Ispitivanje preciznosti i primjena nove HSS-GC-FID metode za određivanje lakohlapljivih spojeva u maslinovom ulju

Gospić, Ana Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:346362

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Ana Marija Gospić

Ispitivanje preciznosti i primjena nove HSS-GC-FID metode za određivanje lakohlapljivih spojeva u maslinovom ulju

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, dr. sc. Mirandi Sertić, na posvećenom vremenu, znanju kao i stručnim savjetima kojima mi je pomogla u uspješnoj izradi ovog diplomskog rada. Želim se zahvaliti i prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na pruženoj pomoći i savjetima prilikom provođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Jedno veliko hvala mojoj obitelji te prijeteljima koji su mi uvijek bili potpora u svemu što radim.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. MASLINOVO ULJE 2
1.1.1. Učinci maslinovog ulja na zdravlje 2
1.1.2. Fizikalna svojstva maslinovog ulja 2
1.1.3. Klasifikacija senzornih defekata maslinovog ulja 3
1.1.4. Procesi kvarenja u maslinovom ulju 3
1.2. PLINSKA KROMATOGRAFIJA 7
1.2.1. Instrument za plinsku kromatografiju 7
1.3. HEADSPACE UZORKOVANJE 10
1.3.1. Osjetljivost *headspace* metode 11
1.3.2. Tipovi *headspace* tehnike uzorkovanja 12
1.4. PREGLED OBJAVLJENIH RADOVA U ANALIZI MASLINOVA ULJA 13
1.4.1. Kromatografske metode 13
1.4.2. Spektroskopske metode 14
2. OBRAZLOŽENJE TEME 15
3. MATERIJALI I METODE 18
3.1. MATERIJALI 19
3.1.1. Kemikalije 19
3.1.2. Radni instrumenti 19
3.1.3. Pribor 19
3.1.4. Programski paketi 20
3.2. METODE 21
3.2.1. Priprema standardnih otopina 21
3.2.2. Ispitivanje preciznosti 21
3.2.3. Analiza uzorka 21

3.2.4. Plinskokromatografska metoda 22
4. REZULTATI I RASPRAVA 23
4.1. VALIDACIJA METODE 24
4.1.1. Ispitivanje preciznosti 24
4.2. ANALIZA UZORKA 27
5. ZAKLJUČAK 31
7. SAŽETAK 36
7. SUMMERY 38
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD 40

1. UVOD

1.1. MASLINOVO ULJE

1.1.1. Učinci maslinovog ulja na zdravlje

Maslinovo ulje se jako puno koristi u tzv. mediteranskoj prehrani. Provedena su mnoga istraživanja koja su pokazala da neke nehlapljive sastavnice maslinova ulja na indirektan način ispoljavaju pozitivne učinke na zdravlje (Angerosa i sur., 2004). Primjerice, pokazano je da maslinovo ulje ima pozitivan utjecaj na rast i razvoj djece te se preporučuje kao dodatak prehrani djece. Nadalje, poznat je i zaštitni učinak maslinovog ulja na usporavanje cerebralnog starenja. Općenito se smatra kako redovito konzumiranje maslinovog ulja produžuje životni vijek čovjeka. Također, konzumacija maslinovog ulja povezuje se sa smanjenjem pojavnosti kardiovaskularnih bolesti te sa snižavanjem krvnog tlaka (Storniolo i sur. 2014). Povoljno djelovanje maslinovog ulja uočeno je i kod problema s osteoporozom jer ono djeluje na ponovnu mineralizaciju kostiju te potiče apsorpciju kalcija. Primijećeno je da ono poboljšava probavljivost i apsorpciju hranjivih tvari, sprječava upale jednjaka i pojavu žgaravice, sprječava upale želučane sluznice te čira želuca i dvanaesnika, a ima i blagi laksativni učinak. Zaštitna uloga maslinovog ulja zapažena je kod nastajanja pojedinih tumora, posebice tumora dojke, prostate, debelog crijeva i maternice. Ovo ulje djeluje zaštitno i tonificira epidermu te se preporučuje posebno za prevenciju kožnih oštećenja i smanjenje znakova starenja kože (Žanetić i Gugić, 2006).

1.1.2. Fizikalna svojstva maslinovog ulja

Visokokvalitetna maslinova ulja imaju miris zelenih i voćnih karakteristika (Morales i sur., 2005). Fizikalna svojstva ulja povezana su s djelovanjem i hlapljivih i nehlapljivih sastavnica na osjetilne receptore (Angerosa i sur., 2004). Hlapljive komponente su tvari niske molekulske mase (manje od 300 Da) koje isparavaju na sobnoj temperaturi. Neke hlapljive tvari dopiru do olfaktornog epitela, dolazi do otapanja u mukozi te se mogu vezati na olfaktorne receptore što rezultira osjetom mirisa (Kalua i sur., 2007).

Hlapljive sastavnice čine uglavnom aldehidi, esteri, alkoholi i ketoni (Morales i sur., 2005). Te tvari se ne proizvode u značajnoj količini tijekom rasta ploda, već tijekom razdoblja zrenja (Kalua i sur., 2007). Neke od tih komponenti nastaju u biosintetskom putu lipooksigenaze (LOX) (Morales i sur., 2005). Hlapljive sastavnice nastaju i iz aminokiselina. Primjerice valin i leucin se mogu prevesti u hlapljive spojeve (Kalua i sur., 2007).

Na sastav hlapljive frakcije ulja utječu razni čimbenici, a mogu se podijeliti na agronomske i tehnološke (Angerosa i sur., 2004).

U agronomske i klimatske aspekte ubrajaju se:zdravlje plodova, sorta masline, zrelost ploda masline, klimatski uvjeti, geografsko područje uzgoja.

S druge strane, u tehnološke aspekte ubrajaju se: način branja plodova, skladištenje plodova nakon branja, pranje plodova, prešanje, malaksacija, sustav odvajanja ulja od pulpe, skladištenje ulja.

1.1.3. Klasifikacija senzornih defekata maslinovog ulja

Proizvodnja djevičanskog maslinovog ulja visoke kvalitete podrazumijeva čitav niz korak, od primjene odgovarajućih agrotehničkih mjera u masliniku (gnojidba, rezidba, navodnjavanje, zaštita od bolesti i nametnika), preko pravilne berbe ploda i postupanja s njim do trenutka prerade u uljari i na kraju, do načina čuvanja, tj. pravilnog skladištenja ulja (Žanetić i Gugić, 2005).

Zanimljivo je da se u većini slučajeva, parametri kvalitete promijene dok ulje dođe do potrošača (Kalua i sur., 2007). Kad senzorni defekti ulja dosegnu visoki intenzitet, takva ulja se moraju rafinirati prije konzumacije (Morales i sur., 2005).

Službene regulative za maslinova ulja svrstavaju najčešće promjene arome u četiri skupine: pljesnivost (takva nota je karakteristična za ulja dobivena iz plodova u uznapredovalom stadiju fermentacije), vlažnost (ova nota je specifična za ulja dobivena iz plodova koji su čuvani u vlažnim uvjetima nekoliko dana zbog čega je došlo do razvoja raznih vrsta gljivica), kiselost (ovakva nota se razvija zbog prisutnosti velike količine octene kiseline, etil-acetata i etanola) te upaljenost (ova nota je zajednička svim uljima i mastima koja su autooksidirala zbog produženog kontakta sa zrakom). Prva tri defekta nastaju zbog neprikladnog skladištenja plodova prije prerade u ulje. S druge strane, posljednji defekt nastaje tijekom skladištenja samog ulja (Morales i sur., 2005).

1.1.4. Procesi kvarenja u maslinovom ulju

Za vrijeme skladištenja u maslinovom ulju moguće su razne promjene koje predstavljaju stalne i nepovratne procese koji utječu na konačnu kvalitetu ulja. Vrsta i stupanj tih promjena ovisi o uvjetima čuvanja ulja. Spomenute promjene mogu se podijeliti na dvije velike skupine, hidrolitičke promjene (lipoliza) te proces oksidacije. Hidrolitičke promjene započinju već u samom plodu masline, dok proces oksidacije nastupa nakon prerade i najviše za vrijeme skladištenja. Pored oksidacije, moguća je pojava fermentacije malih dijelova nečistoća koje

nisu odstranjene filtracijom. Te nečistoće sadrže šećere koji pospješuju fermentaciju (Žanetić i Gugić, 2005).

Hidrolitičke promjene

Hidrolizom triglicerida (lipolizom) nastaju alkohol glicerol i određena masna kiselina. Stoga, ove promjene kao posljedicu imaju povećanje ukupnih masnih kiselina te promjenu okusa uzrokovanu određenim slobodnim masnim kiselinama. Glavni utjecaj na proces hidrolize imaju: vlaga, temperatura, prisutnost enzima i mikroorganizama (Žanetić i Gugić, 2005).

Razlikuje se mikrobna i enzimatska lipoliza. Mikrobnu lipolizu uzrokuju mikroorganizmi u maslini koji oslobađaju enzim lipazu. Nepravilnim skladištenjem plodova između berbe i prerade razvijaju se mikroorganizmi koji tada uzrokuju hidrolizu glicerida maslinovog ulja. Enzimska je lipoliza posljedica enzimatske aktivnosti pripadnih enzima (lipaza) u plodu masline. Endogena lipaza ne pokazuje svoju aktivnost sve dok plod ne postane obojen tamno ljubičasto. Nagnječeni plodovi ili oni oštećeni ubodom insekata pokazuju veću lipolitičku aktivnost od zdravih, čvrstih plodova. Prisutnost vode olakšava lipolitičke promjene jer voda otapa enzime i pospješuje mikrobni rast, što dovodi do nepoželjnih promjena u senzorskim karakteristikama maslinovog ulja.

Oksidacija

Oksidacija maslinovog ulja nastupa kad je ulje u kontaktu s kisikom. I druge tvari utječu na oksidaciju, a to su primjerice temperatura (povišena temperatura ubrzava oksidaciju), svjetlost, ionizacijsko zračenje i prisutnost metala (bakar, željezo). Proizvodi oksidacije ulja imaju neugodan miris i okus te značajno utječu na smanjenje prehrambene vrijednosti ulja. Esencijalne masne kiseline sadržane u maslinovom ulju, linolna i linolenska, raspadaju se i dolazi do otapanja liposolubilnih vitamina.

U maslinovom ulju postoje i tvari koje usporavaju ili onemogućuju oksidaciju (antioksidansi). To su razni fenolni spojevi (polifenoli, npr. oleuropein), tokoferoli (vitamin E), steroli. Dakle, upravo zato što sadrži prirodne antioksidanse te zbog niskog sadržaja višestruko nezasićenih masnih kiselina, maslinovo je ulje otporno na oksidaciju (autooksidaciju). Međutim, vrlo je osjetljivo na fotooksidaciju (oksidacija pod utjecajem svjetlosti). Za vrijeme fotooksidacije dolazi i do raspadanja klorofila koji predstavlja zeleni pigment i daje maslinovom ulju karakterističnu boju. U tami ovi pigmenti djeluju kao antioksidansi, dok u prisutnosti svjetla pospješuju oksidaciju ulja (Žanetić i Gugić, 2005).

1.1.5. Procjena kvalitete maslinovog ulja

Hlapljive tvari jedan su od ključnih parametara u procjeni kvalitete ulja (Kalua i sur., 2007). Raspon tvari koje se mogu naći u hlapljivoj frakciji ulja je vrlo šarolik. Uglavnom su to karbonilne komponente, alkoholi, esteri i ugljikovodici. Najvažniju komponentu hlapljive frakcije djevičanskog ulja visoke kvalitete predstavljaju C_6 i C_5 komponente. Posebice C_6 linearni nezasićeni i zasićeni aldehidi. S druge strane, u hlapljivoj frakciji ulja zahvaćenog organoleptičkim defektom zastupljeni su većinom C7-C11 mononezasićeni aldehidi, ili C6-C10 dienali, ili C5 razgranati aldehidirani alkoholi, ili C8 ketoni (Angerosa i sur., 2004).

Važno je naglasiti kako ne postoji univerzalna definicija kvalitete maslinova ulja koja uzima u obzir sve parametre koji mogu rezultirati narušenom kvalitetom ulja (Kalua i sur., 2007). Nepravilnim čuvanjem i skladištenjem maslinova ulja dolazi do nepovratnog gubitka kvalitete proizvoda. Moguće negativne osobine koje ulje ima ili koje dobije za vrijeme skladištenja nemoguće je eliminirati niti ispraviti miješanjem ili rafinacijom. Pravilno skladištenje, dakle, produžuje rok trajanja maslinovog ulja (Žanetić i Gugić, 2005).

Europska komisija donijela je 1991. godine Uredbu br. 2568/91 (eur-lex.europa.eu) s ciljem međusobnog razlikovanja različitih vrsta ulja. Definirana je podjela u 9 kategorija s obzirom na karakteristike maslinovog ulja (tablica 1).

KARAKTERISTIKE MASLINOVOG ULJA

Vrsta	Kiselost %	Peroksidni broj meq/O_2/kg	Halogenirana otapala mg/kg ([1])	Alifatski alkoholi mg/kg	Zasićene masne kiseline u položaju 2 na trigliceridima %	Eritrodiol + uvaol %	Trilinolein %	Kolesterol %	Brasikasterol %	Kampesterol %	Stigmasterol%	Beta-sitosterol % ([2])	Delta-7-stigmasterol %	Ukupno sterola mg/kg
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	M 1,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
2. Djevičansko maslinovo ulje	M 2,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
3. Obično djevičansko maslinovo ulje	M 3,3	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
4. Djevičansko maslinovo ulje lampante	> 3,3	> 20	> 0,20	M 400	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	-	m 93,0	M 0,5	m 1000
5. Rafinirano maslinovo ulje	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
6. Maslinovo ulje	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
7. Sirovo ulje komine masline	m 2,0	-	-	-	M 1,8	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	-	m 93,0	M 0,5	m 2500
8. Rafinirano ulje komine masline	M 0,5	M 10	M 0,20	-	M 2,0	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1800
9. Ulje komine masline	M 1,5	M 15	M 0,20	-	M 2,0	> 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1800

M = maksimum, m = minimum

(1) Ukupna gornja granica za sastojke otkrivene detektorom zahvata elektrona. Gornja granica za pojedinačno otkrivene sastojke iznosi 0,10 mg/kg.
(2) Delta-5,23-stigmastadiernol + kolesterol + sitosterol + sitostanol + delta-5-avenosterol + delta-5,24-stigmastadienol.
Bilješka:

Ako je ijedna karakteristika nekog ulja izvan određenih granica, to se ulje ne smije prihvatiti

Tablica 1.: *Klasifikacija maslinovog ulja (*eur-lex.europa.eu*)*

U Uredbi se navodi kako fizikalna i kemijska svojstva svakog od njih kao i organoleptičke karakteristike djevičanskih ulja trebaju biti definirane kako bi se osigurala čistoća i kvaliteta određenog proizvoda. Karakteristike različitih vrsta ulja treba odrediti ujednačeno u cijeloj Zajednici, u tu svrhu treba ustanoviti jedinstvene metode kemijske analize i organoleptičkog ocjenjivanja.

1.2. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je separacijska tehnika u kojoj se hlapljive sastavnice uzorka raspodjeljuju između mobilne plinovite faze te tekuće ili čvrste stacionarne faze u koloni. Eluaciju sastavnica omogućava tok inertne plinovite mobilne faze. Za razliku od ostalih kromatografskih tehnika, ovdje mobilna faza ne ulazi u interakciju s molekulama analita (Skoog i sur., 2014).

Ova kromatografska tehnika, s obzirom na stacionarnu fazu, može se podijeliti na dva osnovna tipa:

- Plinsko-tekućinska kromatografija (GLC)
  Stacionarna faza je tekućina imobilizirana, adsorpcijom ili kemijskim vezama, na površini inertne čvrste faze ili na stijenkama kapilarne kolone.
- Plinsko-čvrsta kromatografija (GSC)
  Stacionarna faza je u čvrstom stanju te se zadržavanje analita događa isključivo zbog fizičke adsorpcije analita na čvrstu fazu.

1.2.1. Instrument za plinsku kromatografiju

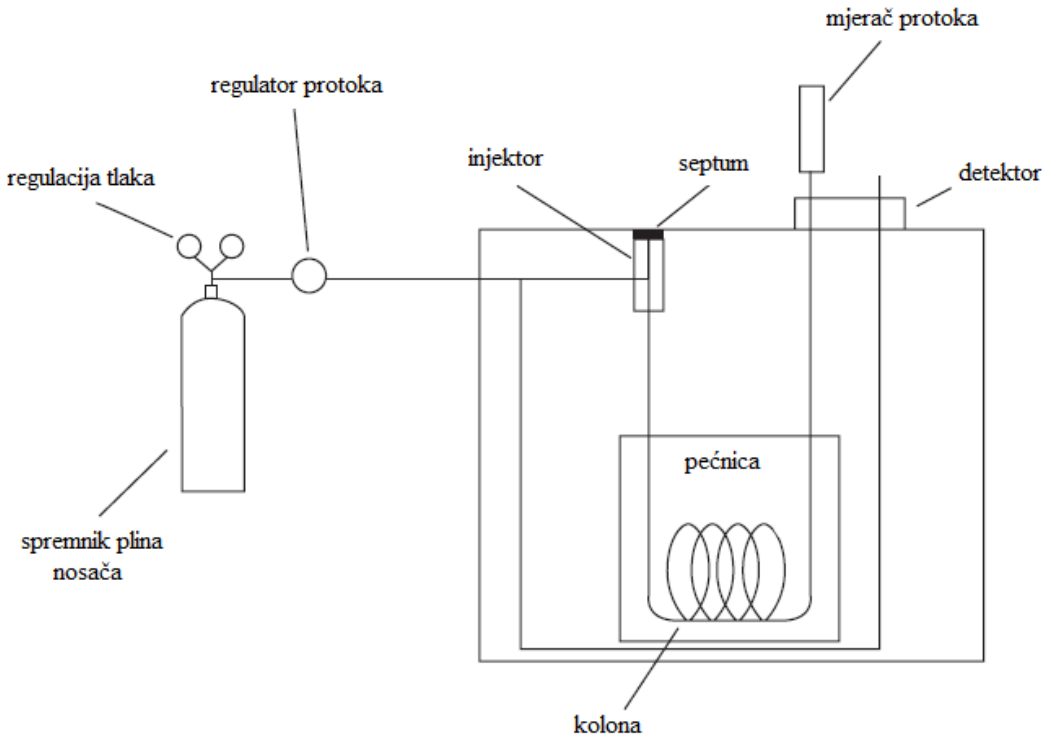
Prethodno opisana kromatografska tehnika provodi se na uređaju koji se zove plinski kromatograf. On se sastoji od sustava za dovod plina nositelja, sustava za injektiranje uzorka, kolone i termostatirane pećnice te detektora. Na slici 1. shematski je prikaz plinskog kromatografa.

Sustav za dovod plina nositelja

Plin nositelj predstavlja mobilnu fazu te je potrebno da bude kemijski inertan. Kao plin nositelj najčešće se koristi helij te, u manjoj mjeri, argon, dušik ili vodik.

Sustav za nanošenje uzorka

Kako bi se postigla visoka učinkovitost razdvajanja, nužna je prikladna količina uzorka. Prevelika količina uzorka te njegovo sporo nanošenje uzrokuju širenje pikova te loše razlučivanje. Kako bi se to izbjeglo razvijeni su razdjelnici (engl. *splitter*) koji omogućuju da se na kolonu nanese samo manji dio uzorka dok se ostatak otpuše (Skoog i sur., 2014).



Slika 1.: *Shematski prikaz plinskog kromatografa (Harvey, 1999)*

Kolone

Kromatografske kolone mogu biti izrađene od nehrđajućeg čelika, stakla, silikagela ili Teflona te duge manje od 2 metra do 60 metara ili više. Postoje dvije vrste kolona, punjene i kapilarne kolone (Skoog i sur., 2014). Punjene kolone su gusto i jednolično punjen finim materijalom za punjenje koji je prevučen tankim slojem (0,05 do 1 μm) tekuće stacionarne faze. Kapilarne kolone imaju dvije inačice. Prvi tip čini kapilara čija je unutrašnja stijenka obložena tankim slojem tekuće stacionarne faze. Drugi tip se od prvog razlikuje po tome što je kapilara obložena tankim slojem čvrstog materijala na koji je potom adsorbirana tekuća stacionarna faza.

Pećnica

Jako bitan faktor za uspješnu analizu je temperatura kolone. Iz tog razloga, kolone su smještene unutar termostatirane pećnice. Temperatura kolone može biti konstantna tokom cijele analize ili se može mijenjati, stupnjevito ili konstantno. Za analizu spojeva širokog raspona vrelišta primjenjuju se temperaturni programi u kojima se temperatura kolone postepeno povisuje (Skoog i sur., 2014).

Detektori

U literaturi je opisana je primjena desetak različitih detektora u plinskoj kromatografiji. Izbor detektora ponajviše ovisi o vrsti analita koji se analizira. Najčešće se koriste:

- Plameno ionizacijski detektor (engl. *flame ionisation detector*, FID) Većina organskih molekula proizvodi ione i elektrone kada su polarizirane na temperaturi plamena. Spojevi se, nakon razdvajanja na koloni, detektiraju mjerenjem struje proizvedene skupljanjem iona i elektrona.
- Detektor toplinske vodljivosti (engl. *thermal conductivity detector*, TCD) Toplinska vodljivost plina nositelja je 6-10 puta veća od toplinske vodljivosti organskih molekula. Stoga prisutnost organskih molekula dovodi do velikog pada u toplinskoj vodljivosti.
- Maseno-spektroskopski detektor (engl. *mass spectrometer*, MS) Ovaj detektor predstavlja jedan od najmoćnijih detektora za plinsku kromatografiju. On mjeri omjer mase i naboja iona (Skoog i sur., 2014).

1.3. HEADSPACE UZORKOVANJE

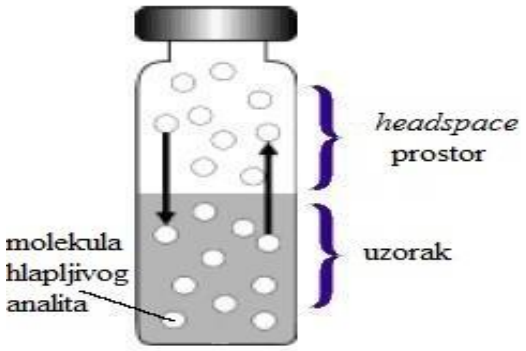
Nakon što je plinska kromatografija uvedena u analitiku, uzorkovanje i priprema uzorka su odmah prepoznati kao ključne točke u uspješnoj analizi (Snow, 2002). Naime, uzorci su kompleksne smjese različitih tvari koje nisu sve prikladne za analizu plinskom kromatografijom. Mnoge od njih, ako bi se našle na koloni plinskog kromatografa, bi kontaminirale kolonu ili čak reagirale sa stacionarnom fazom kolone. Na taj način bi kolonu učinile neupotrebljivom te se analiza ne bi mogla provesti. Iz tog razloga, cilj predobradbe uzorka *headspace* tehnikom je ukloniti sve tvari koje nisu hlapljive i stoga su neprikladne za analizu plinskom kromatografijom. Analiza postaje mnogo lakša, brža i čišća (www.perkinelmer.com).

Analitička kemija jedno je od područja znanosti koje se jako brzo razvija i napreduje. Paralelno s razvojem analitike, razvijala se i *headspace* tehnika. Navedena tehnika definira se kao ekstrakcija plinovite faze, a uključuje raspodjelu analita između nehlapljive tekuće ili čvrste faze te plinovite faze iznad tekućine ili krutine (Snow, 2002). To je, dakle, separacijska tehnika kojom se lakohlapljive sastavnice mogu izdvojiti iz složenog matriksa. Nakon toga se spomenute sastavnice injektiraju u plinski kromatograf gdje se vrši analiza (www.perkinelmer.com).

Hlapljivi analit prisutan u uzorku prelazit će u plinovitu fazu iznad uzorka sve dok se njegove koncentracije u uzorku (C_s) te u plinovitoj fazi iznad uzorka (C_g) ne izjednače (slika 2.). Tada je postignuto stanje ravnoteže, a konstanta koja ga opisuje naziva se koeficijent razdiobe (K) (Kolb, 2000).

$$K = \frac{C_s}{C_g}$$

Analiti čiji je koeficijent razdiobe manji od 1, imaju veći afinitet prema plinovitoj fazi te lakše prelaze u nju.



Slika 2.: *Shematski prikaz headspace uzorkovanja (Mornar i sur., 2013)*

Cilj kvantitativne analize je utvrditi koncentraciju analita u uzorku (C_0). Površina pika na kromatogramu (A) proporcionalna je koncentraciji analita u plinovitoj fazi te ovisi o omjeru faza (β) koji opisuje odnos volumena plinovite faze (V_g) naspram volumena uzorka (V_s).

$$\beta = \frac{V_g}{V_s}$$

1.3.1. Osjetljivost *headspace* metode

Temperatura i volumen uzorka

Temperatura i volumen uzorka predstavljaju dva najznačajnija faktora koja je moguće promijeniti kako bi se povećala osjetljivost metode. Utjecaj volumena uzorka opisuje omjer faza, dok je utjecaj temperature sadržan u koeficijentu razdiobe.

$$C_g = \frac{C_0}{K + \beta}$$

Povećanjem volumena uzorka ili povišenjem temperature, moguće je povećati osjetljivost metode (Kolb, 2000).

Modifikacija matriksa

Modifikacijom matriksa moguće je utjecati na koeficijent razdiobe. Primjerice, isoljavanjem, dodatkom soli u otopinu uzorka, povećava se afinitet analita za plinovitu fazu (Kolb, 2000).

Modifikacija analita

Esterifikacijom, transesterifikacijom ili acetilacijom analit se može prevesti u produkt koji će biti manje polaran te hlapljiviji. Time se pomiče konstanta ravnoteže prema plinovitoj fazi (Kolb, 2000).

1.3.2. Tipovi *headspace* tehnike uzorkovanja

Dva su osnovna tipa *headspace* tehnike, statičko i dinamičko *headspace* uzorkovanje. Međutim, važno je spomenuti i nešto noviju izvedenicu dinamičkog *headspace* uzorkovanja naziva mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. S*olid Phase MicroExtraction*, SPME), budući da se ona danas često koristi.

Statičko *headspace* uzorkovanje

Statičko uzorkovanje najjednostavnija je inačica ove tehnike. Uzorak se stavlja u staklenu vialu te se termostatira. Kad se dosegne stanje ravnoteže, dio plinovite faze iznad uzorka se brzo prenese na kolonu plinskog kromatografa. Metoda ima široku primjenu. Koristi se za analizu ostatnih otapala u lijekovima te sve više u kliničkim, forenzičkim, biološkim analizama i analizama hrane. (Snow, 2002; Kolb, 2000)

Dinamičko *headspace* uzorkovanje

S druge strane, dinamičko uzorkovanje karakterizira plin nositelj koji prolazi kroz tekući uzorak te potom kroz apsorbens na kojeg će se hlapljivi analiti apsorbirati. Nakon što su se analiti ukoncentrirali na apsorbensu, moraju se s njega desorbirati povišenjem temperature kako bi se prenijeli na plinski kromatograf. Ovo je metoda izbora za analizu tvari koje su prisutne u uzorku u jako niskim koncentracijama budući da se analiti ukoncentriravaju na apsorbensu. (Snow, 2002) Hlapljive sastavnice uklanjaju se iz uzorka u potpunosti kontinuiranim tokom inertnog plina.

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase MicroExtraction,* SPME)

Nešto novija inačica headspace tehnike je SPME (engl. *Solid-Phase MicroExtraction*). Za nju je karakteristično vlakno silikagela prekriveno apsorbensom na kojem se hvataju i ukoncentriravaju analiti. Također ima široku primjenu u analizi lijekova, okoliša, hrane, prirodnih proizvoda (Snow, 2002).

1.4. PREGLED OBJAVLJENIH RADOVA U ANALIZI MASLINOVA ULJA

Ovisno o kvaliteti plodova i načinu njihove prerade, dobiveno ulje ima različite kemijske i senzoričke karakteristike te se može razvrstati u razrede različite kvalitete. Jedan od najvažnijih parametara za klasifikaciju ulja je upravo senzorička analiza (Jiménez i sur., 2004). Stoga ne čudi da je objavljen velik broj radova u čijem fokusu je bilo određivanje senzoričkih značajki maslinovog ulja.

1.4.1. Kromatografske metode

Pregledom literature pronađeno je nekoliko radova o *headspace* mikroekstrakciji na čvrstoj fazi kao metodi predobrade uzorka pri analizi hlapljivih tvari u ulju plinskom kromatografijom (Vichi i sur., 2003; Baccouri i sur., 2007; Jiménez i sur., 2004; Brkić Bubola i sur., 2012).

Vichi i suradnici (2003.) napisali su da navedena metoda omogućuje, ne samo kvalitativni, već i kvantitativni pristup analizi hlapljive frakcije ulja.

Godinu dana nakon Vichi, Jiménez i suradnici (2004.) zaključili su da se spomenutom metodom može saznati nešto više i o negativnim senzoričkim promjenama ulja.

U dva rada, Baccouri i suradnici (2007.) te Brkić Bubola i suradnici (2012.), opisana je primjena *headspace* mikroekstrakcije na čvrstoj fazi s ciljem razlikovanja ulja koja su uzgajana na različitim geografskim područjima.

Vichi i suradnici objavili su, nekoliko godina kasnije, još jedan rad (Vichi i sur., 2007) u kojem su uspoređivali različite ekstrakcijske tehnike za analizu arome maslinovog ulja. Usporedili su *headspace* mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME), simultanu destilaciju/ekstrakciju (engl. simultaneous destillation/extraction, SDE) i *closed-loop stripping* analizu (CLSA). Razdvajanje analita odvijalo se na plinskom kromatografu, uz korištenje masenog detektora (MS). Cilj rada bio je odrediti koja će od prethodno spomenute tri metode dati ekstrakt sa što većim brojem hlapljivih i poluhlapljivih sastavnica ulja. Nakon obrade rezultata uočili su značajne razlike u postotku ekstrakcije određenih skupina hlapljivih tvari ovisno o upotrijebljenoj tehnici. Primjerice, SPME metoda pokazala se najučinkovitijom pri ekstrakciji alkohola i ketona. SDE metodom ekstrahiran je najveći postotak aldehida te terpenoida, dok su CLSA ekstrakti bili najbogatiji ugljikovodicima i esterima. Došli su, stoga, do zaključka da se profil ekstrahiranih komponenti razlikuje ovisno o upotrijebljenoj tehnici te da izbor ekstrakcijske tehnike ovisi o tome koje hlapljive tvari želite odrediti.

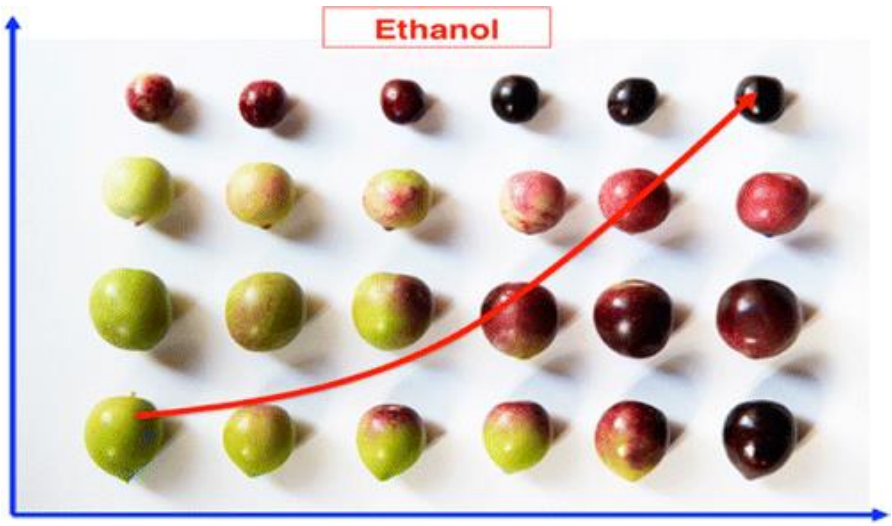
1.4.2. Spektroskopske metode

Nadalje, osim plinsko-kromatografskih tehnika za analizu ulja, opisana je primjena i atomsko apsorpcijske spektroskopije u procjeni kvalitete ulja. U radu (Nunes i sur., 2011) opisna je detekcija nekoliko metala, bakra, željeza, nikla i cinka, u biljnim uljima, pa tako i u maslinovom ulju. Naime, sadržaj metala u ulju predstavlja, također, jedan od kriterija za svrstavanje ulja u razrede različite kvalitete s obzirom na svježinu, skladištenje te njihov utjecaj na ljudsku prehranu i zdravlje. Metali imaju i snažan utjecaj na okus i oksidativnu stabilnost ulja budući da neki od njih kataliziraju oksidaciju masnih kiselina ulja. Na taj način smanjuju rok trajanja kao i hranjivu vrijednost ulja.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Hlapljive tvari jedan su od ključnih parametara u procjeni kvalitete ulja (Kalua i sur., 2007). Raspon tvari koje se mogu naći u hlapljivoj frakciji ulja je vrlo šarolik. Uglavnom su to karbonilne komponente, alkoholi, esteri i ugljikovodici. Najvažniju komponentu hlapljive frakcije djevičanskog ulja visoke kvalitete predstavljaju C_6 i C_5 komponente. Posebice C_6 linearni nezasićeni i zasićeni aldehidi. S druge strane, u hlapljivoj frakciji ulja zahvaćenog organoleptičkim defektom zastupljeni su većinom C7-C11 mononezasićeni aldehidi, ili C6-C10 dienali, ili C5 razgranati aldehidirani alkoholi, ili C8 ketoni (Angerosa i sur., 2004).

Kvaliteta maslinovog ulja može biti usko povezana s prisutnošću kratkolančanih alkohola u maslinovom ulju. Male količine etanola i metanola u ulju dozvoljene su s obzirom da se spomenuti alkoholi stvaraju u plodu tijekom njegova sazrijevanja (slika 3). S druge strane, visoke koncentracije etanola u ulju nastaju procesom fermentacije ponajviše za vrijeme skladištenja plodova (Gómez-Coca i sur., 2014).



Slika 3.: *Slikovni prikaz porasta koncentracije etanola u plodu s obzirom na sazrijevanje ploda (Beltrán i sur., 2015)*

Za određivanje sadržaja alifatskih alkohola na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu razvijena je nova metoda primjenom kapilarne plinske kromatografije.

Cilj ovog rada bio je, prema smjernicama *Međunarodne konferencije o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutika primijenjenih u ljudi* ispitati odabrane validacijske parametre HS-GC-FID metode, prethodno razvijene na Zavodu za analitiku i

kontrolu lijekova, za određivanje sadržaja pet lakohlapljivih alkohola prisutnih u maslinovom ulju. Specifični ciljevi ovog rada bili su ispitati preciznost nove analitičke metode, na razini ponovljivosti i srednje preciznosti. Cilj je također bio metodu primijeniti za analizu vlastitog maslinovog ulja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Aceton (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)

Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Etanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Etil-acetat (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)

2-propanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.2. Radni instrumenti

Uređaj za *headspace* uzorkovanje, model G1888 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Plinski kromatograf, model 6850 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Generator dušika, model NG250A (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Generator vodika, model CFH200 (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Generator zraka, model ZAO35A (PEAK Scientific, Renfrewshire, UK)

Sustav za pročišćavanje vode WaterPro (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

Analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo, Greifensee,Švicarska)

3.1.3. Pribor

Pipeta, model Pipet-Lite XLS (0,5-10µL) (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

Kolona za plinsku kromatografiju DB-624, dimenzija 30m x 0,53mm, debljina filma 3 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Bočice za uzorkovanje *headspace* tehnikom s aluminijskim čepom, 20 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Zatvarač bočica s aluminijskim čepom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

3.1.4. Programski paketi

GC ChemStation, Rev. A. 10 02 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine acetona, etanola, etil-acetata, 2-propanola te metanola pripremljene su razrjeđivanjem s ultračistom, deioniziranom vodom do koncentracije 0,1% (v/v).

Kao unutarnji standard korišten je acetonitril, također koncentracije 0,1% (v/v).

3.2.2. Ispitivanje preciznosti

Ispitivani uzorak se analizira bez prethodne obrade. Neposredno prije analize, na analitičkoj vagi, u bočicu za uzorkovanje *headspace* tehnikom, volumena 20 mL, izvaže se 3,00 g uzorka. U uzorak se doda 1µL acetonitrila (0,1 % v/v) i 1µL standardne otopine acetona, etanola, etil-acetata, i-propanola te metanola (0,1 % v/v). Bočica se potom zatvori aluminijskim čepom pomoću zatvarača bočica. Tako pripremljen uzorak se zagrijava u *headspace* pećnici 15 minuta pri 90˚C, a onda unosi u plinski kromatograf tijekom 1 minute pri temperaturi od 115˚C.

3.2.3. Analiza uzorka

Neposredno prije analize, na analitičkoj vagi, u četiri bočice za uzorkovanje *headspace* tehnikom, volumena 20 mL, izvaže se po 3,00 g uzorka.

U jednu bočicu s uzorkom se doda 1 µL acetonitrila (0,1 % v/v) i 0,5 µL 20 %-tne mješavine standardnih otopine acetona, etanola, etil-acetata, i-propanola te metanola.

U drugu bočicu s uzorkom se doda 1 µL acetonitrila (0,1 % v/v) i 1 µL 20 %-tne mješavine standardnih otopine acetona, etanola, etil-acetata, i-propanola te metanola.

U treću bočicu s uzorkom se doda 1 µL acetonitrila (0,1 % v/v) i 2 µL 20 %-tne mješavine standardnih otopine acetona, etanola, etil-acetata, i-propanola te metanola.

U četvrtu bočicu s uzorkom se doda samo 1 µL acetonitrila (0,1 % v/v).

Bočice se potom zatvore aluminijskim čepom pomoću zatvarača bočica. Tako pripremljen uzorak se zagrijava u *headspace* pećnici 15 minuta pri 90˚C, a onda unosi u plinski kromatograf tijekom 1 minute pri temperaturi od 115˚C.

3.2.4. Plinskokromatografska metoda

Korištena je metoda prethodno razvijena na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Plinska kromatografija je provedena na instrumentu Agilent 6850. Razdvajanje analita se odvijalo na koloni DB-624, dimenzija 30 m x 0,53 mm, debljina filma 3 μm. Kao plin nosač koristi se dušik za kromatografiju brzine protoka 5,0 mL/min. Temperatura injektora iznosi 230 ˚C, a za detekciju analita se koristi plameno-ionizacijski detektor s temperaturom detektora od 300 ˚C. Razdvajanje analita provodi se primjenom temperaturnog programa kako bi se postiglo optimalno razlučivanje analita u što kraćem vremenu analize. Korišten je gradijentni temperaturni program uz početnu temperaturu kolone 40 ˚C tijekom dvije minute. Nakon toga se temperatura povećava za 15 ˚C svake minute sve do konačnih 190 ˚C. Dobiveni kromatogrami obrađivani su računalnim programom ChemStation. Tako dobiveni rezultati su obrađeni te validacijski parametri određeni primjenom računalnog programa Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. VALIDACIJA METODE

Nakon što se razvije nova analitička metoda, potrebno je provesti validaciju te metode kako bi se dokazala njezina prikladnost za navedenu primjenu. U smjernicama *Međunarodne konferencije o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutika primijenjenih u ljudi* (engl. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Hunam Use, ICH*) (www.ich.org) definirani su najvažniji parametri koje je potrebno ispitati kako bi validacija metode bila uspješna. To su: točnost, preciznost (ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost), specifičnost, granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD), granica određivanja (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ), linearnost, radno područje te izdržljivost.

Nije nužno uvijek ispitati sve parametre. Ovisno o namjeni metode, dovoljno je ispitati samo neke od navedenih parametara. Primjerice, ako je analitička metoda namijenjena za identifikaciju određene tvari, dovoljno je ispitati samo specifičnost te metode. Međutim, ako je metoda namijenjena za određivanje sadržaja određene tvari, potrebno je ispitati, pored specifičnosti, i još neke parametre - točnost, preciznost (ponovljivost, srednju preciznost), linearnost i radno područje.

U ovom radu ispitana je preciznost analitičke metode.

4.1.1. Ispitivanje preciznosti

Preciznost analitičkog postupka pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Može se promatrati na tri razine: ponovljivost, srednja preciznost te obnovljivost (www.ich.org).

Prethodno razvijena HS-GC-FID analitička metoda za određivanje pet lakohlapljivih spojeva u maslinovom ulju ispitana je na dvije razine, kao ponovljivost i srednja preciznost. Uzorci koji su analizirani dobiveni su uzorkovanjem iz istog maslinovog ulja, a u svaki uzorak dodan je acetonitril (0,1 % v/v) kao standardni dodatak te standardna otopina acetona, etanola, etil-acetata, i-propanola i metanola (0,1 % v/v).

Za ispitivanje ponovljivosti tri puta unutar istog dana provedena je priprema uzorka, uzorkovanje i analiza, dok su za ispitivanje srednje preciznosti ti postupci ponavljani tri puta tokom tri dana.

U tablici 2. prikazane su vrijednosti rezultata izražene kao relativno standardno odstupanje (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD, %) izračunato na temelju vremena zadržavanja (engl. *Retention Time*, t_R) analita.

ANALIT	**PONOVLJIVOST RSD (%)**	**SREDNJA PRECIZNOST RSD (%)**
Metanol	0,19	1,05
Etanol	0,16	0,89
Aceton	0,15	0,82
i-propanol	0,13	0,78
Acetonitril	0,14	0,77
etil-acetat	0,1	0,55

Tablica 2.: *RSD vrijednosti za ponovljivost i srednju preciznost*

Najveću preciznost za kvantitativnu analizu plinskom kromatografijom moguće je postići upotrebom unutarnjeg standarda. Na taj način eliminiraju se nesigurnosti uzrokovane nanošenjem uzorka, promjenom u brzini toka te su minimalizirane varijacije u uvjetima kolone. Kako bi se ova metoda mogla primijeniti potrebno je za unutarnji standard odabrati spoj čiji će pik na kromatogramu biti jasno odvojen od pikova ostalih spojeva prisutnih u uzorku. Međutim, pik unutarnjeg standarda trebao bi se pojaviti blizu pika analita. Spoj koji se odabere kao unutarnji standard ne bi trebao biti prisutan u uzorku koji se analizira (Skoog i sur., 2014.).

S obzirom da je korišten acetonitril kao unutarnji standard, izračunata je RSD vrijednosti za ponovljivost i srednju preciznost nakon korekcije vremena zadržavanja analita s vremenom zadržavanja unutarnjeg standarda. Korigirane RSD vrijednosti prikazane su u tablici 3.

ANALIT	PONOVLJIVOST RSD (%)	SREDNJA PRECIZNOST RSD (%)
metanol	0,05	0,28
etanol	0,03	0,12
aceton	0,02	0,05
i-propanol	0,01	0,02
acetonitril	0	0
etil-acetat	0,04	0,22

Tablica 3.: *Korigirane RSD vrijednosti za ponovljivost i srednju preciznost*

Iz gore prikazanih rezultata vidljivo je da je RSD vrijednost vrlo niska. Na temelju toga možemo zaključiti da je metoda precizna. Nadalje, može se uočiti da je RSD vrijednost nakon korekcije manja iz čega proizlazi zaključak da se korekcijom vremena zadržavanja analita s vremenom zadržavanja unutarnjeg standarda povećava preciznost metode.

4.2. ANALIZA UZORKA

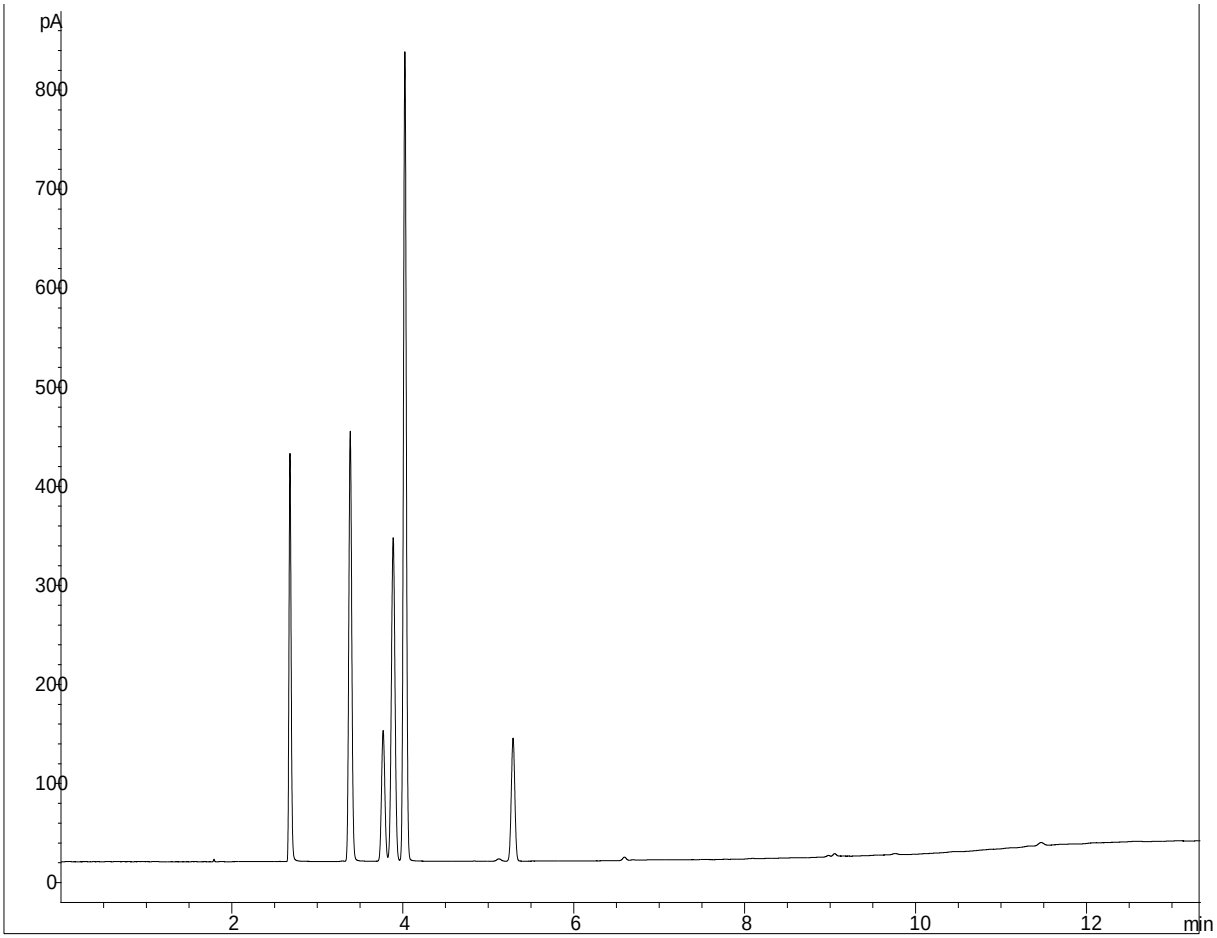
U ovom radu analizirano je maslinovo ulje koje proizvodi moj otac na našem obiteljskom gospodarstvu. Analiza sastava lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja provedena je plinskom kromatografijom. Budući da maslinovo ulje sadrži jako puno spojeva koji nisu svi prikladni za analizu plinskom kromatografijom, bilo je potrebno odvojiti lakohlapljive sastavnice od matriksa. Stoga je za uzorkovanje odabrana *headspace* metoda. Za razvoj metode bilo je potrebno optimizirati uvjete i kromatografske metode i *headspace* metode uzorkovanja. S ciljem postizanja optimalnog razlučivanja analita ispitan je utjecaj temperature i vremena zagrijavanja na ekstrakciju pojedinih tvari.

Cilj analize bio je odrediti sadržaj lakohlapljivih supstancija u ulju. S obzirom na činjenicu da svako maslinovo ulje već sadrži određenu količinu supstancija koje smo željeli kvantificirati, korištena je metoda standardnog dodatka.

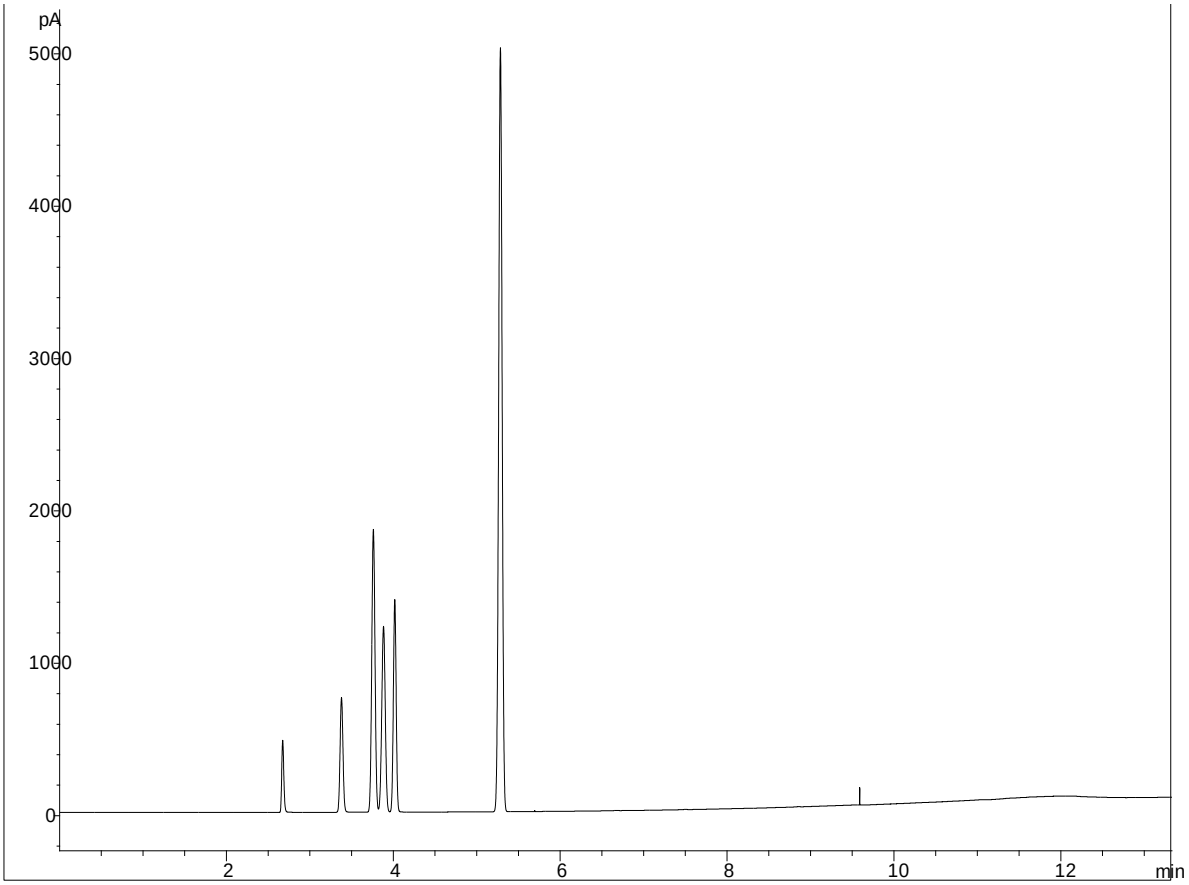
Dakle, potrebno je pripremiti niz uzoraka u koje se dodaje standardni dodatak (spoj koji želimo kvantificirati) u rastućoj koncentraciji. Potom se grafički prikaže ovisnost koncentracije analita o koncentraciji standardnog dodatka u uzorku. Odsječak na osi *x* na grafičkom prikazu predstavlja koncentraciju spoja u uzorku. Dakle, koncentracija spoja od interesa izračuna se ekstrapolacijom iz jednadžbe pravca na grafičkom prikazu. Budući da se kalibracijska krivulja standardnog dodatka izrađuje na temelju podataka dobivenih analizom određenog, uvijek istog, uzorka ne može se primijeniti na ostale uzorke. Stoga svaki uzorak zahtjeva izradu vlastite kalibracijske krivulje (Harvey, 1999).

Vrijeme zadržavanja, t_R, predstavlja vrijeme koje je potrebno da analit s mjesta injiciranja dođe do detektora. Naime, sastavnice uzorka nanesenog na kolonu, nošene mobilnom fazom, stupaju u interakcije sa stacionarnom fazom. Ako su te interakcije različitog intenziteta, pojedine sastavnice se razdvajaju u odvojene vrpce koje detektor pretvara u signale. Skup signala detektora prikazan kao funkcija vremena zadržavanja naziva se kromatogram. Svaki pik na kromatogramu ima svoje vrijeme zadržavanja. Prisutnost određenog analita u uzorku dokazuje se usporedbom vremena zadržavanja analita s vremenom zadržavanja standarda pod uvjetom da se analiza provodi pod istim uvjetima. Druga mogućnost je da se u uzorak doda određena količina analita čija se prisutnost želi dokazati te se gleda porast u visini pika nakon dodatka analita (Harvey, 1999).

U ovom radu lakohlapljivi analiti u ispitivanom uzorku identificirani su usporedbom njihovih vremena zadržavanja na koloni u uzorku i u standardnim otopinama. Na slici 4. prikazan je kromatogram ispitivanog uzorka, dok je na slici 5. prikazan kromatogram otopine standarda.



Slika 4.: *Kromatogram ispitivanog uzorka maslinovog ulja*



Slika 5.: *Kromatogram otopine standarda*

U tablici 4. prikazana su relativna vremena zadržavanja analita na kolini. Prvi se s kolone eluira metanol s vremenom zadržavanja od 2,68 min, dok se posljednji eluira etilacetat čije je vrijeme zadržavanja iznosilo 5,29 min. Dakle, na temelju vremena zadržavanja prikazanih u tablici 4. možemo zaključiti kako je ovom metodom postignuta uspješna ekstrakcija lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja i njihovo razdvajanje.

ANALIT	**RELATIVNO VRIJEME ZADRŽAVANJA, $t_{R,}$ (min)**
metanol	2,68
etanol	3,39
aceton	3,77
i-propanol	3,89
ACN	4,03
etil-acetat	5,29

Tablica 4.: *Relativno vrijeme zadržavanja analita, t_R, na koloni*

Koncentracija analita u uzorku određena je metodom standardnog dodatka. Za izradu kalibracijske krivulje uzorak je analiziran četiri puta. Najprije sam uzorak bez standardnog dodatka, a potom s dodatkom 0,5, 1 i 2 μL 20 %-tne mješavine standarda. Potom su izrađene kalibracijske krivulje za metanol, etanol i etilacetat iz kojih su ekstrapolacijom iz jednadžbe pravca izračunate koncentracije navedena tri analita u uzorku. Rezultati su prikazani u tablici 5.

ANALIT	**KONCENTRACIJA U UZORKU (μg/g)**
metanol	0,00848
etanol	0,00653
etilacetat	0,00541

Tablica 5.: *Koncentracija analita u uzorku*

5. ZAKLJUČAK

Na temelju različitih kemijskih i senzoričkih karakteristika, pojedina maslinova ulja mogu se razvrstati u razrede različite kvalitete. Europska komisija donijela je 1991. godine Uredbu br. 2568/91 (eur-lex.europa.eu) s ciljem međusobnog razlikovanja različitih vrsta ulja. Za određivanje sadržaja alifatskih alkohola predložena je kapilarna plinska kromatografija. Stoga je cilj ovog rada bio, prema ICH smjernicama (www.ich.org), ispitati preciznost nove HS-GC-FID metode za određivanje sadržaja pet lakohlapljivih tvari prisutnih u maslinovom ulju te istu primijeniti za analizu vlastitog maslinovog ulja.

Pregledom literature uočeno je kako se plinska kromatografija u kombinaciji s *headspace* tehnikom uzorkovanja nametnula kao vrlo učinkovita i pouzdana metoda za analizu lakohapljivih sastavnica maslinovog ulja. Prisutnost određenih lakohlapljivih supstancija u maslinovom ulju dokazana je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na koloni, t_R, u uzorku i u standardnim otopinama. Iz rezultata prikazanih u tablici 4. zaključeno je kako je ovom metodom postignuta uspješna ekstrakcija lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja i njihovo razdvajanje.

Od parametara koje je potrebno ispitati kako bi se ustanovilo da li je metoda prikladna za određenu primjenu ili ne, u ovom diplomskom radu ispitana je preciznost. Preciznost je ispitana na dvije razine, kao ponovljivost i srednja preciznost. Obje su razine ispitane analizom uzorka maslinovog ulja u koji su dodane standardne otopine alkohola (0,1 % v/v). Vrijednosti dobivenih rezultata, izražene kao relativno standardno odstupanje, RSD, prikazane su u tablici 2. RSD vrijednosti za ponovljivost bile su manje od 0,2 %, a za srednju preciznost od 1,1 %. Na temelju vrlo niske RSD vrijednosti može se zaključiti da je metoda precizna. Nadalje, ispitan je i utjecaj unutarnjeg standarda na povećanje preciznosti metode. U tablici 3. prikazane su iste vrijednosti rezultata, no ovaj put nakon korekcije s unutarnjim standardom. Zaključak je da dodatak unutarnjeg standarda u ispitivano ulje povećava preciznost metode. Mmetoda je također primijenjena za analizu vlastitog ulja. Vrijednosti vremena zadržavanja analita prikazane su u tablici 4. Vidljivo je da je ovom metodom postignuta uspješna ekstrakcija lakohlapljivih sastavnica maslinovog ulja te njihovo razdvajanje.

Potom je određena koncentracija metanola, etanola i etilacetata u ulju koje proizvodi moj otac, a rezultati su prikazani u tablici 5. S obzirom da su u ulju pronađene vrlo niske koncentracije alkohola, zaključeno je da analizirano ulje zadovoljava kriterije definirane u Uredbi Komisije Europske Unije prema kojima se može okarakterizirati kao visokokvalitetno maslinovo ulje.

6. LITERATURA

1. An Introduction to Headspace Sampling in Gas Chromatography Fundamentals and Theory, 2013., http://www.perkinelmer.com, pristupljeno 28. 5. 2015.

2. Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G. Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *J Chromatogr A*, 2004, 1054, 17–31.

3. Baccouri B, Ben Temime S, Campeol E, Cioni PL, Daoud D, Zarrouk M. Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils from five new cultivars. *Food Chem*, 2007, 102, 850–856.

4. Beltrán G, Bejaoui M A, Jimenez A, Sanchez-Ortiz A. Ethanol in Olive Fruit. Changes during Ripening. *J Agr Food Chem,* 2015, 63, 5309-5312.

5. Brkić Bubola K, Koprivnjak O, Sladonja B, Lukić I. Volatile compounds and sensory profiles of monovarietal virgin olive oil from Buža, Črna and Rosinjola cultivars in Istria (Croatia). *Food Technol Biotech*, 2012, 50, 192–198.

6. Gómez-Coca RB, Cruz-Hidalgo R, Fernandes GD, del Carmen Pe´rez-Camino M, Moreda W. Analysis of methanol and ethanol in virgin olive oil. *MethodsX*, 2014, 1, 207–211.

7. Harvey D. Standardizing Analytical Methods. U: Modern Analitycal Chemistry. Peterson KA, Oberbroeckling SR, urednici, New York, McGrew-Hill, 1999, str. 153–208.

8. Jiménez A, Beltrán G, Aguilera MP. Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils. *J Chromatogr A*, 2004, 1028, 321–324.

9. Kalua CM, Allen MS, Bedgood Jr, DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K.Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem*, 2007, 100, 273–286.

10. Kolb B. Headspace Gas Chromatography. U: Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science. Wilson ID, Pool C, urednici,. London, Elsevier Ltd, 2000, str. 233–240.

11. Morales MT, Luna G, Aparicio R. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem*, 2005, 91, 293–301.

12. Mornar A, Nigović B, Sertić M. Određivanje udjela metanola u tekućim farmaceutskim proizvodima primjenom HSS-GC-FID tehnike. U: Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda - praktikum, Farmaceutsko - biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, Zagreb, 2013, str. 13-19.

13. Nunes LS, Barbosa JTP, Fernandes AP, Lemos VA, dos Santos WNL, Korn MGA, Teixeira LSG. Multi-element determination of Cu , Fe , Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. *Food Chem*, 2011, 127, 780–783.

14. Skoog D A, West D M, Holler F J, Crouch SR. Gas Chromatography. U: Fundamentals of Analytical Chemistry. Simpson C, Kiselica S, Landsberg A, Berardy Schwartz R, urednici, Belmont, CA, Mary Finch, 2014, str. 887–911.

15. Snow NH. Head-space analysis in modern gas chromatography. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2002, 21, 608–617.

16. Storniolo CE, Roselló-Catafau J, Pintó X, Mitjavila MT, Moreno JJ. Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biology*, 2014, 2, 971–977.

17. UREDBA KOMISIJE (EEZ) br. 2568/91 od 11. srpnja 1991. o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize, 1991., http://eur-lex.europa.eu, pristupljeno 25. 6. 2015.

18. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005., http://www.ich.org, pristupljeno 25. 6. 2015.

19. Vichi S, Castellote AI, Pizzale L, Conte LS, Buxaderas S, López-Tamames E. Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *J Chromatogr A*, 2003, 983, 19–33.

20. Vichi S, Guadayol JM, Caixach J, López-Tamames E, Buxaderas S. Comparative study of different extraction techniques for the analysis of virgin olive oil aroma. *Food Chem*, 2007, 105, 1171–1178.

21. Žanetić M, Gugić M. Čuvanje djevičanskog maslinovog ulja. *Pomologia Croatica*, 2005, 11, 31–41.

22. Žanetić M, Gugić M. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. *Pomologia Croatica*, 2006, 12, 159–173.

7. SAŽETAK

Maslinovo se ulje koristi u ljudskoj prehrani još od davnih vremena, a posebice području Mediterana gdje se nalazi brojni maslinici. Sve veća pažnja maslinovom ulju posvećena je nakon objave rezultata istraživanja koja su pokazala da određene sastavnice maslinova ulja ispoljavaju pozitivne učinke na zdravlje.

Kvaliteta maslinovog ulja usko je povezana s prisutnošću kratkolančanih alkohola u maslinovom ulju. Male količine etanola i metanola u ulju dozvoljene su s obzirom da se spomenuti alkoholi stvaraju u plodu tijekom njegova sazrijevanja. S druge strane, visoke koncentracije etanola u ulju nastaju procesom fermentacije ponajviše za vrijeme skladištenja plodova.

Europska komisija donijela je 1991. godine Uredbu br. 2568/91 u kojoj je definirana podjela u 9 kategorija s obzirom na određene karakteristike ulja.

U ovom radu opisano je ispitivanje preciznosti, na razini ponovljivosti i srednje preciznosti, nove HSS-GC-FID tehnike za određivanje sadržaja alifatskih alkohola u maslinovom ulju te primjena navedene tehnike za analizu vlastitog maslinovog ulja. RSD vrijednosti za ponovljivost bile su manje od 0,2 %, a za srednju preciznost od 1,1 %. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da je navedena metoda precizna.

Također, uočeno je i da se preciznost metode povećava korekcijom vremena zadržavanja analita s vremenom zadržavanja unutarnjeg standarda.

Naposljetku, navedena metoda primijenjena je za analizu vlastitog maslinovog ulja. S obzirom na vrlo niske pronađene koncentracije etanola, metanola i etilacetata, zaključeno je da se analizirano ulje, prema udjelu niskolančanih alkohola, može okarakterizirati kao visokokvalitetno maslinovo ulje.

7. SUMMERY

The use of olive oil in human diet has been known since ancient times, especially in the Mediterranean area where many olive trees are planted. Olive oil has become the center of attention after publishing some research results which have shown that certain components of olive oil have beneficial effects on human health.

Quality of the olive oil is closely linked with the presence of short chained alcohols in the oil itself. Small amounts of ethanol and methanol in the oil are allowed since they are formed during the maturation of olives. On the other hand, high concentrations of ethanol in the oil appear during the fermentation processes occurring mainly throughout olive fruit storage.

European commission issued in 1991 Act no. 2568/91 which defines classification of the oils in 9 categories regarding certain characteristics of the oil.

Examination of the precision, as repeatability and intermediate precision, of the new HSS-GC-FID technique for the determination of the aliphatic alcohols content in the olive oil, as well as the application of the mentioned technique on the analysis of my own olive oil is described in this paper. RSD values were lower than 0.2 % for repeatability and lower then 1.1 % for intermediate precission. Based on the results obtained it is concluded that the used method is precise.

Moreover, it is noticed that the precision of the method is increased after correction of the retention time of the analite with the retention time of the internal standard.

In the end, the method was applied on the analysis of my own olive oil. Regarding the low concentrations of ethanol, methanol and ethyl acetate found in the oil, it is concluded that, based on the short chained alchohols content, the analyzed oil can be characterized as high-quality oil.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ispitivanje preciznosti i primjena nove HSS-GC-FID metode za određivanje lakohlapljivih spojeva u maslinovom ulju

Ana Marija Gospić

SAŽETAK

Maslinovo se ulje koristi u ljudskoj prehrani još od davnih vremena, a posebice području Mediterana gdje se nalazi brojni maslinici. Sve veća pažnja maslinovom ulju posvećena je nakon objave rezultata istraživanja koja su pokazala da određene sastavnice maslinova ulja ispoljavaju pozitivne učinke na zdravlje.

Kvaliteta maslinovog ulja usko je povezana s prisutnošću kratkolančanih alkohola u maslinovom ulju. Male količine etanola i metanola u ulju dozvoljene su s obzirom da se spomenuti alkoholi stvaraju u plodu tijekom njegova sazrijevanja. S druge strane, visoke koncentracije etanola u ulju nastaju procesom fermentacije ponajviše za vrijeme skladištenja plodova.

Europska komisija donijela je 1991. godine Uredbu br. 2568/91 u kojoj je definirana podjela u 9 kategorija s obzirom na određene karakteristike ulja.

U ovom radu opisano je ispitivanje preciznosti, na razini ponovljivosti i srednje preciznosti, nove HSS-GC-FID tehnike za određivanje sadržaja alifatskih alkohola u maslinovom ulju te primjena navedene tehnike za analizu vlastitog maslinovog ulja. RSD vrijednosti za ponovljivost bile su manje od 0,2 %, a za srednju preciznost od 1,1 %. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da je navedena metoda precizna.

Također, uočeno je i da se preciznost metode povećava korekcijom vremena zadržavanja analita s vremenom zadržavanja unutarnjeg standarda.

Naposljetku, navedena metoda primijenjena je za analizu vlastitog maslinovog ulja. S obzirom na vrlo niske pronađene koncentracije etanola, metanola i etilacetata, zaključeno je da se analizirano ulje, prema udjelu niskolančanih alkohola, može okarakterizirati kao visokokvalitetno maslinovo ulje.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranica, 5 grafička prikaza, 5 tablica i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: maslinovo ulje, plinska kromatografija, lakohlapljivi spojevi, validacija

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana Mornar Turk, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ivana Perković, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Analitics and Control of Medicines
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Determination of the precision and application of the new HSS-GC-FID method for determination of volatile components in olive oil

Ana Marija Gospić

SUMMARY

The use of olive oil in human diet has been known since ancient times, especially in the Mediterranean area where many olive trees are planted. Olive oil has become the center of attention after publishing some research results which have shown that certain components of olive oil have beneficial effects on human health.
Quality of the olive oil is closely linked with the presence of short chained alcohols in the oil itself. Small amounts of ethanol and methanol in the oil are allowed since they are formed during the maturation of olives. On the other hand, high concentrations of ethanol in the oil appear during the fermentation processes occurring mainly throughout olive fruit storage.
European commission issued in 1991 Act no. 2568/91 which defines classification of the oils in 9 categories regarding certain characteristics of the oil.
Examination of the precision, as repeatability and intermediate precision, of the new HSS-GC-FID technique for the determination of the aliphatic alcohols content in the olive oil, as well as the application of the mentioned technique on the analysis of my own olive oil is described in this paper. RSD values were lower than 0.2 % for repeatability and lower then 1.1 % for intermediate precission. Based on the results obtained it is concluded that the used method is precise.
Moreover, it is noticed that the precision of the method is increased after correction of the retention time of the analite with the retention time of the internal standard.
In the end, the method was applied on the analysis of my own olive oil. Regarding the low concentrations of ethanol, methanol and ethyl acetate found in the oil, it is concluded that, based on the short chained alchohols content, the analyzed oil can be characterized as high-quality oil.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 5 figures, 5 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive oil, gas chromatography, volatile components, validation

Mentor: **Miranda Sertić**, **Ph.D.** *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Perković, **Ph.D.** *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.