil furan	534-22-5	Acros Organics	99,0
2-pentil furan	3777-69-3	Sigma Aldrich	AS*
2-etil pirazin	13925-00-3	Alfa Aesar	99,0
1-okten-3-ol	3391-86-4	Acros Organics	98,0
1-heptanol	111-70-6	Acros Organics	98,0
1-oktanol	111-87-5	Acros Organics	99,0
2-okten-1-ol, trans	18409-17-1	Acros Organics	98,0
2-furan metanol	98-00-0	Acros Organics	98,0
3-nonen-1-ol, cis	10340-23-5	Alfa Aesar	97,0
Feniletil alkohol	60-12-8	Merck	AS**
2-acetil pirol	1072-83-9	Maybridge	tech.
2-acetil furan	1192-62-7	Acros Organics	99,0
2,3,5-trimetil pirazin	14667-55-1	Fluka	AS**
2,5-dimetil pirazin	123-32-0	Acros Organics	99,0
3-metil-1-butanol	123-51-3	Sigma Aldrich	AS**
1-pentanol	71-41-0	Acros Organics	99,0
2-metil pirazin	109-08-0	Alfa Aesar	99,0
1-heksanol	111-27-3	Acros Organics	98,0
2-nonen-1-ol, cis	41453-56-9	Sigma Aldrich	97,0
Benzil alkohol	100-51-6	Acros Organics	99,0
3-metiltio-1-propanol	505-10-2	Sigma	98,0
2-metoksi-4-vinil fenol	7786-61-0	Fluka	AS**
2-metil-1-propanol	78-83-1	Sigma Aldrich	99,8
2-etil heksanol	104-76-7	Acros Organics	99,0

*1-butanol je korišten kao interni standard

**AS – analitički standard

3.2. EKSTRAKCIJA I ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Izdvajanje hlapljivih spojeva arome provedeno je pomoću HS-SPME metode, a analiza izdvojenih spojeva pomoću GC-MS uređaja.

3.2.1. Izdvajanje hlapljivih spojeva

Priprema uzorka za mikroekstrakciju podrazumijeva stavljanje prethodno pripremljene vijalice s uzorkom u termoblok (PIERCE Reacti-Therm NO. 18971) na temperaturno uravnoteženje u trajanju od 5 min uz vrtnju magneta pri brzini 7. Mikroekstrakcija je započela kada je držačem SPME vlakna (Supelco, SAD) probušen čep te je vlakno spušteno u prostor iznad uzorka gdje se provodi ekstrakcija hlapljivih spojeva iz uzorka na stacionarnu polimernu fazu vlakna. U ispitivanjima je korišteno CAR/DVB/PDMS vlakno debljine 50/30 μm, Stableflex 24 Ga (Supelco, SAD).

Provedena je i optimizacija uvjeta ekstrakcije koja je uključivala ispitivanje utjecaja temperature 40 °C, 50 °C i 60 °C i vremena ekstrakcije 30, 45 i 60 min na količinu ekstrahiranih ciljanih spojeva. Na temelju rezultata optimizacije su definirani optimalni uvjeti mikroekstrakcije – 60 °C i 60 min.

3.2.2. GC-MS analiza

Odmah po završetku ekstrakcije je SPME vlakno injektirano je u 6890 N plinski kromatograf (Agilent Technologies) povezan s 5973i masenim spektrometrom (Agilent Technologies).

Kao plin nosač (pokretna faza) korišten je helij s brzinom protoka 1 mL min^{-1}. Temperatura injektora plinskog kromatografa postavljena je na 260 °C, uvjeti injektora bez razdvajanja protoka "splitless" i vrijeme desorpcije 5 min. Prethodno adsorbirani analiti, pod utjecajem visoke temperature desorbirani su s vlakna. Temperaturni program GC-MS uređaja podešen je tako da se temperatura održavala 3 min na 40 °C, zatim raste 2 °C min^{-1} do 105 °C, zatim 5 °C min^{-1} do 130 °C te je na kraju povišena na 230 °C brzinom 10 °C min^{-1} i tako je održavana 5 min. Ukupno trajanje analize je 55 min.

Temperatura izvora plameno-ionizacijskog detektora MS (engl. source) postavljena je na 230 °C, temperatura kvadrupola na 150 °C, a temperatura prijelazne linije (engl. transfer

line) na 280 °C. Raspon omjera mase i naboja za detekciju je bio 35-350 amu, uz uvjete detekcije TIC (engl. *Total Ion Chromatogram*).

Rezultati analize hlapljivih spojeva uzoraka vidljivi su na računalu spojenom na GC-MS uređaj u obliku kromatograma.

3.2.3. Linearni retencijski indeks

Kako bi se izračunala retencijska vremena izdvojenih hlapljivih spojeva, provedena je analiza otopine smjese alkana C_8-C_{20}, približne koncentracije svakog alkana 40 mg L^{-1} (Sigma Aldrich) pri istim uvjetima kao otopine standarda. Iz dobivenih kromatograma očitano je retencijsko vrijeme (RT) svakog ciljanog spoja te je izračunat linearni retencijski indeks (LRI) pomoću jednadžbe:

$$LRI\ (x) = 100 \times z + 100 \times \frac{RT(x) - RT(z)}{RT(z+1) - RT(z)} \qquad [1]$$

LRI označava linearni retencijski indeks spoja *x*, vrijednost *z* predstavlja broj ugljikovih atoma alkana s retencijskim vremenom prije ciljanog spoja *x*, *z+1* broj ugljikovih atoma alkana s retencijskim vremenom nakon ciljanog spoja *x*, *RT(x)* je retencijsko vrijeme ciljanog spoja, *RT(z)* je retencijsko vrijeme alkana prije ciljanog spoja *x*, a *RT(z+1)* odnosi se na retencijsko vrijeme alkana nakon ciljanog spoja *x*. Dobiveni LRI uspoređuje se s LRI iz literature te se izražava kao razlika te dvije vrijednosti (ΔK = LRI (lit.) – LRI) (Bianchi i sur., 2007).

3.2.4. Identifikacija hlapljivih spojeva

Identifikacija hlapljivih spojeva provedena je injektiranjem čistih otopina standarda te usporedbom dobivenog masenog spektra sa spektrom uzoraka, usporedbom retencijskih vremena spojeva te usporedbom dobivenih masenih spektara s onima u NIST 05 bazi podataka korištenjem softvera *MSD ChemStation Data Analysis*.

3.3. VALIDACIJA METODE

U svrhu validacije metode, ispitana je selektivnost, linearnost, preciznost, granica detekcije i granica kvantifikacije. Validacija je provedena pri sljedećim uvjetima mikroektrakcije: pri temperaturi od 60 °C, u trajanju od 60 min.

3.3.1. Selektivnost

Spojevi sličnog retencijskog vremena se teško identificiraju na kromatogramu. Zbog toga je selektivnost ove metode određena pregledom kromatograma ciljanih i kvalifikacijskih iona, kojima se spoj identificira i kvantificira. Popis spojeva s ciljanim i kvalifikacijskim ionima nalazi se u tablici 2.

Tablica 2. Ciljani i kvalifikacijski ioni analiziranih spojeva

Spoj	**Ciljani ion (m/z)**	**Kvalifikacijski ioni (m/z)**
2-metil furan	82	81, 53, 39
2-pentil furan	81	82, 138, 53
2-etil pirazin	107	108, 80
1-okten-3-ol	57	43, 72, 85
1-heptanol	70	56, 55, 69
1-oktanol	56	55, 70, 69
2-okten-1-ol, trans	57	41, 55, 43
2-furan metanol	98	97, 81, 69
3-nonen-1-ol, cis	55	68, 81, 41
Feniletil alkohol	91	92, 122, 65
2-acetil pirol	94	109, 66, 39
2-acetil furan	95	110, 39, 43
2,3,5-trimetil pirazin	122	42, 81, 39
2,5-dimetil pirazin	108	42, 39, 81
3-metil-1-butanol	55	70, 42, 57
1-pentanol	42	55, 70, 41
2-metil pirazin	94	67, 53, 39
1-heksanol	56	55, 43, 69
2-nonen-1-ol, cis	57	41, 43, 55
Benzil alkohol	79	108, 107, 77
3-metiltio-1-propanol	106	41, 73, 88
2-metoksi-4-vinil fenol	150	135, 107, 77
2-metil-1-propanol	43	41, 42, 74
2-etil heksanol	57	41, 83, 43

Kvalifikacijski ioni služe za identifikaciju ključnog spoja u kromatogramu dok se ciljani ion koristi za kvantifikaciju ciljanog spoja. Na temelju razlike u omjerima intenziteta odziva ključnih iona se određeni spoj može identificirati od drugog spoja sličnog retencijskog vremena.

3.3.2. Linearnost

Provedena je analiza ciljanih spojeva na 11 koncentracijskih razina, uz minimalno tri ponavljanja mjerenja. Za izradu baždarnih dijagrama obrađeni su podaci dobiveni iz kromatograma pripremljenih otopina za analizu. U uzorak su dodane otopine standarda zbog eliminacije utjecaja matriksa. Površina svakog spoja na svim koncentracijskim razinama korigirana je s površinom internog standarda (1-butanol) kako bi korigirali moguće razlike dobivene unutar svih analiza. Zatim je od ukupnog odziva (korigirane površine) oduzet odziv ciljanog spoja porijeklom iz uzorka.

Linearnost metode izražena je kao dijagram ovisnosti površine spoja dobivene iz kromatograma o koncentraciji spoja u uzorku. Sve koncentracijske razine izražene su u obliku $\mu g\ kg^{-1}$ kruha.

Baždarni dijagrami sadrže jednadžbu regresijskog pravca, nagib i odsječak na y osi te koeficijent determinacije (R^2) te koeficijent korelacije (r).

Parametar iskorištenja izračunat je prema jednadžbi:

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{c\ (E)}{c\ (T)} \times 100 \qquad [2]$$

gdje je c(E) eksperimentalna koncentracija izračunata iz jednadžbe regresijskog prava baždarnog dijagrama, a c(T) teoretska koncentracija ciljanog spoja. Dobivene vrijednosti iskorištenja uspoređene su s kriterijima prihvatljivosti za iskorištenje iz priručnika AOAC (2011) (tablica 3.).

Tablica 3. Kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje i ponovljivost (AOAC, 2011)

Udio analita (%)	Omjer analita	Srednja vrijednost iskorištenja (%)	Ponovljivost, RSD (%)
100	1	98 – 102	1,3
10	10^{-1}	98 – 102	1,9
1	10^{-2}	97 – 103	2,7
0,1	10^{-3}	95 – 105	3,7
0,01	10^{-4}	90 – 107	5,3
0,001	10^{-5}	80 – 110	7,3
0,0001	10^{-6}	80 – 110	11
0,00001	10^{-7}	80 – 110	15
0,000001	10^{-8}	60 – 115	21
0,0000001	10^{-9}	40 – 120	30

3.3.3. Preciznost

Ponovljivost i intermedijarna preciznost određene su računanjem relativnih standardnih devijacija odziva analiziranih spojeva. Ponovljivost je određena ispitivanjem otopine kalibracijskih standarda dodanih u uzorak. Mjerenje se provodilo na jedanaest koncentracijskih razina u četiri ponavljanja u istom danu, a u rezultate su uključene samo one koncentracije koje su uključene u baždarni dijagram. Rezultati su uspoređeni s kriterijima prihvatljivosti za ponovljivost iz AOAC (2011) priručnika (tablica 3.). Intermedijarna preciznost je ispitivana u tri različita dana, na tri koncentracijske razine u tri ponavljanja.

3.3.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) procijenjene su računanjem standardne pogreške na y-osi baždarnih dijagrama prema jednadžbama:

$$\text{LOD} = 3{,}3 \times \frac{\sigma}{S} \qquad [3]$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{\sigma}{S} \qquad [4]$$

gdje je σ standardna devijacija odziva, a S nagib regresijskog pravca (ICH, 2005).

3.3.5. Analiza i obrada podataka

Svi podaci obrađeni su u programu MS Excel 2007.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati optimizacije i validacije HS-SPME/GC-MS metode za određivanje 17 alkohola, 3 furana i 4 pirazina u bezglutenskom kruhu.

4.1. LINEARNI RETENCIJSKI INDEKS

Provedena je analiza otopine alkana i otopine standarda ciljanih spojeva. Iz dobivenih kromatograma je očitano retencijsko vrijeme (RT) svakog ciljanog spoja pomoću kojeg je izračunat linearni retencijski indeks (LRI). Retencijska vremena spojeva, linearni retencijski indeksi za svaki pojedini spoj i njihova usporedba s literaturom prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Retencijska vremena i linearni retencijski indeksi (LRI) za svaki pojedini spoj te njihova usporedba s literaturom (Bianchi i sur., 2007; Campo i sur., 2015; Condurso i sur., 2008; Weckerle i sur., 2001; Charles i sur., 2000)

Spoj	**Prosječna vrijednost RT (min)**	**LRI**	**LRI (lit.)**	**ΔK***
2-metil furan	2,64	863	876	-13
2-pentil furan	13,31	1224	1240	-16
2-etil pirazin	18,96	1326	1334	-8
1-okten-3-ol	26,49	1453	1456	-3
1-heptanol	26,72	1457	1460	-3
1-oktanol	32,70	1559	1566	-7
2-okten-1-ol, trans	35,80	1616	1621	-5
2-furan metanol	38,17	1668	1678	-10
3-nonen-1-ol, cis	38,93	1685	1704	-19
Feniletil alkohol	44,47	1910	1927	-17
2-acetil pirol	45,41	1976	1988	-12
2-acetil furan	29,16	1498	1511	-13
2,3,5-trimetil pirazin	22,91	1393	1402	-9
2,5-dimetil pirazin	18,27	1314	1318	-4
3-metil-1-butanol	12,65	1212	1215	-3
1-pentanol	14,87	1253	1256	-3
2-metil pirazin	15,23	1259	1264	-5
1-heksanol	20,72	1356	1354	2
2-nonen-1-ol, cis	40,17	1719	1722	-3
Benzil alkohol	43,92	1877	1870	7
3-metiltio-1-propanol	40,03	1714	1719	-5
2-metoksi-4-vinil fenol	48,08	**	2209	-
2-metil-1-propanol	7,73	1104	1097	7
2-etil heksanol	28,79	1492	1492	0

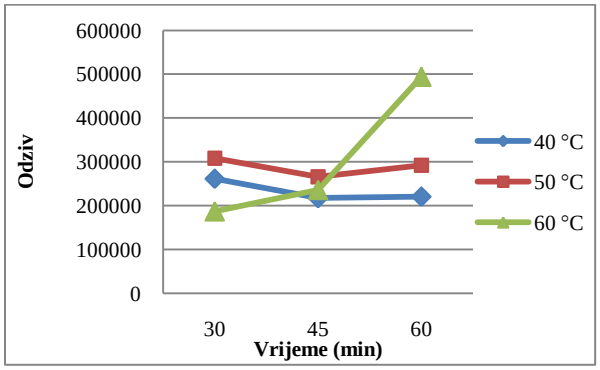
*ΔK = LRI (lit.) – LRI

** LRI nije izražen jer se po RT nalazi iza zadnjeg određivanog alkana (C_{20})

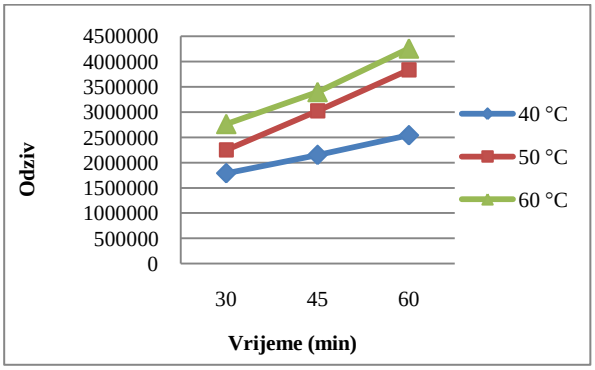
Odstupanja izračunatih LRI vrijednosti od vrijednosti iz literature kreću se od -19 do 7 LRI jedinica. Korištenjem GC-MS metode identifikacija hlapljivih spojeva se obično postiže usporedbom eksperimentalnih spektara masa s onima pohranjenim u bazi podataka (NIST). Međutim, u slučaju strukturno sličnih spojeva koji daju sličan spektar, identifikacija može biti otežana. LRI je koristan alat za identifikacijske svrhe – ne ovisi o radnim uvjetima same metode, osim o polarnosti stacionarne faze. Stoga je LRI vrlo koristan za međulaboratorijske usporedbe (Bianchi i sur., 2007). Rezultati istraživanja koje su proveli Bianchi i sur. (2007) pokazali su maksimalnu dobivenu razliku od 10 LRI jedinica.

4.2. OPTIMIZACIJA METODE

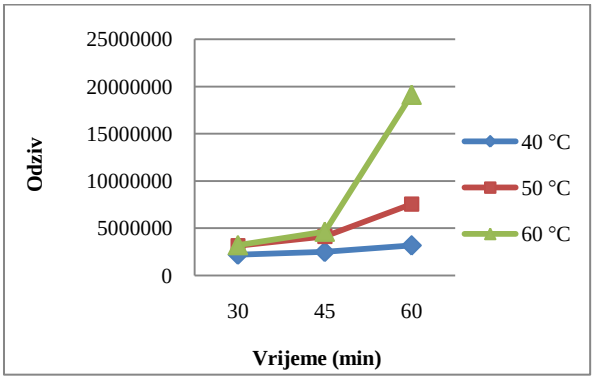
Na slikama 3. do 26. prikazani su rezultati optimizacije za svaki pojedini spoj, a na slikama 27. i 28. rezultati optimizacije za sve analizirane spojeve. Na temelju tih rezultata određeni su optimalni parametri mikroestrakcije korišteni u validaciji metode.



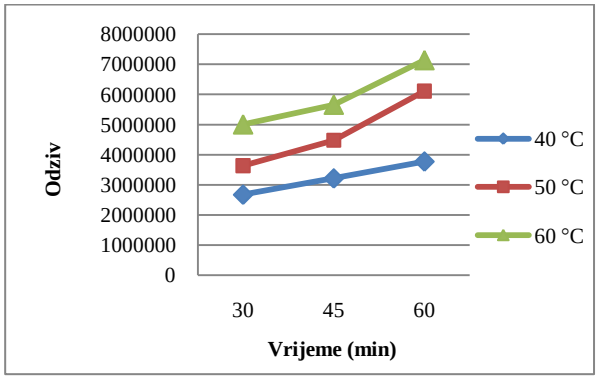
Slika 3. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-metil furana o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



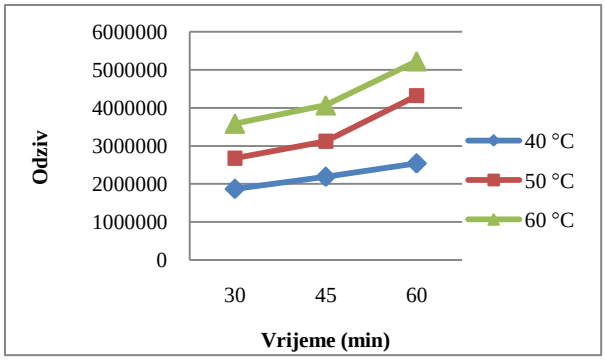
Slika 4. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-etil pirazina o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



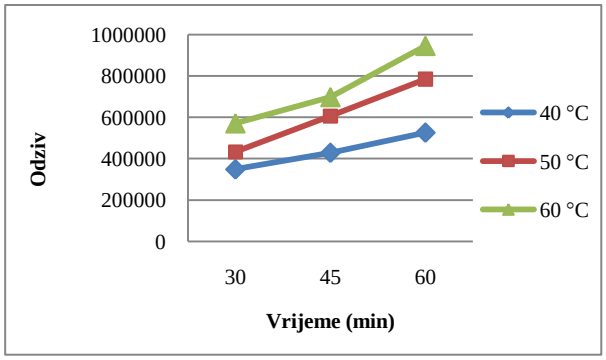
Slika 5. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-pentil furana o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



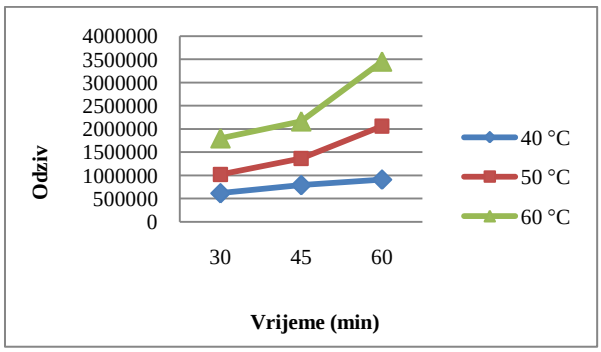
Slika 6. Grafički prikazi ovisnosti odziva 1-okten-3-ola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



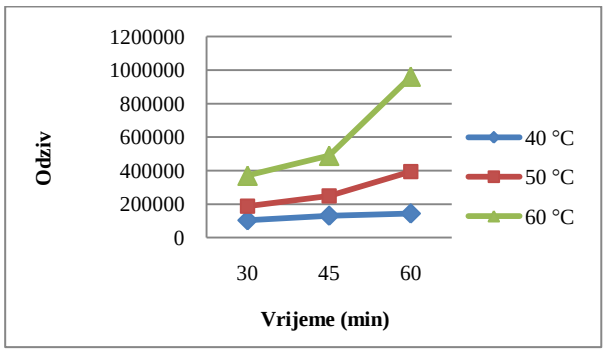
Slika 7. Grafički prikazi ovisnosti odziva 1-heptanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



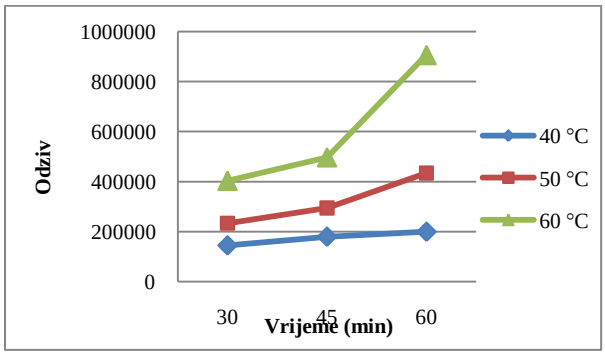
Slika 8. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-furan metanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



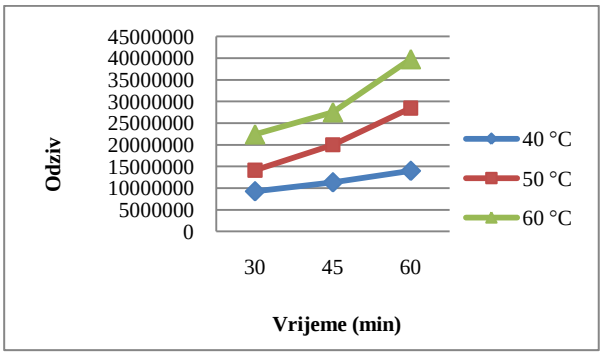
Slika 9. Grafički prikazi ovisnosti odziva 1-oktanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



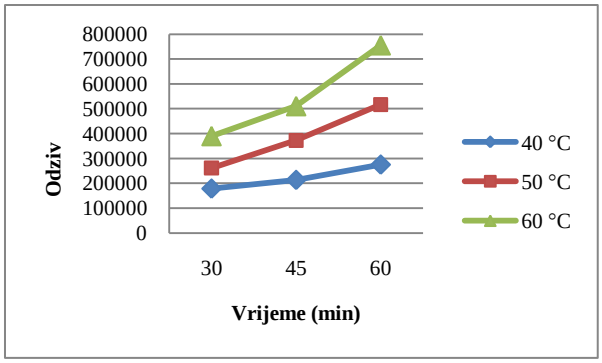
Slika 10. Grafički prikazi ovisnosti odziva 3-nonen-1-ola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



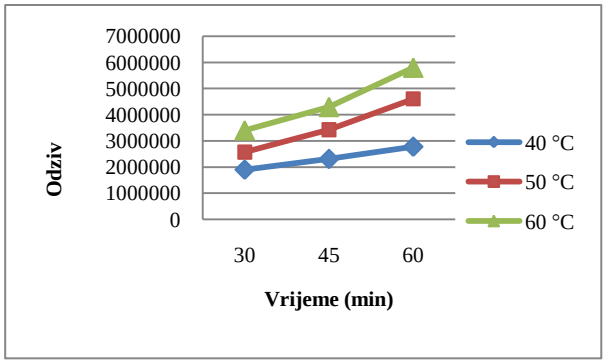
Slika 11. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-okten-1-ola, trans o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



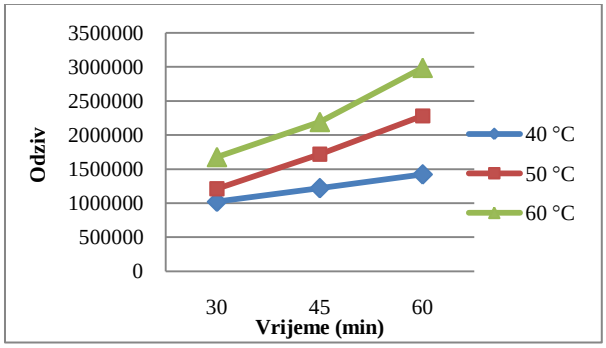
Slika 12. Grafički prikazi ovisnosti odziva feniletil alkohola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



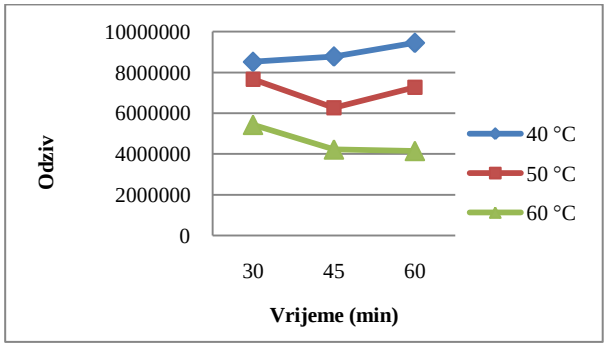
Slika 13. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-acetil pirola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



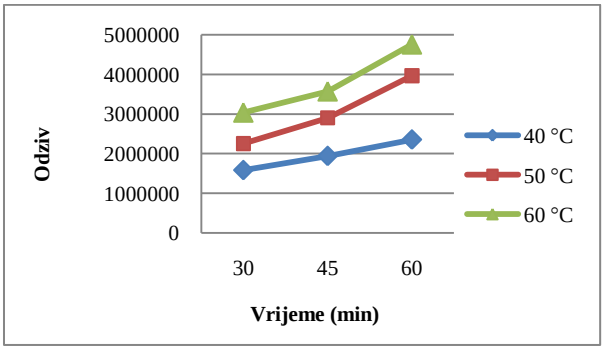
Slika 14. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2,5-dimetil pirazina o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



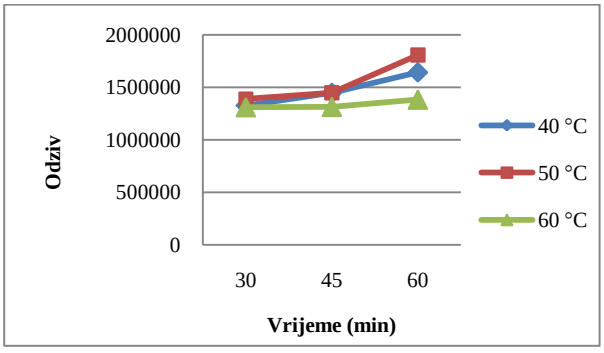
Slika 15. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-acetil furana o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



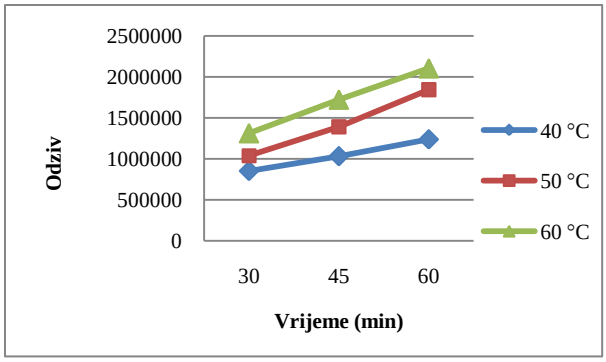
Slika 16. Grafički prikazi ovisnosti odziva 3-metil-1-butanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



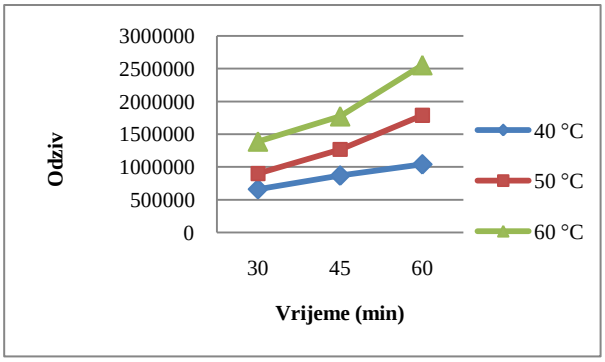
Slika 17. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2,3,5-trimetil pirazina o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



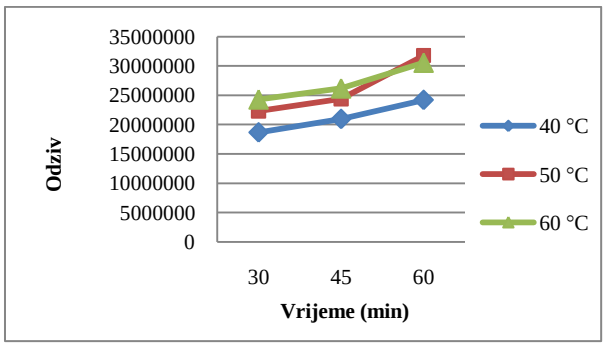
Slika 18. Grafički prikazi ovisnosti odziva 1-pentanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



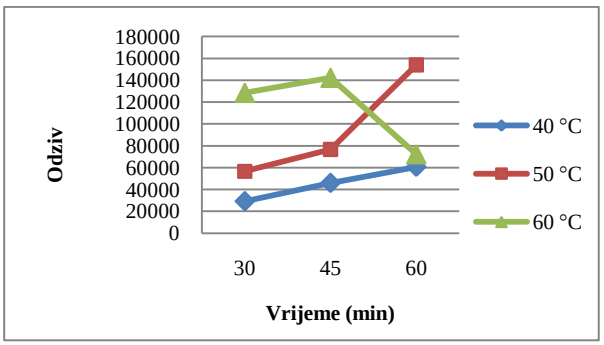
Slika 19. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-metil pirazina o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



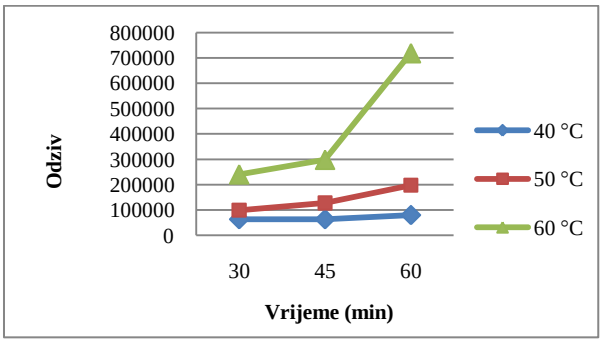
Slika 20. Grafički prikazi ovisnosti odziva benzil alkohola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



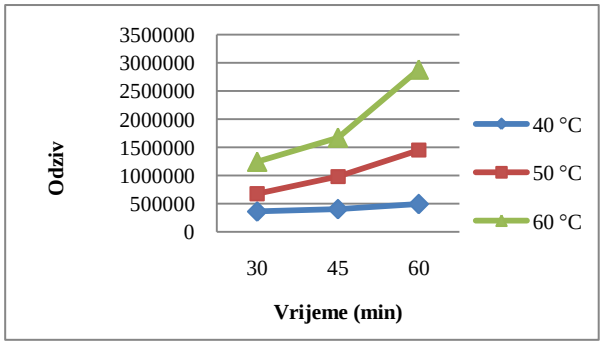
Slika 21. Grafički prikazi ovisnosti odziva 1-heksanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



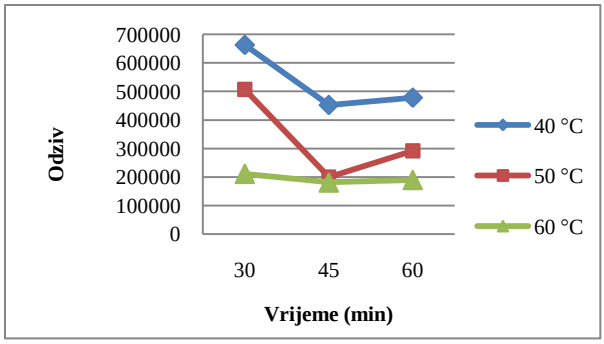
Slika 22. Grafički prikazi ovisnosti odziva 3-metiltio-1-propanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



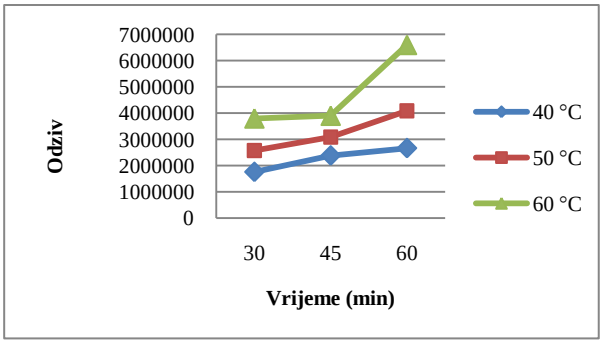
Slika 23. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-nonen-1-ola, cis o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



Slika 24. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-metoksi-4-vinil fenola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



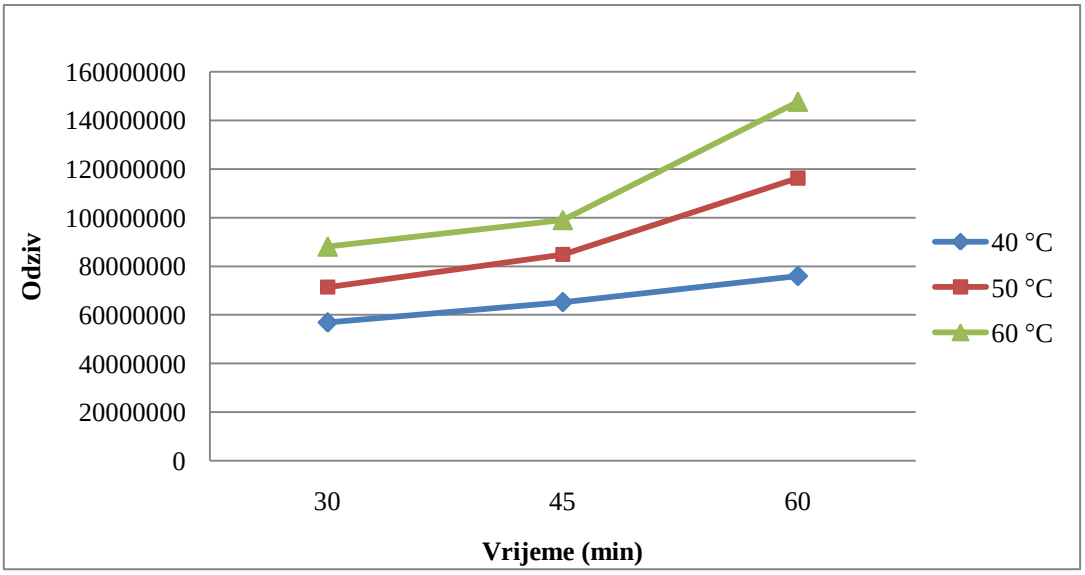
Slika 25. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-metil-1-propanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije



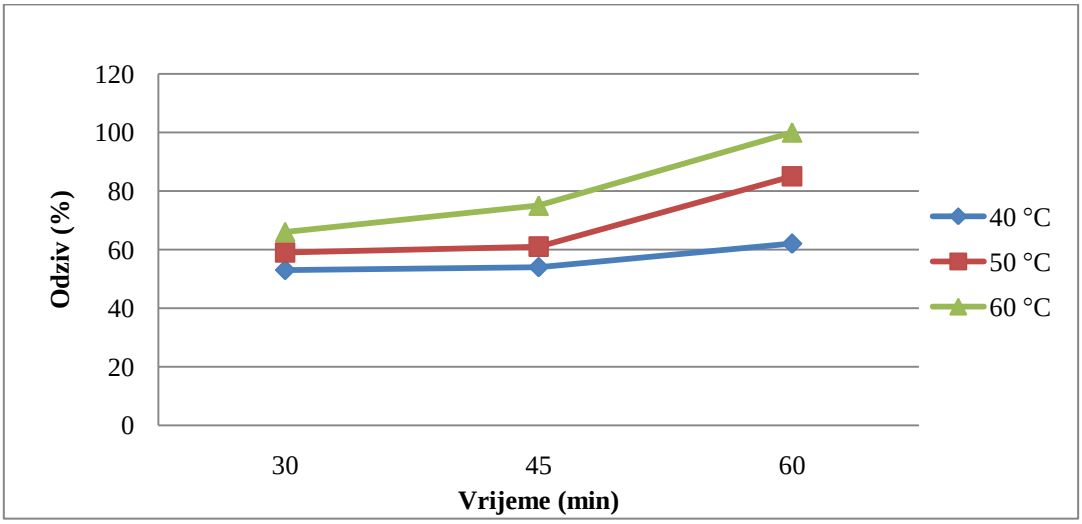
Slika 26. Grafički prikazi ovisnosti odziva 2-etil-1-heksanola o vremenu trajanja i temperaturi mikroekstrakcije

Rezultati optimizacije za spojeve individualno (slika 3. do slika 26.) pokazali su da uvjeti ekstrakcije od 60 °C i 60 min odgovaraju većini spojeva. Optimalni uvjeti ekstrakcije 3-metil-1-butanola (slika 16.) su 40 °C, 60 min, a za 1-pentanol (slika 18.), 1-heksanol (slika 21.) i 3-metiltio-1-propanol (slika 22.) to su 50 °C, 60 min, dok se 2-metil-1-propanol (slika 25.) najbolje ekstrahirao pri uvjetima od 40 °C, 30 min.

U istraživanju Ruiza i sur. (2003) rezultati su pokazali da je učinak temperature različit za različite vrste hlapljivih spojeva. U ispitivanom temperaturnom rasponu od 40 °C do 60 °C, odziv aldehida, kiselina i alkohola velike molekulske mase je rastao povećanjem temperature, dok se odzivi ketona i alkohola niske molekulske mase ponašao suprotno. Sličan obrazac uočen je i kod vremena ekstrakcije. Alkoholi niske molekularne mase, ketoni, heksanal, 1-heksanol i 2-nonenal su postigli uravnoteženje pri 60 min, dok je za druge spojeve, kao što je fenil etanol, površina pika rasla do 120. min (Ruiz i sur., 2003).



Slika 27. Grafički prikaz ovisnosti odziva svih analiziranih spojeva o vremenu trajanja i temperaturi ekstrakcije



Slika 3. Grafički prikaz relativnog odziva svih analiziranih spojeva pri različitom vremenu trajanja i temperaturi ekstrakcije u odnosu na njihov odziv pri uvjetima 60 °C, 60 min.

Iz slike 27. može se primjetiti da je odziv ciljanih spojeva veći što je ekstrakcija duža. Također, najveći porast odziva spojeva primjećuje se pri temperaturi ekstrakcije od 60 °C. Radi eliminacije utjecaja razlike u koncentraciji spojeva, rezultati su na slici 28. prikazani kao zbroj vrijednosti odziva svakog spoja pri svim uvjetima ekstrakcije u odnosu na uvjete 60 °C, 60 min. Iz slike 28. može se primijetiti da s obzirom na odzive svih spojeva pri uvjetima 60 °C, 60 min, različita koncentracija pojedinih ciljanih spojeva nije utjecala na rezultate optimizacije. Najveći ukupni odziv je i dalje pri temperaturi od 60 °C i vremenu od 60 min.

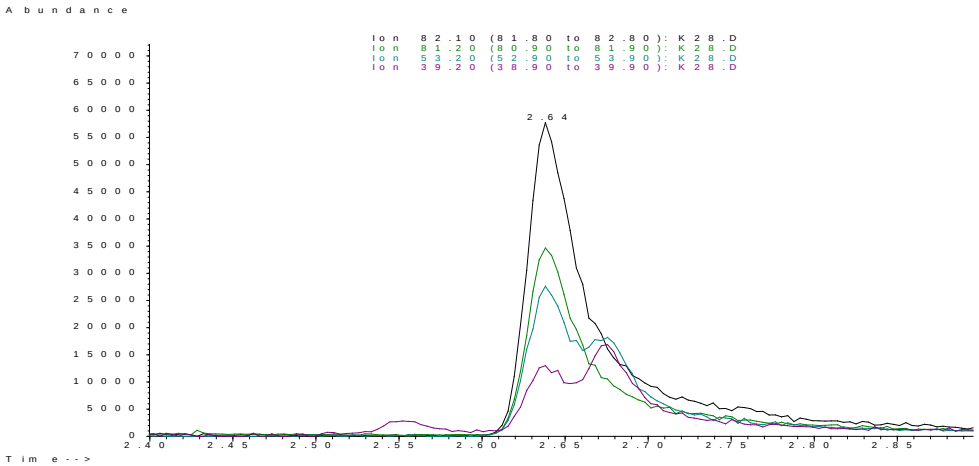
S obzirom da su uzorci bezglutenskog kruha sadrže sve navedene spojeve, odabrani su uvjeti mikroekstrakcije koji su optimalni za većinu spojeva. Na osnovu tih rezultata optimizacije, validacija je provedena pri uvjetima 60 °C i 60 min.

Nakon procjene rezultata, Ruiz i sur. (2003) su u svom istraživaju odabrali srednju temperaturu (50 °C) od ispitivanih temperatura i vrijeme od 60 min kao optimalne uvjete za nastavak analize.

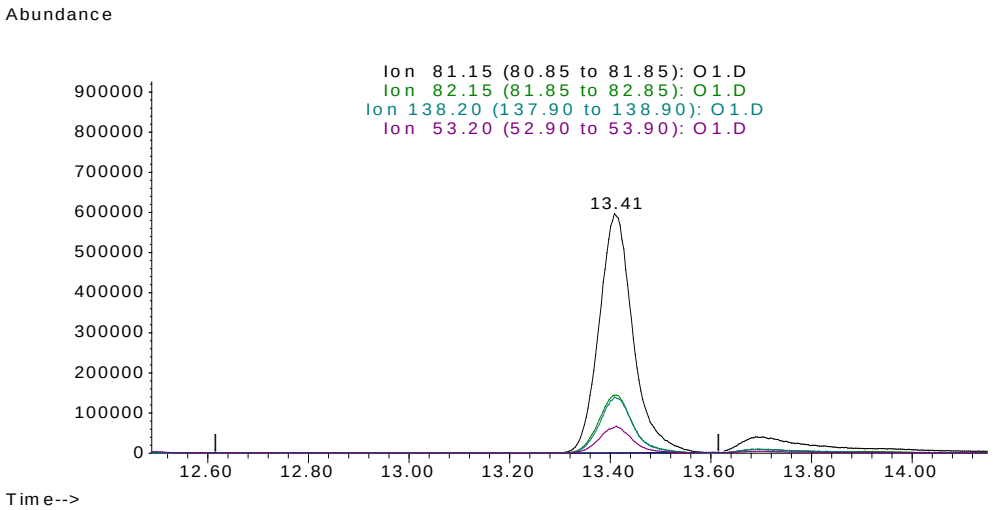
4.3. VALIDACIJA METODE

4.3.1. Selektivnost

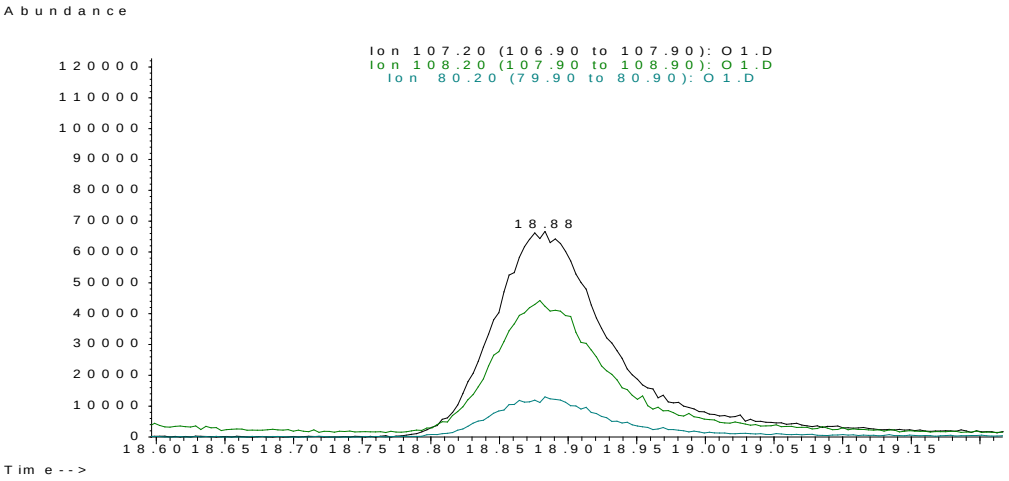
Selektivnost je izražena pomoću kromatograma ciljanih iona (engl. *target ion*) i kvalifikacijskih iona (engl. *qualifier ion*) svakog analiziranog spoja (slika 29. do slika 52.). Ciljani ion na kromatogramima označen je crnom bojom, a kvalifikacijski ioni označeni su plavom, zelenom i rozom bojom.



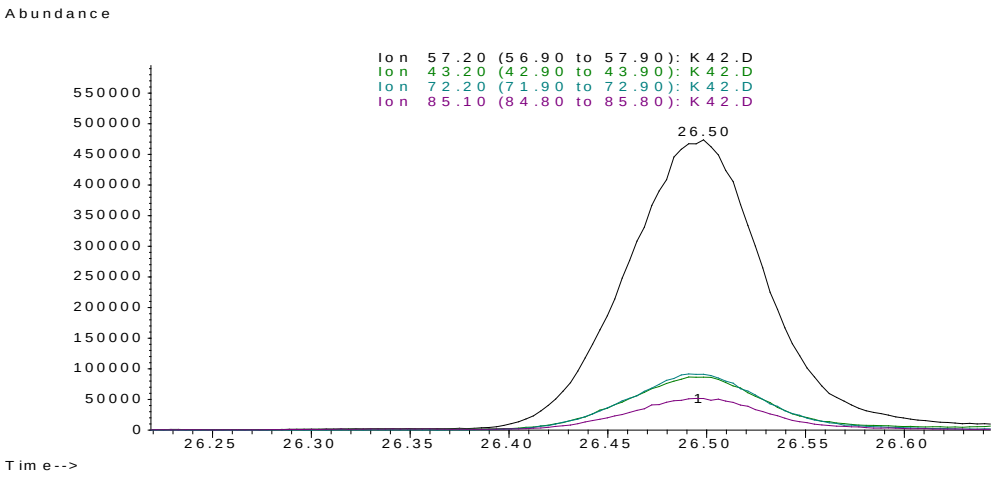
Slika 29. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-metil furan



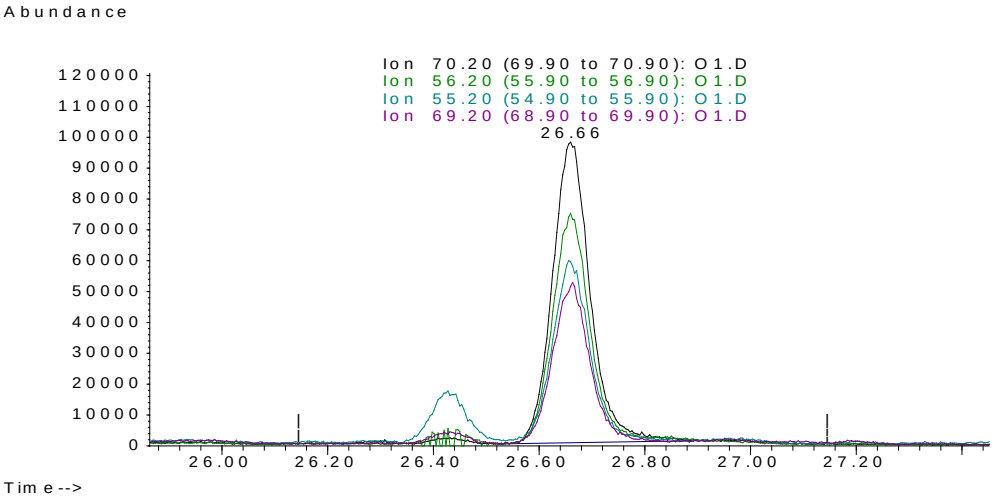
Slika 30. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-pentil furan



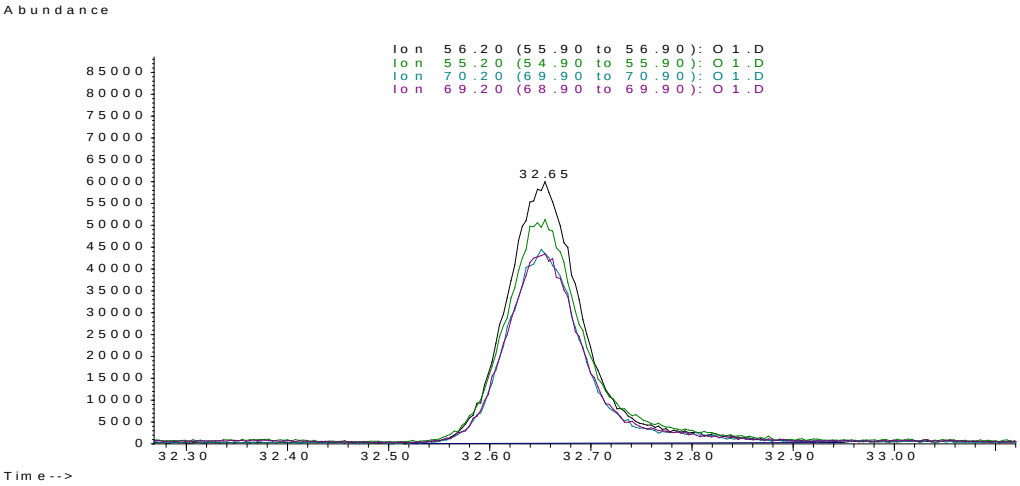
Slika 31. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-etil pirazin



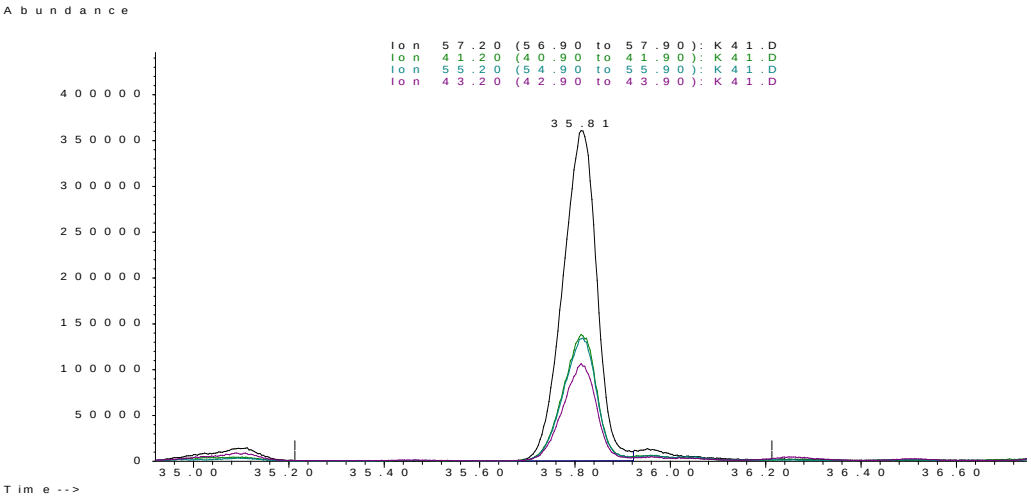
Slika 32. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 1-okten-3-ol



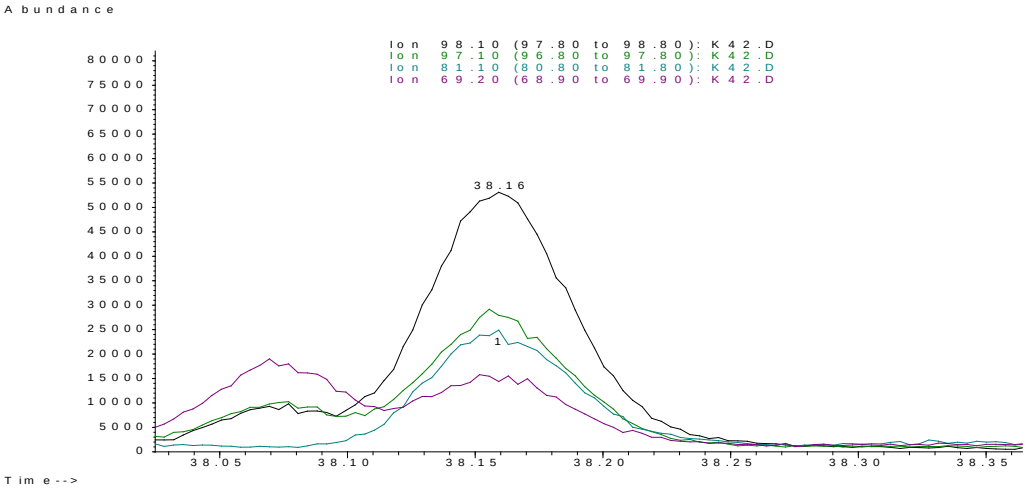
Slika 33. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 1-heptanol



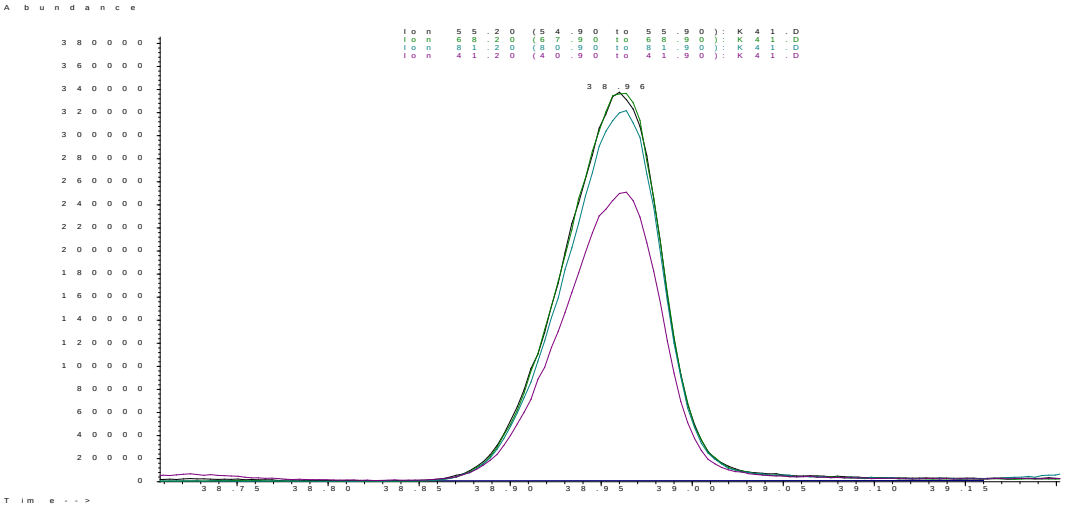
Slika 34. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 1-oktanol



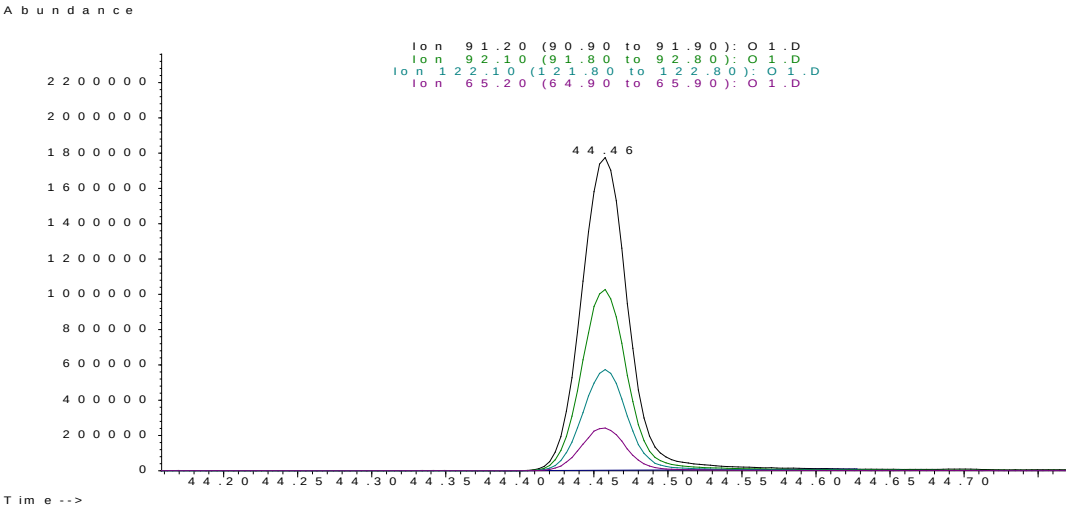
Slika 35. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-okten-1-ol, trans



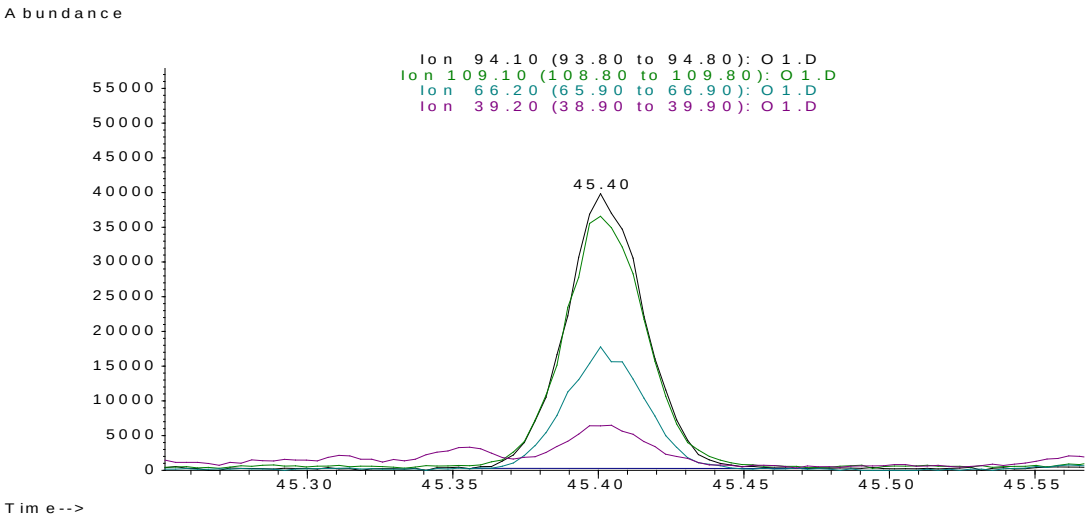
Slika 36. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-furan metanol



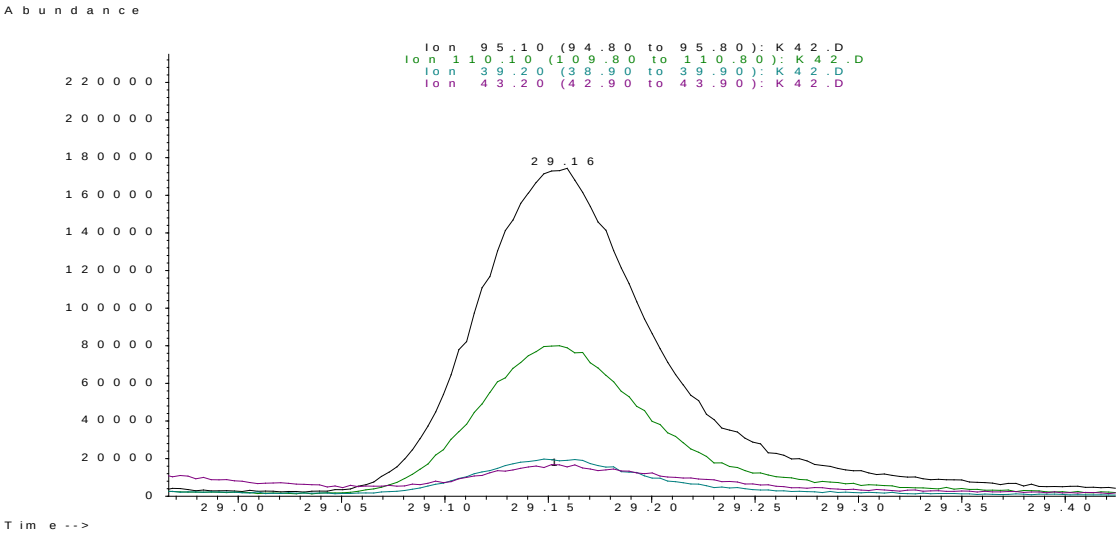
Slika 37. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 3-nonen-1-ol, cis



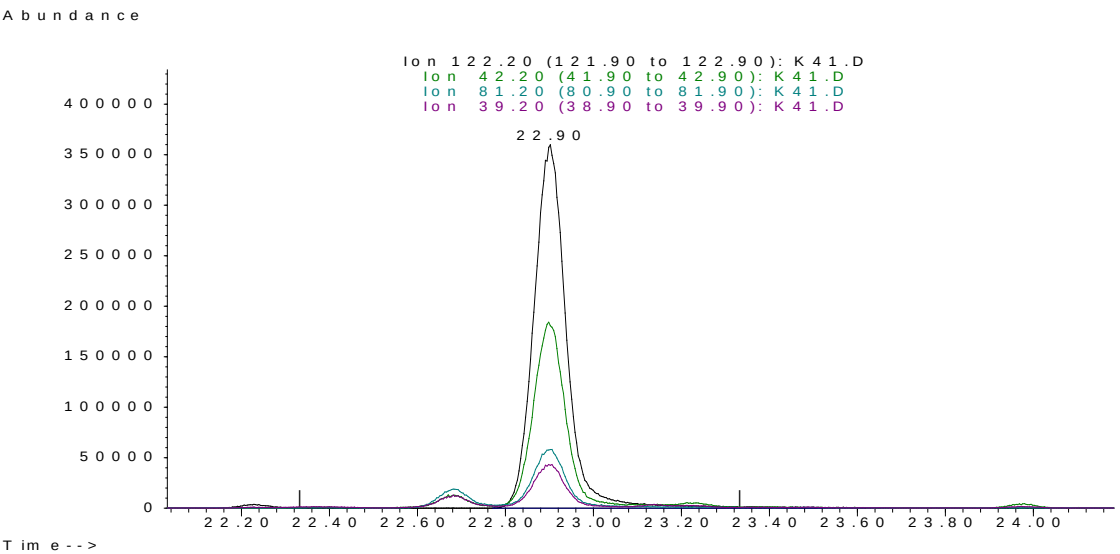
Slika 38. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za feniletil alkohol



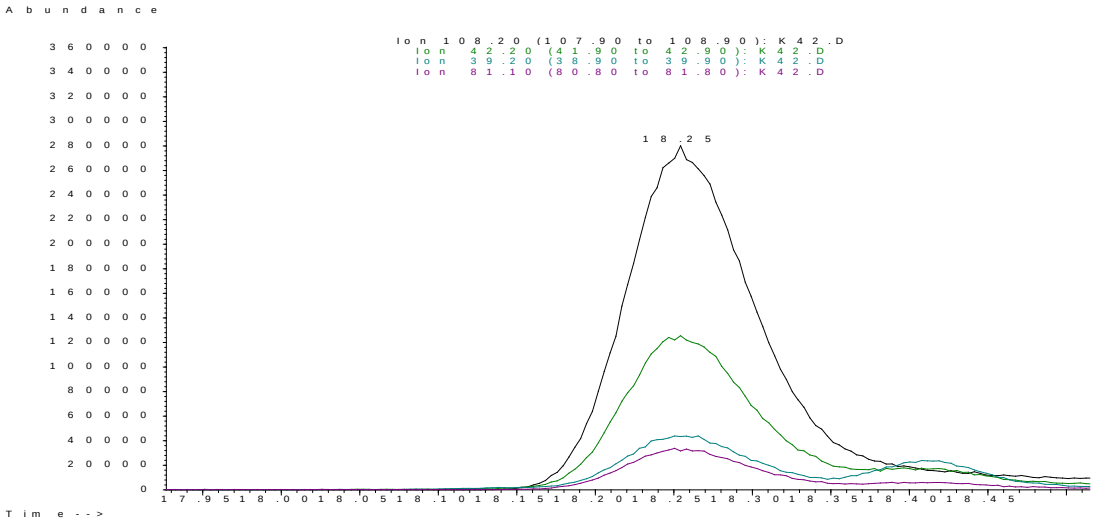
Slika 39. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-acetil pirol



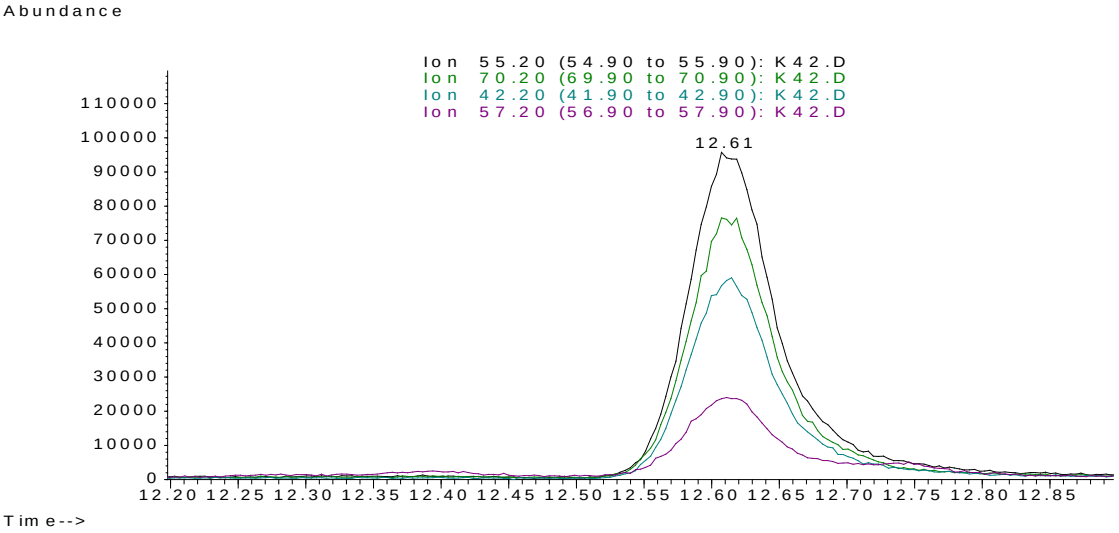
Slika 40. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-acetil furan



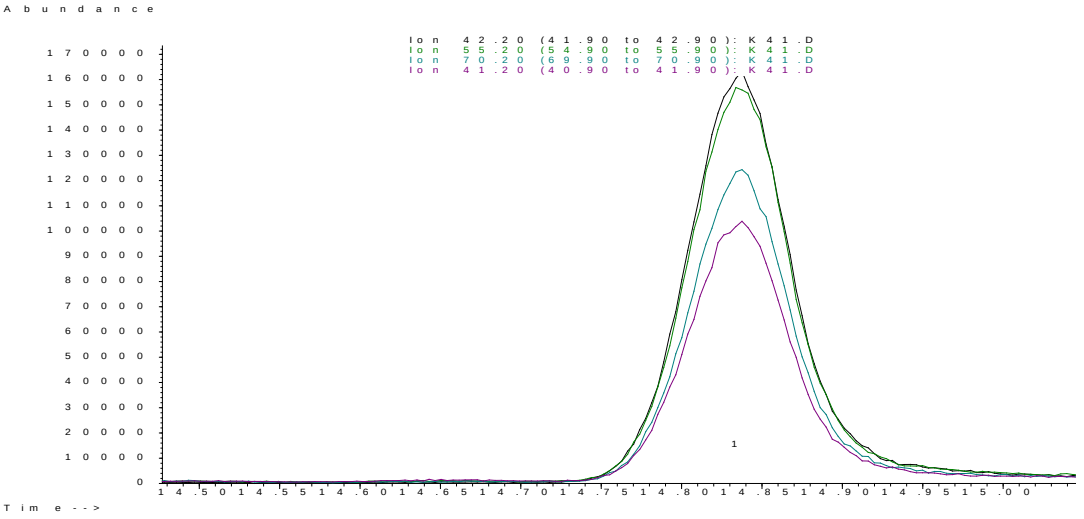
Slika 41. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2,3,5-trimetil pirazin



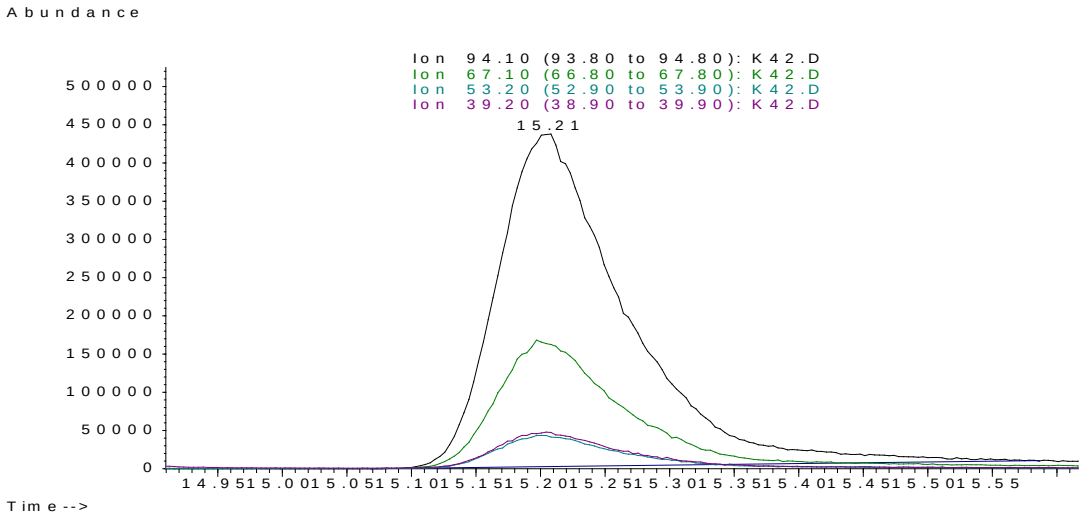
Slika 42. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2,5-dimetil pirazin



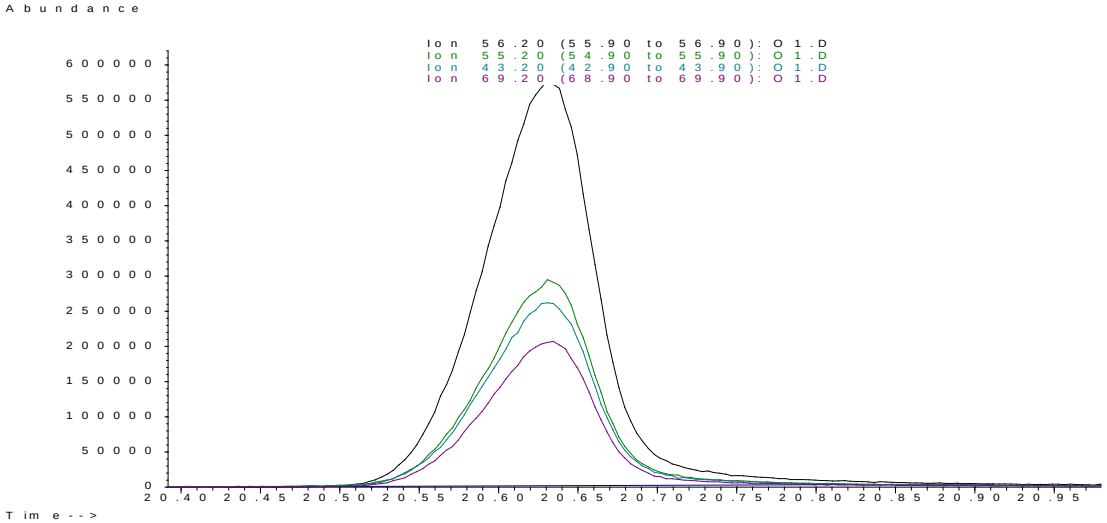
Slika 43. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 3-metil-1-butanol



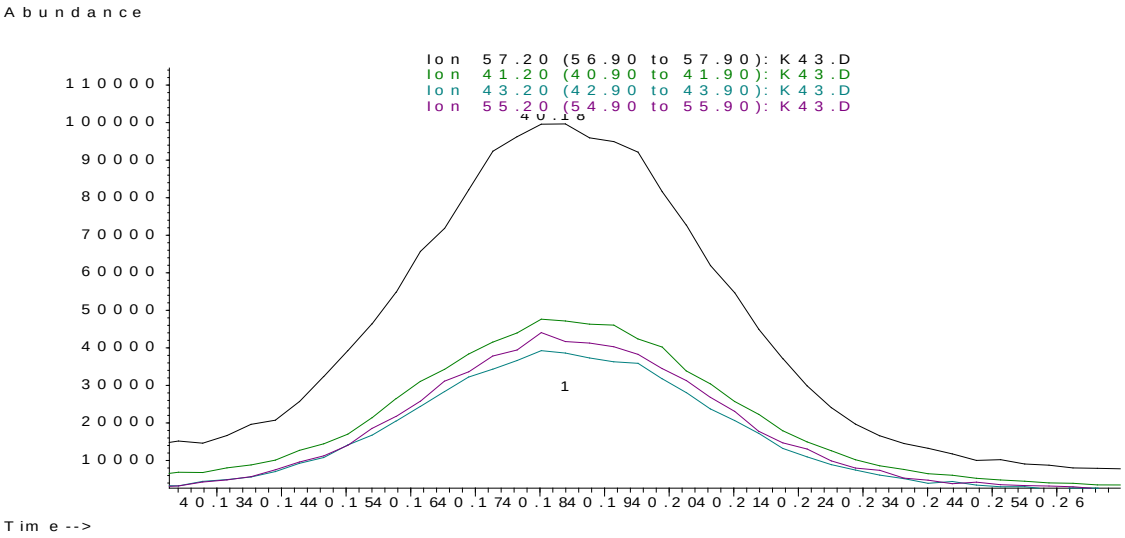
Slika 44. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 1-pentanol



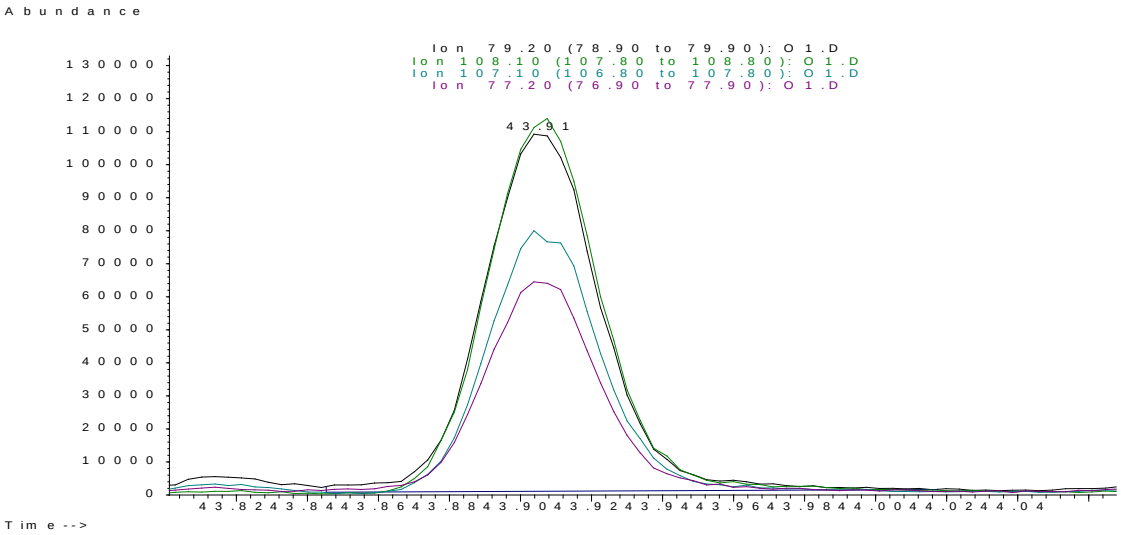
Slika 45. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-metil pirazin



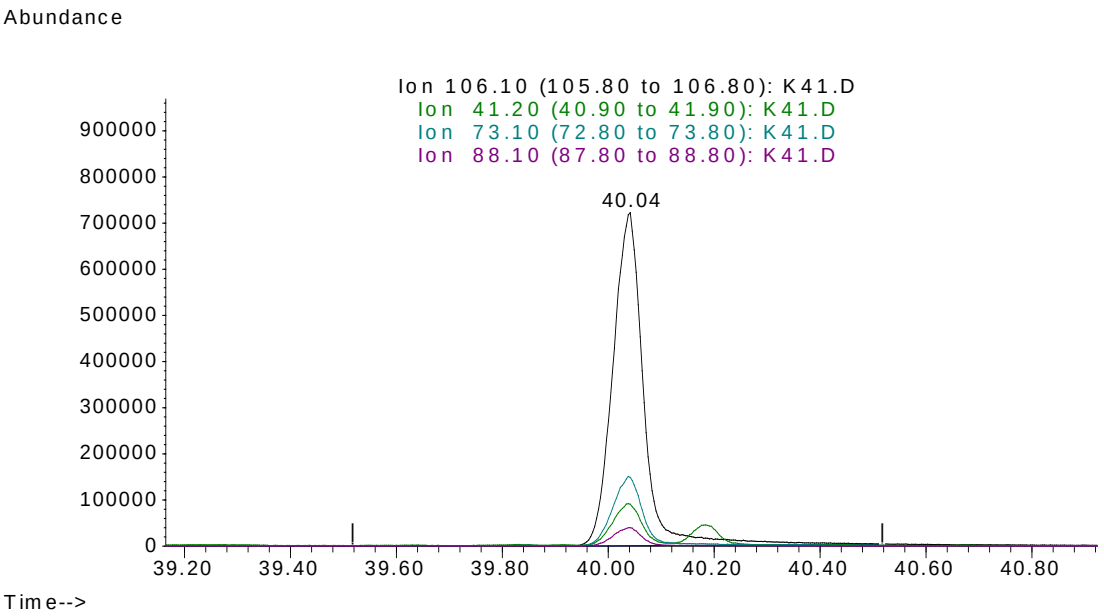
Slika 46. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 1-heksanol



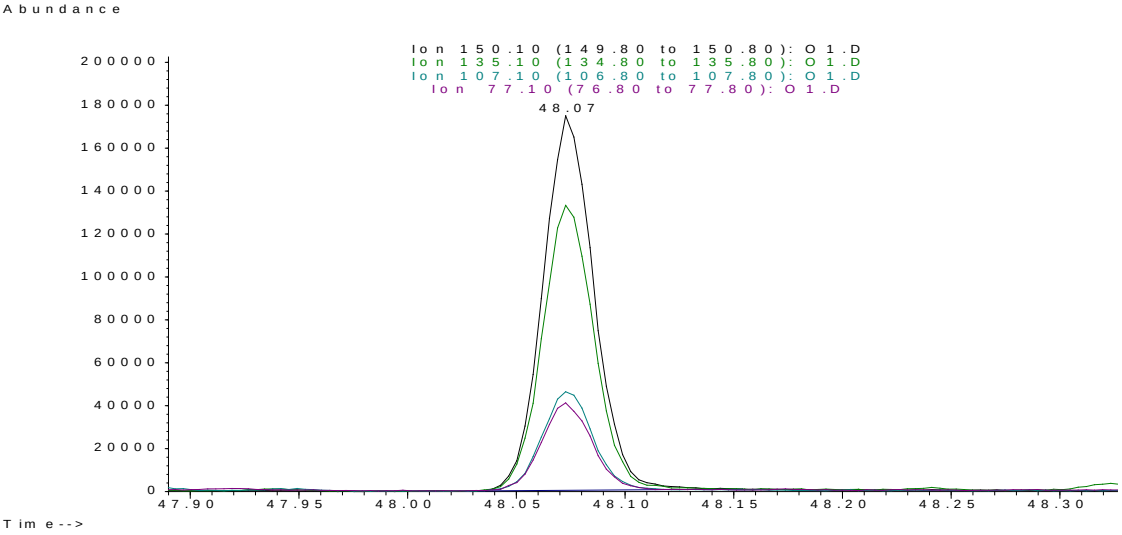
Slika 47. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-nonen-1-ol, cis



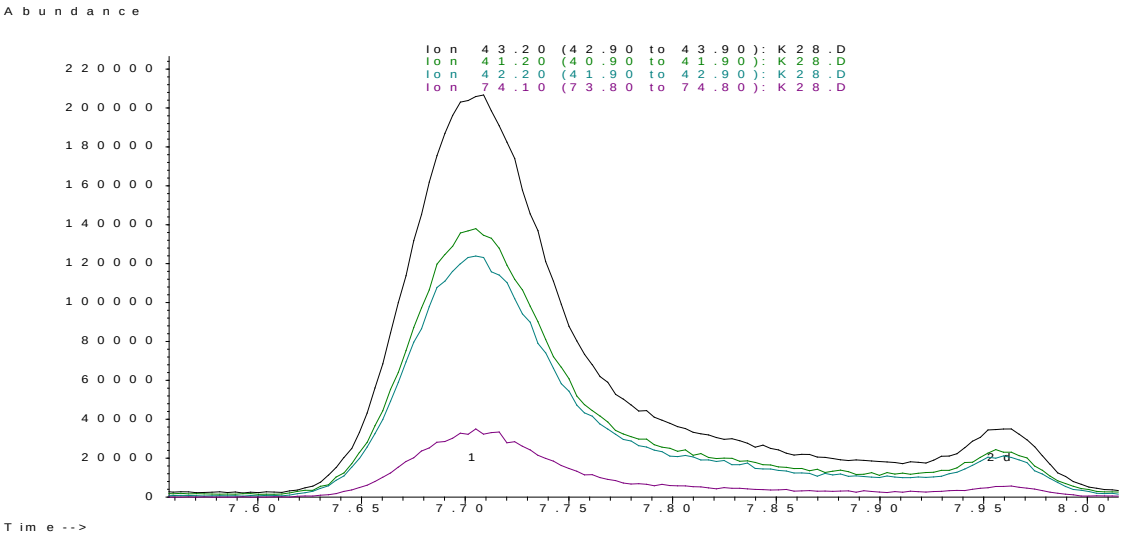
Slika 48. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za benzil alkohol



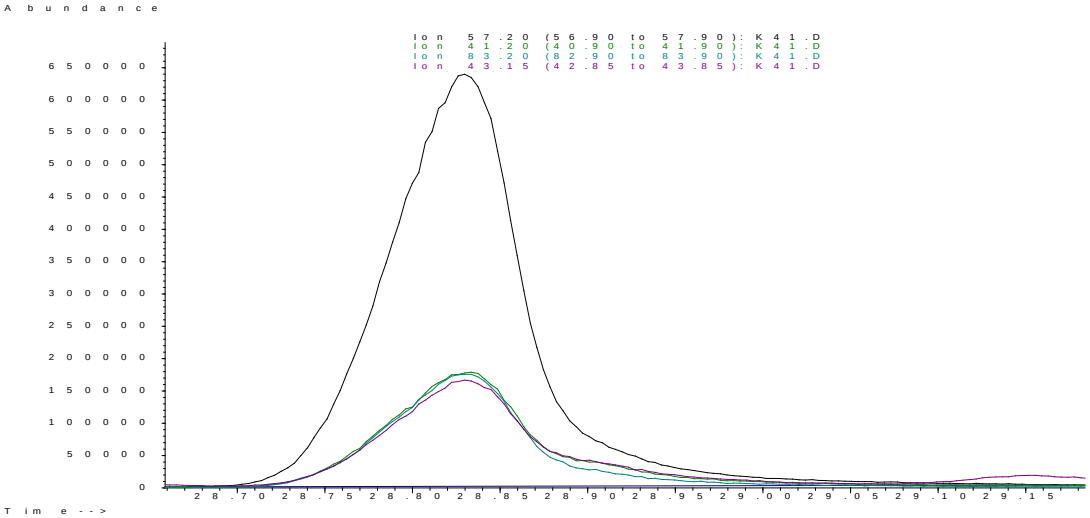
Slika 49. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 3-metiltio-1-propanol



Slika 50. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-metoksi-4-vinil fenol



Slika 51. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-metil-1-propanol

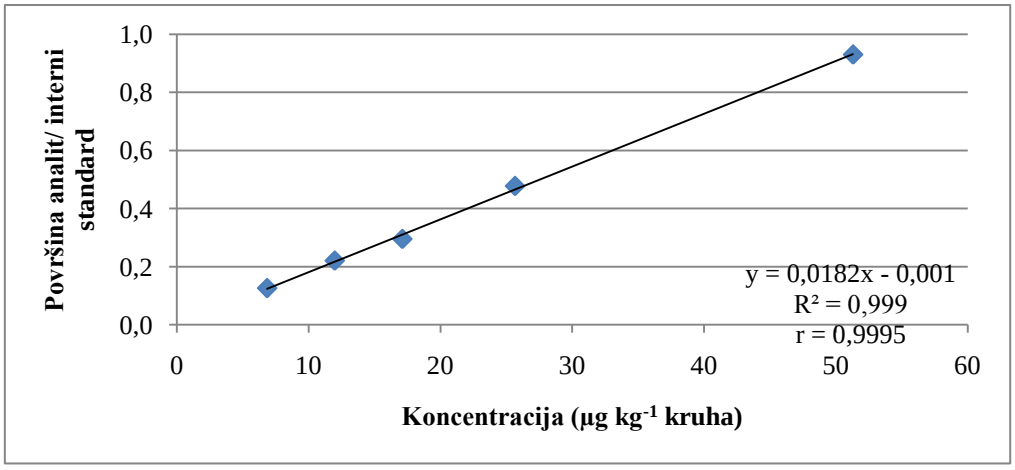


Slika 52. Prikaz kromatograma ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-etil-1-heksanol

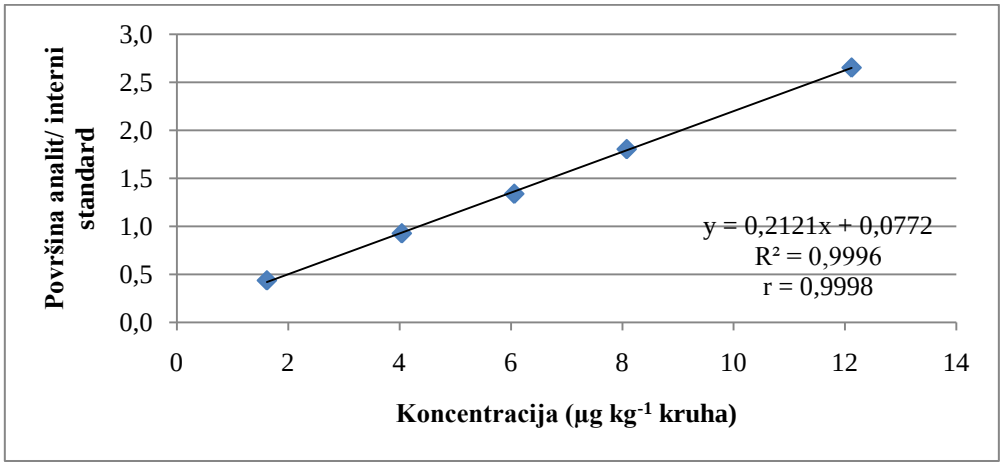
Svakom spoju prikazanom na kromatogramu (slika 29. do slika 52.) ciljani i kvalifikacijski ioni odgovaraju onima prikazanima u tablici 2. Prisutnost ciljanih iona s pravilnim omjerom kvalifikacijskih iona je dokaz o ispravnoj identifikaciji željenog spoja (Lesueur i sur., 2008). Dobiveni rezultati dokazuju da se primijenjenom metodom svaki od ciljanih analita razdvaja od ostalih prisutnih spojeva što potvrđuje selektivnost metode.

4.3.2. Linearnost i ponovljivost

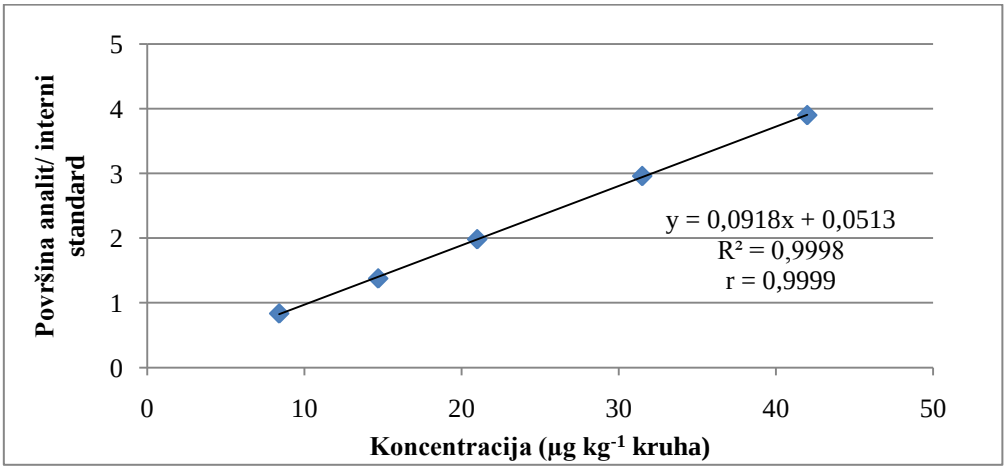
Linearnost metode je izražena kao ovisnost koncentracije i omjera odziva (površine) određenog ciljanog spoja i internog standarda (slika 53. do slika 76.). Koncentracijske razine korištene za izradu baždarnih dijagrama, rezultati određivanja iskorištenja i ponovljivosti prikazani su u tablici 5.



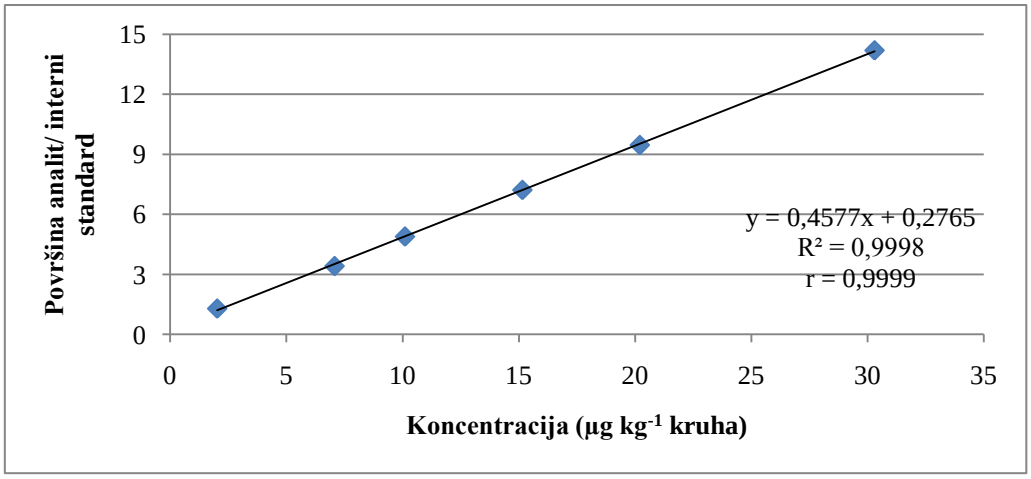
Slika 53. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-metil furana



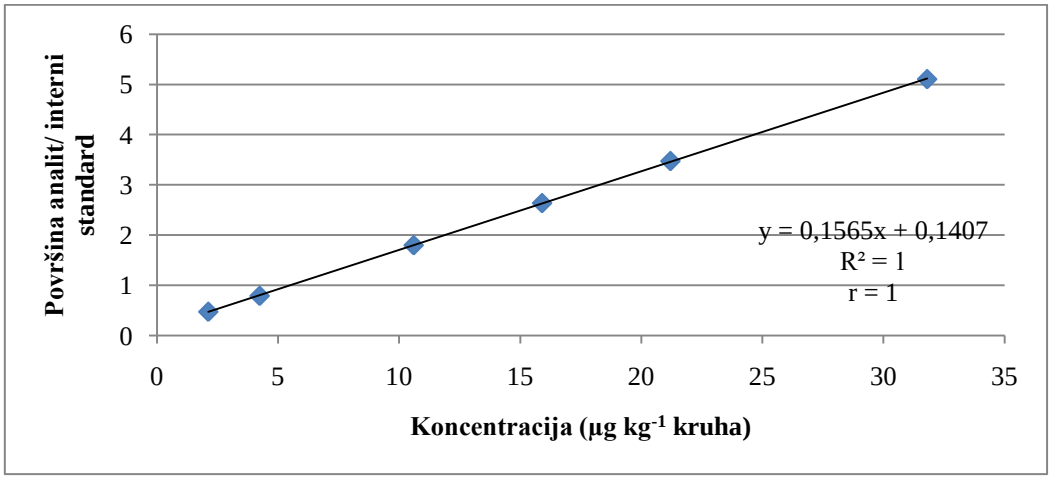
Slika 54. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-pentil furana



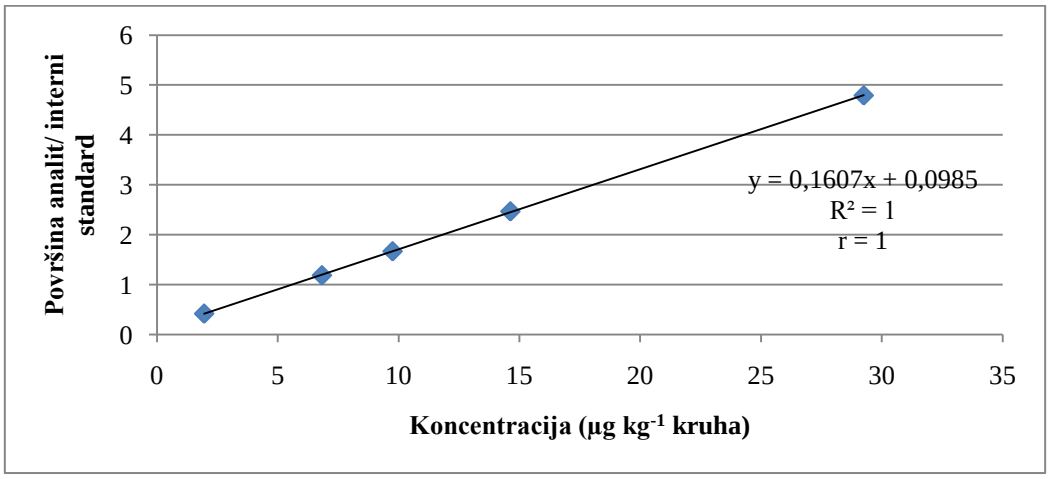
Slika 55. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-etil pirazina



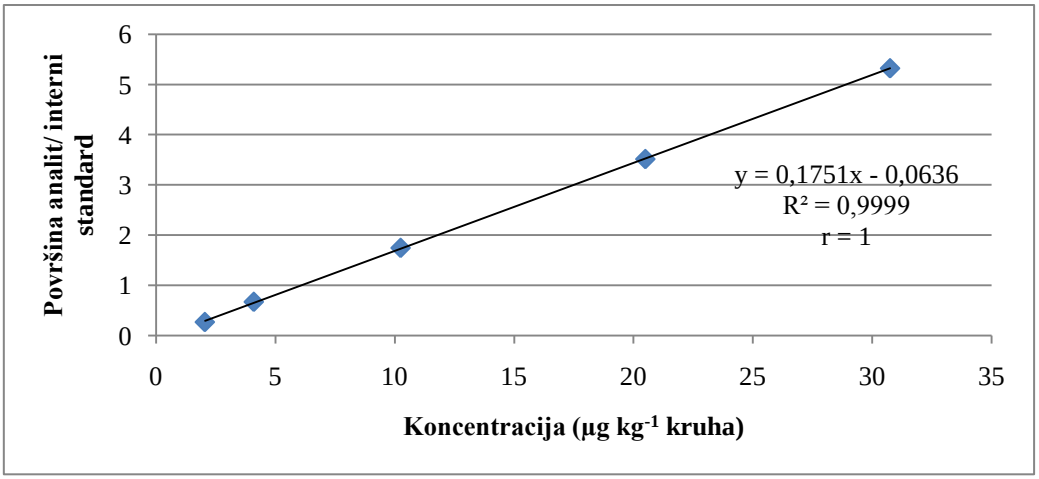
Slika 56. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 1-okten-3-ola



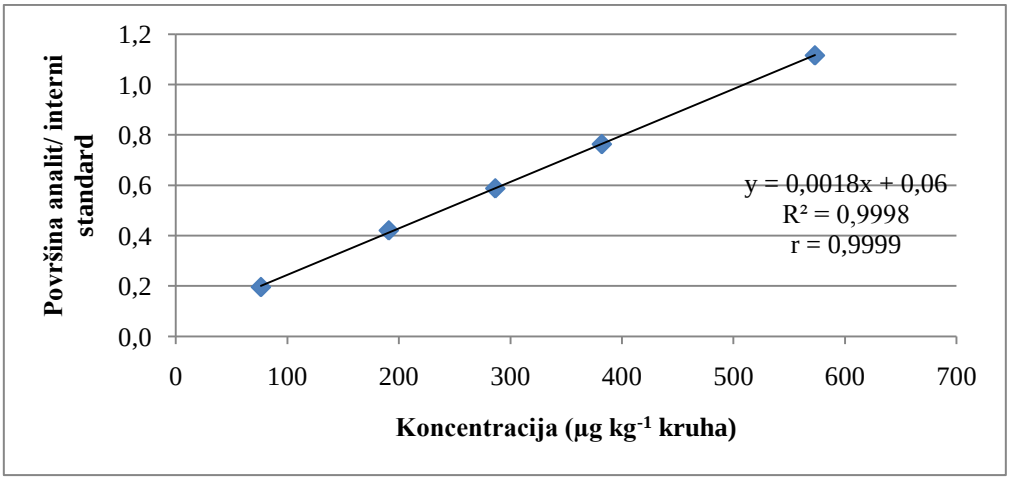
Slika 57. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 1-heptanola



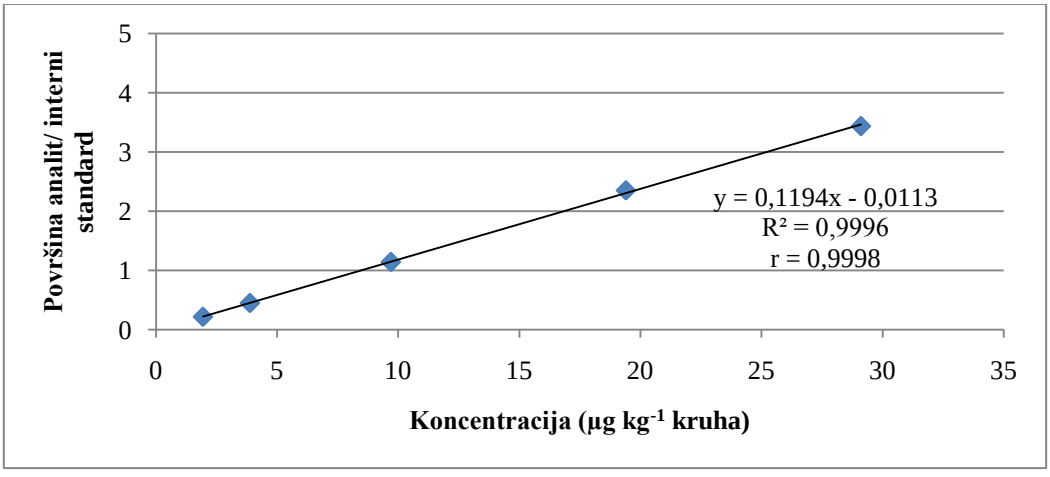
Slika 58. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 1-oktanola



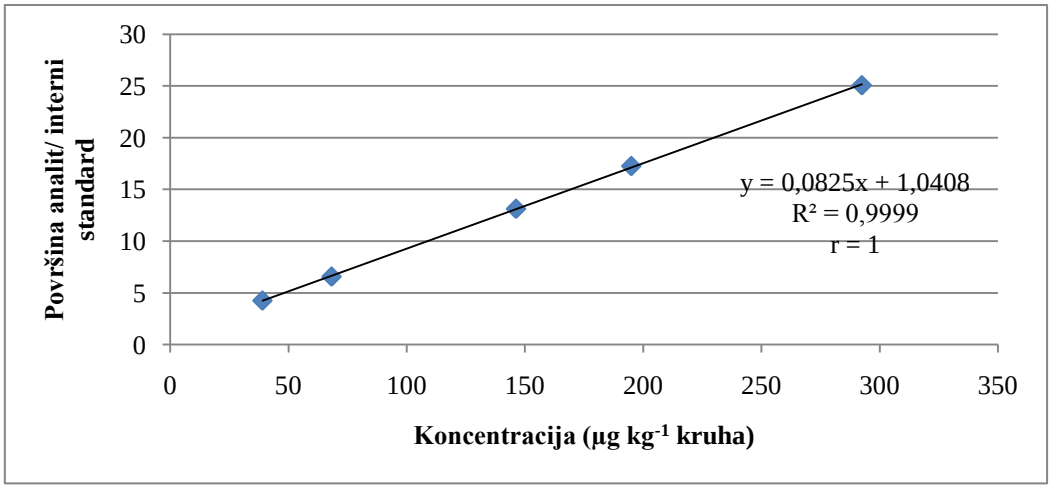
Slika 59. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-okten-1-ol, transa



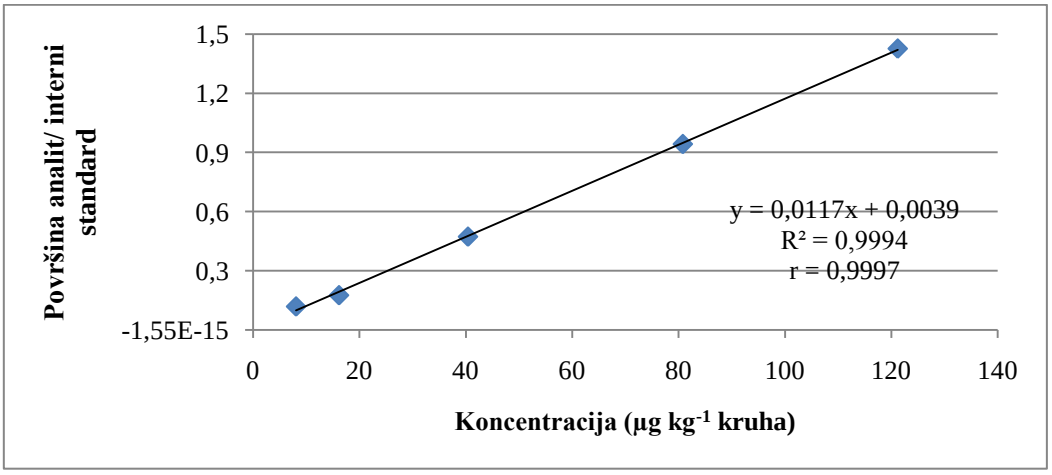
Slika 60. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-furan metanola



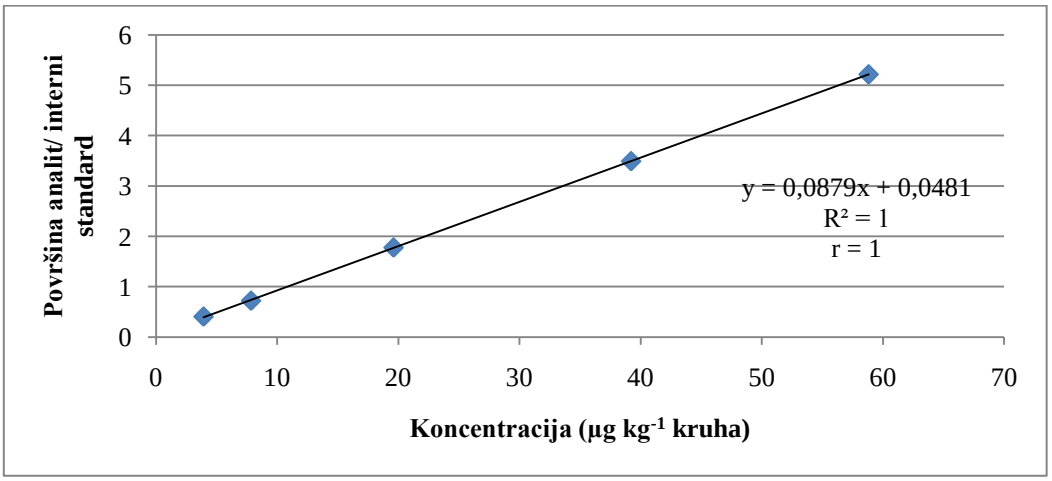
Slika 61. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 3-nonen-1-ol, cisa



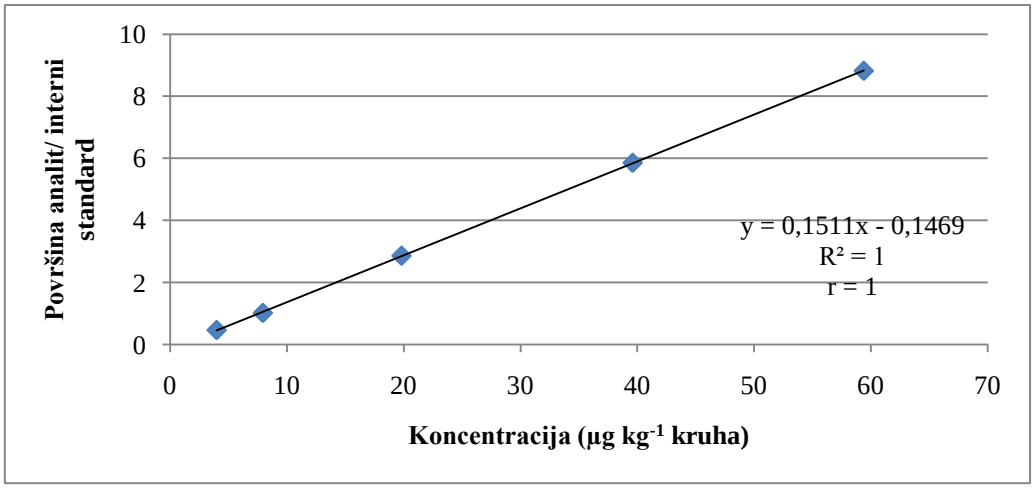
Slika 62. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji feniletil alkohola



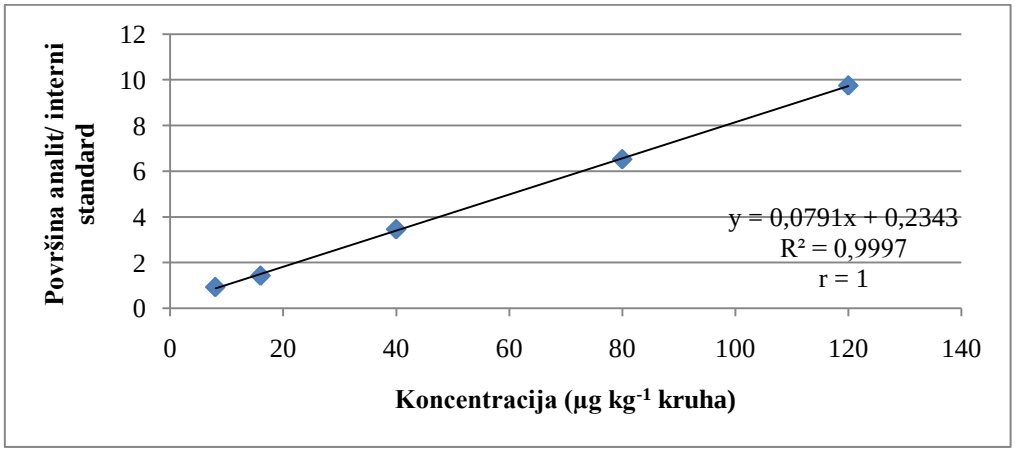
Slika 63. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-acetil pirola



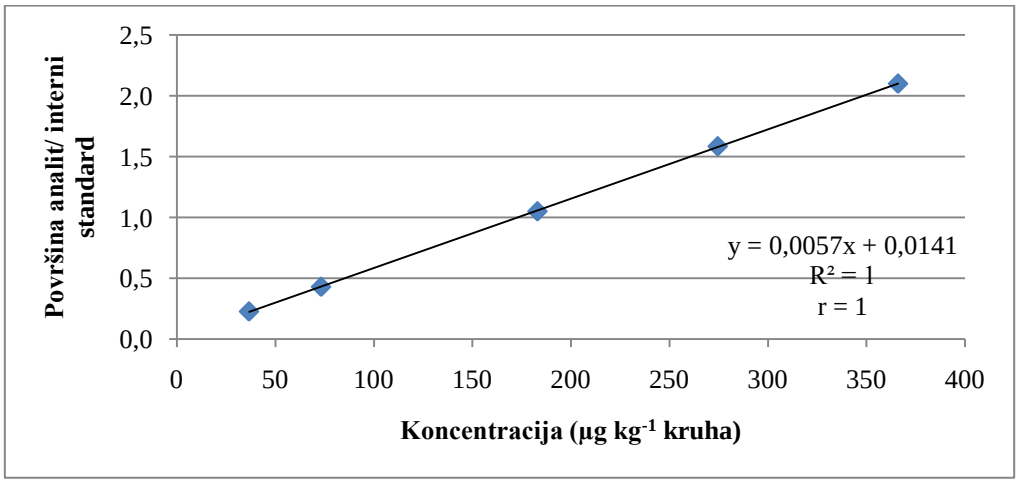
Slika 64. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-acetil furana



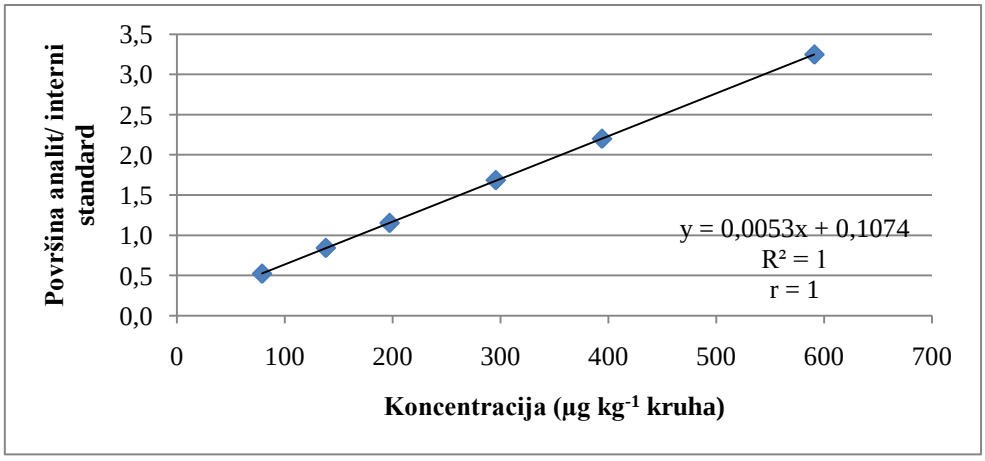
Slika 65. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2,3,5-trimetil pirazina



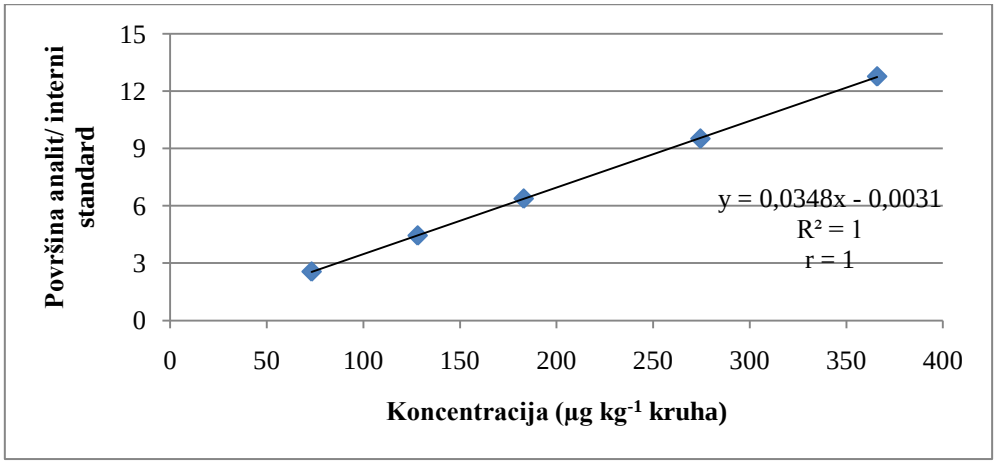
Slika 66. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2,5-dimetil pirazina



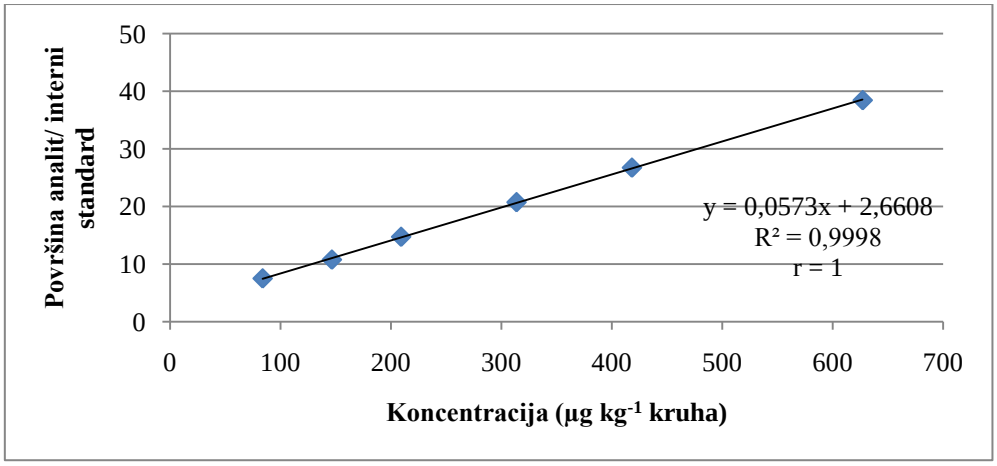
Slika 67. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 3-metil-1-butanol



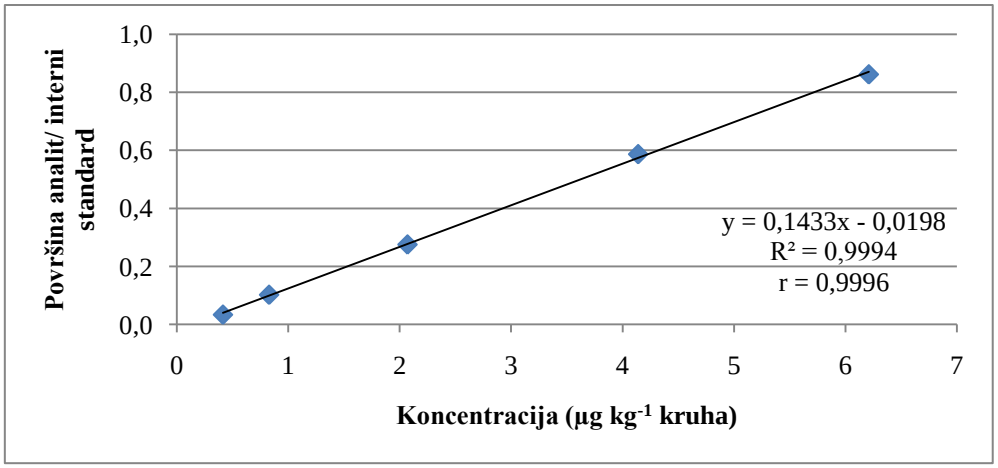
Slika 68. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 1-pentanola



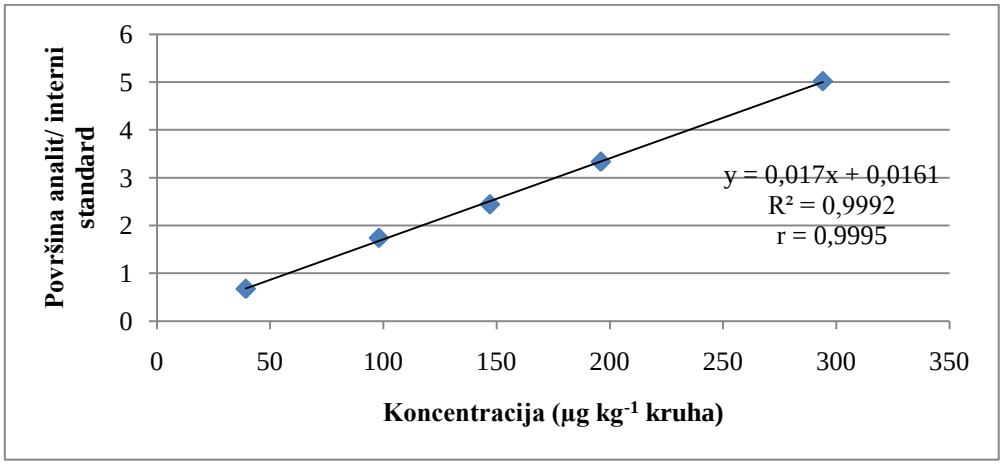
Slika 69. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-metil pirazina



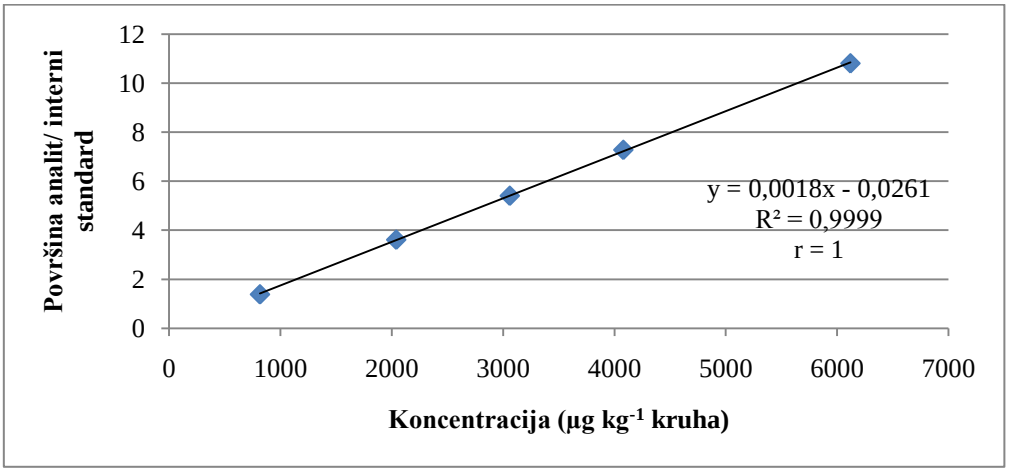
Slika 70. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 1-heksanola



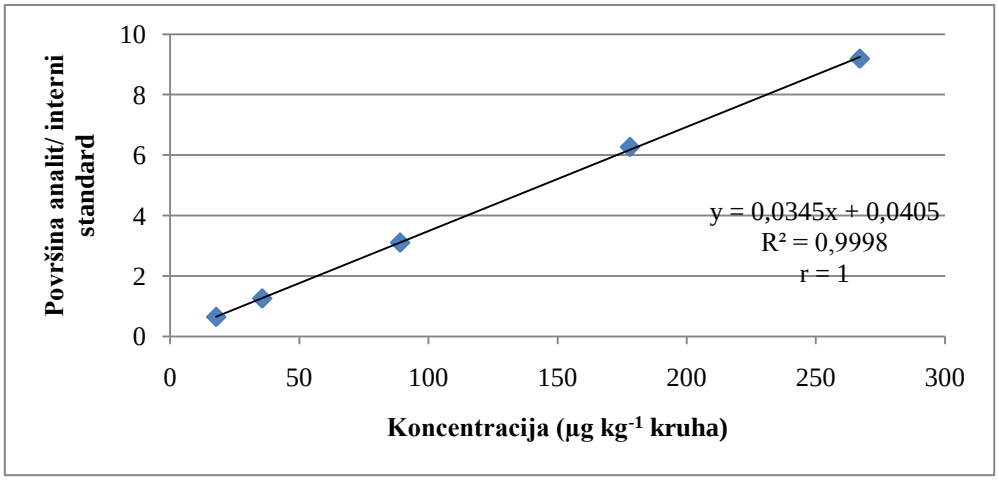
Slika 71. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-nonen-1-ol, cisa



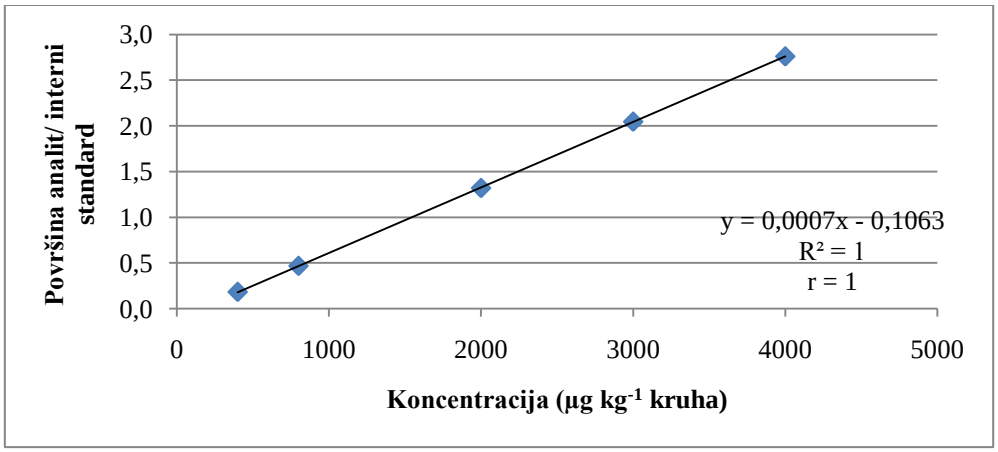
Slika 72. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji benzil alkohola



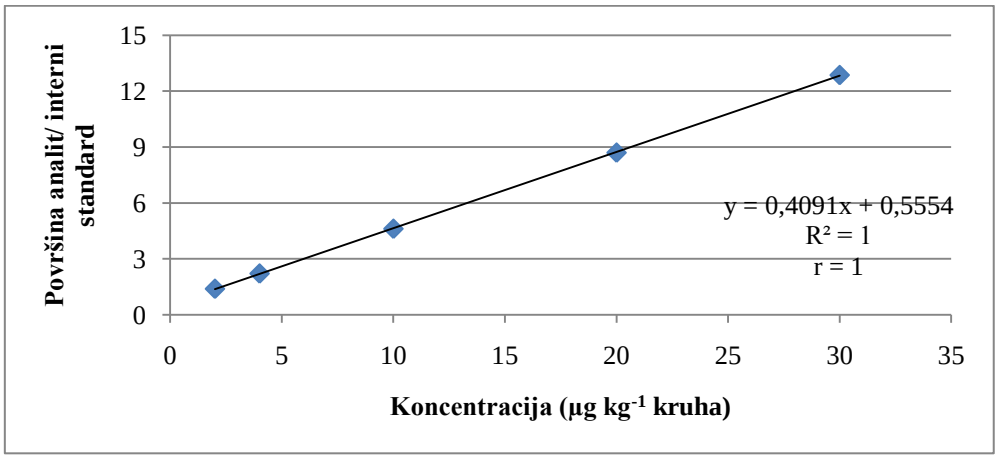
Slika 73. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 3-metiltio-1-propanola



Slika 74. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-metoksi-4-vinil fenola



Slika 75. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-metil-1-propanola



Slika 76. Ovisnost omjera površine i internog standarda o koncentraciji 2-etil heksanola

Baždarni dijagrami za svaki pojedini spoj prikazani su na slikama 53. do 76. Prikazana je jednadžba regresijskog pravca, njegov nagib i odsječak na osi y. Osim toga, prikazani su koeficijent determinacije (R^2) te koeficijent korelacije (r). Za sve spojeve koeficijent

korelacije je veći od 0,999, čime je zadovoljen kriterij prihvatljivosti. Koeficijent korelacije veći ili jednak 0,999 se smatra dovoljnim dokazom linearne kalibracije metode (Ruiz i sur., 2003; Araujo, 2009).

Ispitivanje linearnosti provedeno je mjerenjem na jedanaest koncentracijskih razina u četiri uzastopna ponavljanja, a obradom podataka odabrane su one koncentracije koje su zadovoljile parametar linearnosti. Za određivanje linearnosti preporučeno je korištenje najmanje 5 koncentracijskih razina (ICH, 2005). S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da je metoda linearna u definiranom području.

Tablica 5. Rezultati ispitivanja linearnosti, iskorištenja i ponovljivosti

Spoj	Koncentracija (μg kg^{-1} kruha)	Srednja vrijednost površine analita/ interni standard	Iskorištenje (%)	Ponovljivost, RSD (%)
2-metil furan	6,84	0,125	98,6	15,3
	11,97	0,219	98,6	6,8
	17,10	0,294	105,3	3,5
	25,65	0,477	97,7	8,2
	51,30	0,929	100,3	0,8
2-pentil furan	1,62	0,435	95,6	12,1
	4,04	0,926	101,0	3,4
	6,06	1,337	102,0	1,6
	8,08	1,803	99,3	11,8
	12,12	2,652	99,8	10,6
2-etil pirazin	8,40	0,835	98,4	6,3
	14,70	1,376	101,9	15,2
	21,00	1,981	99,9	1,0
	31,50	2,957	99,5	2,0
	42,00	3,898	100,2	4,1
1-okten-3-ol	2,02	1,295	90,7	12,3
	7,07	3,418	103,0	6,1
	10,10	4,894	100,1	6,8
	15,15	7,221	99,8	3,9
	20,20	9,464	100,6	3,7
	30,30	14,193	99,7	5,3
1-heptanol	2,12	0,474	99,3	7,7
	4,24	0,791	102,0	16,7
	10,60	1,799	100,0	1,5
	15,90	2,637	99,7	3,2
	21,20	3,474	99,5	11,7
	31,80	5,104	100,3	5,3
1-oktanol	1,95	0,412	99,7	1,7
	6,83	1,183	101,1	13,0
	9,75	1,664	100,1	8,4
	14,63	2,466	99,3	8,5
	29,25	4,792	100,1	2,3

Tablica 5. Rezultati ispitivanja linearnosti, iskorištenja i ponovljivosti – nastavak

Spoj	Koncentracija (μg kg^{-1} kruha)	Srednja vrijednost površine analita/ interni standard	Iskorištenje (%)	Ponovljivost, RSD (%)
2-okten-1-ol, trans	2,05	0,270	107,3	1,0
	4,10	0,673	97,5	7,4
	10,25	1,746	99,2	7,5
	20,50	3,515	100,3	3,8
	30,75	5,322	100,0	5,8
2-furan metanol	76,40	0,195	101,5	7,0
	191,00	0,420	95,3	12,5
	286,50	0,587	97,7	10,2
	382,00	0,763	97,7	14,0
	573,00	1,116	97,7	2,9
3-nonen-1-ol, cis	1,94	0,213	102,9	2,0
	3,88	0,446	101,2	5,9
	9,70	1,139	100,6	4,7
	19,40	2,349	98,1	2,0
	29,10	3,435	100,8	6,3
Feniletil alkohol	39,00	4,261	99,9	15,2
	68,25	6,582	101,6	3,0
	146,25	13,133	99,8	0,5
	195,00	17,264	99,2	7,8
	292,50	25,074	100,4	5,8
2-acetil pirol	8,08	0,118	82,4	11,0
	16,16	0,175	110,0	16,4
	40,40	0,472	100,8	7,9
	80,80	0,942	100,7	14,4
	121,20	1,426	99,7	7,3
2-acetil furan	3,92	0,404	96,6	2,6
	7,84	0,720	102,5	9,0
	19,60	1,776	99,7	4,1
	39,20	3,492	100,0	4,1
	58,80	5,217	100,0	3,9
2,3,5-trimetil pirazin	3,96	0,465	97,7	15,6
	7,92	1,017	102,8	1,8
	19,80	2,859	99,5	18,0
	39,60	5,853	99,7	3,7
	59,40	8,815	100,1	4,3

Tablica 5. Rezultati ispitivanja linearnosti, iskorištenja i ponovljivosti - nastavak

Spoj	Koncentracija (μg kg^{-1} kruha)	Srednja vrijednost površine analita/ interni standard	Iskorištenje (%)	Ponovljivost, RSD (%)
2,5-dimetil pirazin	8,00	0,920	92,2	8,8
	16,00	1,419	106,8	5,3
	40,00	3,451	98,3	3,7
	80,00	6,519	100,7	4,6
	120,00	9,748	99,8	4,4
3-metil-1-butanol	36,60	0,226	98,1	16,2
	73,20	0,429	100,4	8,7
	183,00	1,050	100,7	6,0
	274,50	1,584	99,6	4,6
	366,00	2,099	100,0	4,8
1-pentanol	78,80	0,522	100,7	14,1
	137,90	0,842	99,5	9,4
	197,00	1,152	99,9	4,9
	295,50	1,684	99,3	1,1
	394,00	2,199	99,8	6,1
	591,00	3,245	99,8	2,8
2-metil pirazin	73,20	2,559	99,4	5,8
	128,10	4,444	100,2	5,7
	183,00	6,373	99,9	6,1
	274,50	9,509	100,4	9,3
	366,00	12,759	99,8	7,5
1-heksanol	83,60	7,499	99,0	7,9
	146,30	10,760	103,5	4,9
	209,00	14,724	99,3	7,8
	313,50	20,733	99,4	2,4
	418,00	26,729	99,5	6,2
	627,00	38,441	100,4	5,6
2-nonen-1-ol, cis	0,41	0,033	111,9	9,8
	0,83	0,101	97,5	7,7
	2,07	0,275	100,5	6,4
	4,14	0,586	97,8	4,3
	6,21	0,861	100,9	5,8

Tablica 5. Rezultati ispitivanja linearnosti, iskorištenja i ponovljivosti - nastavak

Spoj	Koncentracija (μg kg^{-1} kruha)	Srednja vrijednost površine analita/ interni standard	Iskorištenje (%)	Ponovljivost, RSD (%)
Benzil alkohol	39,20	0,674	101,2	10,6
	98,00	1,739	96,7	12,5
	147,00	2,441	103,0	12,9
	196,00	3,334	100,4	4,4
	294,00	5,019	99,9	1,8
3-metiltio-1-propanol	816,00	1,387	103,9	9,5
	2040,00	3,614	100,9	7,0
	3060,00	5,404	101,4	8,5
	4080,00	7,275	100,6	5,8
	6120,00	10,801	101,7	4,1
2-metoksi-4-vinil fenol	17,80	0,641	102,2	13,6
	35,60	1,252	101,3	20,1
	89,00	3,103	100,2	6,0
	178,00	6,268	98,6	5,6
	267,00	9,193	100,6	8,5
2-metil-1-propanol	400,00	0,182	96,9	3,8
	800,00	0,467	97,6	3,2
	2000,00	1,320	98,1	4,5
	3000,00	2,046	97,5	0,7
	4000,00	2,761	97,7	3,3
2-etil-1-heksanol	2,00	1,392	97,7	21,0
	4,00	2,211	98,8	8,7
	10,00	4,613	100,8	4,5
	20,00	8,699	100,5	17,6
	30,00	12,861	99,7	5,6

Srednja vrijednost iskorištenja kretala se od 99,5 % za 2-pentil furan do 101,7 % za 2-nonen-1-ol, cis. Iskorištenje svakog pojedinog spoja na određenoj koncentracijskoj razini nalazi se unutar prihvatljivog raspona vrijednosti iskorištenja iz priručnika AOAC (2011) navedenim u tablici 3. Na temelju toga, može se utvrditi da se ovom metodom postiže odgovarajuće iskorištenje i da je zadovoljen kriterij prihvatljivosti.

Ponovljivost je izražena kao relativna standarna devijacija odziva (površine), a prikazana je za spojeve pri koncentracijama koje su zadovoljile parametar linearnosti. Srednja vrijednost RSD se kretala od 3,1 % za 2-metil-1-propanol do 11,5 % za 2-etil-1-heksanol.

Vrijednosti za svaki pojedini spoj pri određenim koncentracijama zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti za vrijednosti relativne standardne devijacije iz priručnika AOAC (2011) prikazane u tablici 3. Na osnovu toga se može utvrditi da je metoda ponovljiva.

4.3.3. Intermedijarna preciznost

Rezultati određivanja intermedijarne preciznosti prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti

Spoj	**Koncentracija ($\mu g\ kg^{-1}$ kruha)**	**Intermedijarna preciznost, RSD (%)**
2-metil furan	6,84	7,6
	17,10	3,0
	34,20	3,4
2-pentil furan	1,62	3,3
	4,04	3,3
	8,08	2,1
2-etil pirazin	8,40	5,4
	21,00	4,8
	42,00	4,2
1-okten-3-ol	4,04	7,1
	10,10	6,3
	20,20	8,3
1-heptanol	4,24	5,2
	10,60	4,5
	21,20	5,2
1-oktanol	3,90	6,7
	9,75	5,1
	19,50	6,9
2-okten-1-ol, trans	4,10	5,3
	10,25	4,5
	20,50	4,3

Tablica 6. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti - nastavak

Spoj	**Koncentracija ($\mu g\ kg^{-1}$ kruha)**	**Intermedijarna preciznost, RSD (%)**
2-furan metanol	76,40	6,0
	191,00	5,2
	382,00	5,3
3-nonen-1-ol, cis	3,88	5,8
	9,70	4,4
	19,40	6,8
Feniletil alkohol	39,00	7,6
	97,50	8,8
	195,00	5,3
2-acetil pirol	16,16	3,8
	40,40	7,4
	80,80	6,4
2-acetil furan	7,84	7,9
	19,60	5,7
	39,20	6,6
2,3,5-trimetil pirazin	7,92	3,4
	19,80	4,8
	39,60	5,5
2,5-dimetil pirazin	16,00	5,6
	40,00	3,7
	80,00	4,6
3-metil-1-butanol	73,20	4,6
	183,00	3,7
	366,00	3,2
1-pentanol	78,80	4,9
	197,00	4,1
	394,00	3,7

Tablica 6. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti - nastavak

Spoj	**Koncentracija ($\mu g\ kg^{-1}$ kruha)**	**Intermedijarna preciznost, RSD (%)**
2-metil pirazin	73,20	2,5
	183,00	3,4
	366,00	2,7
1-heksanol	83,60	5,4
	209,00	3,7
	418,00	2,1
2-nonen-1-ol, cis	0,83	4,1
	2,07	3,9
	4,14	2,5
Benzil alkohol	39,20	1,9
	98,00	1,3
	196,00	0,2
3-metiltio-1-propanol	816,00	4,6
	2040,00	1,7
	4080,00	1,9
2-metoksi-4-vinil fenol	35,60	4,2
	89,00	2,9
	178,00	2,8
2-metil-1-propanol	800,00	2,8
	2000,00	2,5
	4000,00	1,5
2-etil-1-heksanol	4,00	1,5
	10,00	1,3
	20,00	1,6

Intermedijarna preciznost određena je mjerenjima na tri koncentracijske razine uz tri ponavljanja u tri različita dana. Srednja vrijednost rezultata intermedijarne preciznosti kretala se od 1,17 % za benzil alkohol do 7,24 % za feniletil alkohol. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da je metoda intermedijarno precizna.

Raffo i sur. (2015) u svojem su istraživanju prikazali metodu za određivanje hlapljivih spojeva iz kore i sredine kruha uz pomoć HS-SPME/GC-MS metode. Međuostalim, ispitali su i intermedijarnu preciznost koja je za 3-metil-1-butanol iznosila 5,7 % u kori kruha, a 5,2 % u cijeloj kriški. Za 1-heksanol intermedijarna preciznost u kori kruha iznosila je 9,8 %, a u cijeloj kriški 8,9 %, za 1-okten-3-ol su određene vrijednosti od 3,7 % u kori i 3,5 % u kriški. Za 2-fenil-1-etanol iznosila je 1,9 % u kori 1,6 % u kriški. Vrijednosti intermedijarne preciznosti za 2-pentil furan su 11,6 % u kori kruha i 9,2 % u cijeloj kriški, za 2-acetil furan 8,5 % u kori i 5,8 % u cijeloj kriški. Za spoj 2,5-dimetil pirazin rezultati su pokazali vrijednost od 8,7 % u kori i 6,7 % u kriški, a za 2-acetil pirol 8,3 % u kori kruha i 4,8 % u cijeloj kriški.

Usporedbom rezultata može se zaključiti da su dobiveni rezultati u skladu s literaturom.

4.3.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Rezultati ispitivanja granice detekcije i granice kvantifikacije za svaki pojedini spoj prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Rezultati ispitivanja granice detekcije i granice kvantifikacije

Spoj	**Granica detekcije (µg kg^{-1} kruha)**	**Granica kvantifikacije (µg kg^{-1} kruha)**
2-metil furan	1,62	4,90
2-pentil furan	0,27	0,82
2-etil pirazin	0,67	2,02
1-okten-3-ol	0,41	1,25
1-heptanol	0,19	0,57
1-oktanol	0,20	0,59
2-okten-1-ol	0,28	0,86
2-furan metanol	9,48	28,73
3-nonen-1-ol	0,61	1,85
Feniletil alkohol	3,78	11,45
2-acetil pirol	3,29	9,95
2-acetil furan	0,33	1,01
2,3,5-trimetil pirazin	0,40	1,20
2,5-dimetil pirazin	2,09	6,34
3-metil-1-butanol	2,75	8,34
1-pentanol	2,21	6,69
2-metil pirazin	2,76	8,37
1-heksanol	8,35	25,29
2-nonen-1-ol	0,16	0,50
Benzil alkohol	9,58	29,03
3-metiltio-1-propanol	78,45	237,72
2-metoksi-4-vinil fenol	4,25	12,88
2-metil-1-propanol	17,04	51,65
2-etil-1-heksanol	0,22	0,67

Vrijednost granice detekcije koju su Raffo i sur. (2015) dobili za 3-metil-1-butanol je 6 μg kg^{-1}, a granice kvantifikacije 21 μg kg^{-1}. LOD za 1-heksanol iznosio je 0,7 μg kg^{-1}, a LOQ 2,3 μg kg^{-1}. Za 1-okten-3-ol granica detekcije procijenjena je na 0,16 μg kg^{-1}, a kvantifikacije na 0,53 μg kg^{-1}. Vrijednosti LOD i LOQ su za 2-acetil furan iznosile 0,9 μg kg^{-1} i 3 μg kg^{-1}, za 2,5-dimetil pirazin 0,6 μg kg^{-1} i 2 μg kg^{-1}, dok je za 2-acetil pirol granica detekcije iznosila 4 μg kg^{-1}, a granica kvantifikacije 13 μg kg^{-1}.

Ruiz i sur. (2003) su također računali granicu detekcije za određivane spojeve. LOD za svaki spoj određen je preko Detarchi računalnog programa iz kalibracijskih dijagrama, pri čemu su u obzir uzete standardne devijacije. Dobivena vrijednosti granice detekcije za 1-heksanol je 0,016 μg kg^{-1}, a za benzil alkohol 0,014 μg kg^{-1}.

Pri usporedbi s rezultatima drugih istraživanja mogu se primijetiti razlike u izračunatim granicama detekcije i kvantifikacije, što se djelomično može objasniti različitim načinom izračuna navedenih vrijednosti. Koncentracije ciljanih analita odabrane za izradu baždarnih dijagrama i analizu spojeva se nalaze iznad vrijednosti granica kvantifikacije prikazanih u tablicama 5. i 6.

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog istraživanja bilo je provesti optimizaciju i validaciju HS-SPME/GC-MS metode za određivanje 17 alkohola, 4 pirazina i 3 furana u uzorcima bezglutenskog kruha.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Optimizirana je HS-SPME/GC-MS metoda za određivanje spojeva iz skupine alkohola, pirazina i furana. Definirani su optimalni uvjeti mikroekstrakcije – temperatura 60 °C i trajanje 60 min.

2. Validacija metode provedena je pri optimalnim uvjetima mikroekstrakcije. Ključni validacijski parametri bili su selektivnost, linearnost, preciznost, granica detekcije i granica kvantifikacije.

3. Selektivnost metode utvrđena je pregledom kromatograma ciljanih i kvalifikacijskih iona svakog ciljanog analita na osnovu čega se može zaključiti da je metoda selektivna pri određivanju svih analiziranih spojeva.

4. Koeficijent korelacije veći od 0,999 potvrđuje linearnost metode u definiranom radnom području za sve ciljane spojeve.

5. Rezultati ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti potvrđuju da se vrijednosti relativnih standardnih devijacija nalaze unutar raspona određenog kriterija prihvatljivosti u ovisnosti o koncentracijama ispitivanih spojeva, a što dokazuje da je metoda precizna.

6. Rezultati određivanja granice detekcije i granice kvantifikacije pokazuju da je metoda prihvatljive osjetljivosti za određivanje ispitivanih alkohola, pirazina i furana u uzorcima bezglutenskog kruha.

7. Svi ključni validacijski parametri su pod navedenim uvjetima zadovoljili kriterije prihvatljivosti te se HS-SPME/GC-MS metoda može smatrati prikladnom za namijenjenu svrhu.

6. LITERATURA

Ahlborn, G. J., Pike, O. A., Hendrix, S. B., Hess, W. M., Huber, C. S. (2005) Sensory, mechanical, and microscopic evaluation of staling in low-protein and gluten-free breads. *Cereal Chem.* **82** (3), 328-335.

Anonymus (2012) Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline <http://bgconv.com/docs/index-72626.html?page=6>. Pristupljeno 18. kolovoza 2016.

AOAC (2011) Standard Format and Guidance for AOAC Standard Method Performance Requirement (SPMR) Documents, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Araujo, P. (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B.* **877**, 2224-2234.

Arendt, E. i Dal Bello, F. (2011) Gluten-free cereal products and beverages, 1. izd., Academic Press, Cambridge.

Arthur, C. L., Pawliszyn, J. (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62**, 2145-2148.

Bárcenas, M. E., Haros, M., Benedito, C., Rosell, C. M. (2003) Effect of freezing and frozen storage on the staling of part-baked bread. *Food Res. Int.* **36**, 863-869.

BeMiller, J. N. (2008) Hydrocolloids. U: Gluten-free Cereal Products and Beverages (Arendt, E. K., Dal Bello, F., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 203-215.

Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Musci, M. (2007) Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: database creation and evaluation of precision and robustness. *J. Sep. Sci.* **30**, 563-572.

Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marqués, J. C., Cacho, J. (2006) Quantitative gas chromatography–olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. *Anal. Chim. Acta*. **563** (1), 180-187.

Catassi, C., Fasano, A. (2008) Celiac disease. *Curr. Opin. Gastroen.* **24** (6), 687-691.

Cayot, N. (2007) Sensory quality of traditional foods. *Food Chem*. **101** (1), 154-162.

Charles, M., Martin, B., Ginies, C., Etievant, P., Coste, G., Guichard, E. (2000) Potent Aroma Compounds of Two Red Wine Vinegars. *J. Agric. Food Chem.* **48** (1), 70-77.

Condurso, C., Verzera, A., Romeo, V., Ziino, M., Conte, F. (2008) Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life. *Int. Dairy J.* **18** (8), 819-825.

FAO/WHO (2006) *Combined Compendium of Food Addiitive Specifications*, Food and Agriculture Organization of the United Nations i World Health Organization, Rome, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0691e/a0691e.pdf>. Pristupljeno 27. kolovoza 2016.

Frasse, P., Lambert, S., Levesque, C., Melcion, D., Richard-Molard, D., Chiron, H. (1992) The influence of fermentation on volatile compounds in french bread crumb. *Lebensm. Wiss. Technol.* **25**, 66-70.

Gallagher, E., Gormley, T. R., Arendt, E. K. (2003) Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *J. Food Eng.* **56**, 153-161.

Gan, Z., Angold, R. E., Williams, M. R., Ellis, P. R., Vaughan, J. G., Galliard, T. (1990) The microstructure and gas retention of bread dough. *J. Cereal Sci.* **12** (1), 15-24.

Gänzle, M. G., Vermeulen, N., Vogel, R. F. (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* **24**, 128–138.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. (2005) Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Tech*. **16** (1), 57-69.

Grob, R. L., Barry, E. F. (2004) Modern practice of gas chromatography, 4. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken/ New Jersey, str. 277-547.

Gujral, H. S., Haros, M., Rosell, C. M. (2003) Starch hydrolyzing enzymes for retarding the staling of rice bread. *Cereal Chem.* **80** (6), 750-754.

Hansen, Å., Hansen, B. (1996) Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*. **202**, 244-249.

Hansen, A., Schieberle, P. (2005) Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 85-94.

Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D. L., McDowall, R. D. (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharmaceut. Biomed.* **17** (2), 193-218.

Ho, C. W., Wan Aida, W. M., Maskat, M. Y., Osman, H. (2006) Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis of aroma compound in palm sugar (Arenga pinnata). *J. Food Compos. Anal.* **19** (8), 822-830.

ICH (2005) ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), International Conference on Harmonisation, Geneva.

ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.

Jensen, S., Oestdal, H., Skibsted, L. H., Larsen, E., Thybo, A. K. (2011) Chemical changes in wheat pan bread during storage and how it affects the sensory perception of aroma, flavour, and taste. *J. Cereal Sci.* **53** (2), 259-268.

Kenny, S., Wehrle, K., Auty, M., Arendt, E. K. (2001) Influence of sodium caseinate and whey protein on baking properties and rheology of frozen dough. *Cereal Chem.* **78**, 458-463.

Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri* **1**, 61-64.

Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., Biliaderis, C. G. (2007) Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *J. Food Eng.* **79** (3), 1033-1047.

Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M. (2008) Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chomatography-mass spectrometry and liquid chomatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta* **75**, 284-293.

Morais, E. C., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A. (2014) Prebiotic gluten-free bread: Sensory profiling and drivers of liking. *LWT-Food Sci.Technol*. **55** (1), 248-254.

Moroni, A. V., Dall Bello, F., Arendt, E. K. (2009) Sourdough in gluten-free bread-making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiol.* **26**, 676-684.

Pawliszyn, J. (2012) Handbook of Solid Phase Microextraction, Elsevier Inc., London / Waltham, str. 7-15.

Peters, F. T., Drummer, O. H., Musshoff, F. (2007) Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **165** (2), 216-224.

Poinot, P., Arvisenet, G,. Grua-Priol, J., Fillonneau, C., Mezaize, S., De Lamballerie, M., Le-Bail, A., Prost, C. (2009) Advances in the Understanding of the Chemical Reactions Responsible for Bread Flavour Quality. *Czech J. Food Sci.* **27**, 54-57.

Pozo-Bayón, M. A., Guichard, E., Cayot, N. (2006) Flavor control in baked cereal products. *Food Rev. Int.* **22**, 335-379.

Raffo, A., Carcea, M., Castagna, C., Magri, A. (2015) Improvement of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry method for the analysis of wheat bread volatile compounds. *J. Chromatogr A.* **1406**, 266-278.

Rouessac, F., Rouessac, A. (2007) Chemical analysis, 2. izd., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, str. 31-63.

Ruiz, J. A., Quílez, J., Mestres, M., Guasch, J. (2003) Solid-phase microextraction method for headspace analysis of volatile compounds in bread crumb. *Cereal Chem.* **80** (3), 255-259.

Rychlik, M., Grosch, W. (1996) Identification and quantification of potent odorants formed by toasting of wheat bread. *Lebensm. Wiss. Technol.* **29**, 515-525.

Schieberle, P. (1995). New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. U: Characterization of food: Emerging methods (Gaonkar, A. G., ured.), Elsevier, Amsterdam/ Laussane/ New York/ Oxford/ Shannon/ Tokyo, str. 403-431.

Schieberle, P., Grosch, W. (1992) Changes in the concentrations of potent crust odourants during storage of white bread. *Flavour Frag. J.* **7** (4), 213-218.

Schieberle, P., Grosch, W. (1994) Potent odorants of rye bread crust – Differences from the crumb and from wheat bread crust. *Z. Lebensm. Unters. For.* **198**, 292-296.

Schober, T. J., Bean, S. R., Boyle, D. L., Park, S. H. (2008) Improved viscoelastic zein–starch doughs for leavened gluten-free breads: Their rheology and microstructure. *J. Cereal Sci.* **48** (3), 755-767.

Seitz, L. M., Chung, O. K., Rengarajan, R. (1998) Volatiles in Selected Commercial Breads 1. *Cereal Chem.* **75** (6), 847-853.

Soria, A. C., Sanz, J., Martínez-Castro, I. (2009) SPME followed by GC–MS: a powerful technique for qualitative analysis of honey volatiles. *Eur. Food Res. Tech.* **228** (4), 579-590.

Swartz, M. E., Krull, I. S. (1997) Analytical Method Development and Validation, Marcel Dekker Inc., New York.

Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 835-855.

Thompson, T. (2000) Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **100** (11), 1389-1396.

Weckerle, B., Bastl-Borrmann, R., Richling, E., H*ö*r, K., Ruff, C., Schreier, P. (2001) Cactus pear (Opuntia ficus indica) flavour constituents— chiral evaluation (MDGC–MS) and isotope ratio (HRGC–IRMS) analysis. *Flavour Fragr. J.* **16**, 360-363.

Wittkowski, R., Matissek, R. (1993) Capillary gas chromatography in food control and research, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, str. 19-49.

Yazynina, E., Johansson, M., Jägerstad, M., Jastrebova, J. (2008) Low folate content in gluten-free cereal products and their main ingredients. *Food Chem.* **111** (1), 236-242.

Zehentbauer, G., Grosch, W. (1998) Crust aroma of baguettes. Key odorants of baguettes prepared in two different ways. *J. Cereal Sci.* **28**, 81-92.