

Optimizacija i validacija HS-SPME/GC-MS metode za određivanje aldehida i ketona u uzorcima bezglutenskog kruha

Kišić, Petra

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:159:704788>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Petra Kišić
699/USH

**OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA
HS-SPME/GC-MS METODE ZA
ODREĐIVANJE ALDEHIDA I
KETONA U UZORCIMA
BEZGLUTENSKOG KRUHA**

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 dr.sc. Marine Krpan, doc. 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 područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA HS-SPME/GC-MS METODE ZA ODREĐIVANJE ALDEHIDA I KETONA U UZORCIMA BEZGLUTENSKOG KRUHA

Petra Kišić, 699/USH

Sažetak: *Danas je sve veća potražnja za bezglutenskim proizvodima, što zbog lošeg zdravstvenog stanja svjetske populacije, a što zbog pomodarstva takvog oblika prehrane. Iz tog razloga potrebno je poboljšati senzorske osobine bezglutenskih proizvoda, posebice njihov aromatski profil. Stoga, je u ovom radu provedena optimizacija i validacija HS-SPME/GC-MS metode za određivanje 19 spojeva arome, aldehida i ketona, u uzorcima bezglutenskog kruha. Optimizacija mikroekstrakcije obuhvaćala je ispitivanje utjecaja temperature (40, 50 i 60 °C) i vremena trajanja ekstrakcije (30, 45 i 60 minuta) na količinu ekstrahiranih spojeva. Validacija metode provedena je pri definiranim optimalnim uvjetima ekstrakcije, pri čemu su ključni validacijski parametri bili selektivnost, linearnost, preciznost, granica detekcije i granica kvantifikacije. Temperatura 60 °C i vrijeme 60 minuta 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 aldehida i ketona u bezglutenskom kruhu.*

Ključne riječi: *aldehidi i ketoni, bezglutenski kruh, HS-SPME/GC-MS, optimizacija, validacija*

Rad sadrži: 62 stranice, 40 slika, 26 tablica, 53 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Doc.dr.sc. Marina Krpan*

Pomoć pri izradi: *Saša Ajredini, mag.ing., stručni suradnik*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. *Ksenija Marković*
2. Doc.dr.sc. *Marina Krpan*
3. Doc.dr.sc. *Dubravka Novotni*
4. Prof.dr.sc. *Karin Kovačević-Ganić* (zamjena)

Datum obrane: 22. srpanj 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 ALDEHYDES AND KETONES IN THE SAMPLES OF GLUTEN-FREE BREAD

Petra Kišić, 699/USH

Abstract: *The demand for gluten-free products increases constantly, due to both generally bad health among human population and trends in people's diet. For this reason, it is necessary to improve the organoleptic characteristics of gluten-free products, especially their aromatic profile. Therefore, in this thesis HS-SPME/GC-MS method for the determination of 19 aromatic compounds, aldehydes and ketones, in the gluten-free bread samples was optimized and validated. Optimization of microextraction included determination of the influence of different temperatures (40, 50 i 60 °C) and extraction times (30, 45 i 60 minutes) 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 60 °C and time 60 minutes showed to be optimal conditions for microextraction of target compounds. Results of validation experiments confirmed method's selectivity, linearity under work range, precision and sensitivity for determination of all target compounds. Since all validation criteria have been met, it can be concluded that optimized HS-SPME/GC-MS method is suitable for determination of aldehydes and ketones in gluten-free bread.*

Keywords: *aldehydes and ketones, gluten-free bread, HS-SPME/GC-MS, optimization, validation*

Thesis contains: 62 pages, 40 figures, 26 tables, 53 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. Marina Krpan, Assistant professor*

Technical support and assistance: *Saša Ajredini, BSc, Research assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Ksenija Marković*, Associate professor
2. PhD. *Marina Krpan*, Assistant professor
3. PhD. *Dubravka Novotni*, Assistant professor
4. PhD. *Karin Kovačević-Ganić*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 22 July 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BEZGLUTENSKI KRUH	2
2.2. METODE ZA ODREĐIVANJE AROMATSKOG PROFILA KRUHA	4
2.2.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi.....	4
2.2.2. Plinska kromatografija-masena spektrometrija.....	5
2.3. VALIDACIJA ANALITIČKE METODE.....	6
2.4. PARAMETRI VALIDACIJE.....	7
2.4.1. Selektivnost/ specifičnost.....	7
2.4.2. Linearnost i područje linearnosti.....	8
2.4.3. Točnost	8
2.4.4. Preciznost.....	8
2.4.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	10
2.4.6. Robusnost	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJAL	12
3.1.1. Uređaji i oprema	12
3.1.2. Kemikalije i standardi.....	13
3.1.3. Bezglutenski kruh	14
3.2. METODE RADA	15
3.2.1. Eksperimentalni uvjeti	15
3.2.2. Priprema 20% otopine NaCl	16
3.2.3. Priprema otopine za analizu.....	16
3.2.4. Tijek analize.....	16
3.2.5. Linearni retencijski indeks.....	16
3.2.6. Optimizacija metode	17
3.2.7. Validacija metode	17
3.2.8. Analiza i obrada podataka.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. LINEARNI RETENCIJSKI INDEKSI.....	22
4.2. OPTIMIZACIJA METODE	23
4.3. VALIDACIJA METODE.....	25
4.3.1. Selektivnost.....	25
4.3.2. Linearnost	32
4.3.3. Intermedijarna preciznost.....	51
4.3.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	54
5. ZAKLJUČCI	56
6. LITERATURA	57

1. UVOD

Današnji užurbani način života ostavlja nam malo vremena za provođenje pravilne prehrane kojom bi osigurali sve dnevno potrebne nutrijente. Iz tog se razloga javljaju suvremene bolesti koje su često povezane s hranom koju jedemo.

Jedno od takvih stanja je i celijakija, stanje prisutno kod osoba s intolerancijom na gluten te takve osobe trebaju konzumirati isključivo bezglutenske proizvode. Sve veća potražnja za bezglutenskom hranom navodi proizvođače na unaprjeđenje senzorskih osobina takvih proizvoda. Kako bi se omogućilo poboljšanje mirisa i okusa, potrebno je najprije istražiti koji su to spojevi koji utječu na sensoriku bezglutenskih proizvoda.

Hlapljive komponente svježe pečenog kruha su upravo ono što potrošače privlači tom proizvodu pa je stoga važno posebnu pažnju pridodati baš tom elementu. Među spojevima koji se ističu u obogaćivanju arome nalaze se mnogi organski spojevi, kao što su aldehidi i ketoni.

Za određivanje hlapljivih komponenti, odnosno arome kruha najčešće se koristi metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi u kombinaciji s plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom. Mikroekstrakcija služi za izdvajanje hlapljivih spojeva koji se zatim uvode u plinski kromatograf pomoću kojeg se odvajaju ekstrahirani spojevi. Ovakva metoda određivanja hlapljivih komponenti kruha pokazala se kao brza, jednostavna i učinkovita.

Ciljevi ovog istraživanja bili su optimizacija i validacija metode za određivanje aldehida i ketona u uzorcima bezglutenskog kruha pomoću metode „headspace“ mikroekstrakcije na čvrstoj fazi uz kombinaciju s plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom. Pomoću dobivenih rezultata odgovorit će se na pitanje je li ova metoda prihvatljiva za određivanje aldehida i ketona u bezglutenskom kruhu te jesu li zadovoljeni ključni kriteriji validacije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BEZGLUTENSKI KRUH

Kruh se smatra osnovnom hranom u prehrani svjetske populacije (Mansueto i sur., 2014). Usljed sve većeg broja ljudi s dijagnozom celijakije, u kombinaciji s potrošačkom potražnjom za novim proizvodima koji se percipiraju kao prihvatljiviji zbog povoljnih učinaka na zdravlje, tržište proizvoda od alternativnih žitarica raste (Hüttner i Arendt, 2010). Gluten se nalazi u proizvodima i brašnu koji sadrže pšenicu, pir, raž, ječam i zob. Sastoji se od hidratiziranih proteinskih frakcija glijadina i glutenina. Ovaj proteinski kompleks bitan je čimbenik u tvorbi elastičnog i rastezljivog tijesta (Hüttner i Arendt, 2010).

Celijakija je poremećaj koji je imunološki posredovan konzumacijom glutena u genetski osjetljivih pojedinaca (Husby i sur., 2012). Bolest može imati različite manifestacije što otežava dijagnosticiranje stanja. Simptomi celijakije mogu se opisati kao spektar koji se razlikuje od teških simptoma malapsorpcije do odsutnosti simptoma (Mustalahti i sur., 2002). U slučaju odsutnosti simptoma, osobe koje boluju nemaju gastrointestinalnih problema, unatoč oštećenju resica tankog crijeva (Cranney i sur., 2007). Jedino potvrđeno liječenje celijakije jest doživotno pridržavanje bezglutenske prehrane (Shepherd i Gibson, 2013).

Da bi zadovoljili potražnju potrošača za visokom kvalitetom bezglutenskih proizvoda, proizvođači teže izradi bezglutenskog kruha koji je vrlo sličan pšeničnom kruhu (Moore i sur., 2004). Proizvodnja takvog kruha, koji ne sadrži gluten, predstavlja pravi tehnološki izazov.

Bezglutensko brašno u kombinaciji s vodom nema sposobnost tvorbe rastezljivog tijesta upravo zbog činjenice da ne postoji sirovina, sastojak ili aditiv koji može u potpunosti zamijeniti gluten. Takvo se tijesto dobiva iz smjese vode, kvasca, bezglutenskog brašna i škroba u koju se miješanjem inkorporira zrak, a ugljični dioksid dobiva se fermentacijom dodanog kvasca (Onyango i sur., 2009). Rezultat toga je kruh s mnogobrojnim nedostacima uključujući smanjeni volumen, nedovoljno poroznu strukturu, suha i mrvljiva tekstura, raspuknuta kora, osiromašen okus i aroma te brzo starenje (Pszczola, 2012).

Upravo iz navedenih razloga, posljednjih nekoliko godina, dodatkom raznih sastojaka nastoji se poboljšati receptura bezglutenskog kruha (Hüttner i Arendt, 2010). Kombiniranim dodatkom enzima, škroba, kiselog tijesta i hidrokoloida može se povećati cjelokupna kvaliteta bezglutenskog brašna, uključujući i aromatski profil kruha (Houben i sur., 2012).

Na aromu dizanih pekarskih proizvoda utječu sirovine koje se koriste, uvjeti fermentacije, vrsta korištenih startera te uvjeti pečenja (Gobbetti i sur., 2008). Sastav

aromatskih spojeva se mijenja tijekom procesa proizvodnje kruha. Mikrobiološka i enzimaska promjena ugljikohidrata, aminokiselina i lipida u tijestu stvara spojeve arome koji su važni za konačan miris, a to su alkoholi, esteri i karbonilni spojevi dok na miris vanjskog dijela kruha, kore, utječu toplinske reakcije do kojih dolazi tijekom pečenja. Poboljšana aroma može se postići uz optimalnu kombinaciju bakterija mliječne kiseline i kvasaca (Hansen i Schieberle, 2005). Također, proces proteolize tijekom fermentacije tijesta poboljšava aromu kruha bez utjecaja na teksturu i volumen samog kruha (Thiele i sur., 2002). Bakterije mliječne kiseline mogu katalizirati reakcije poput deaminacije, transaminacije i dekarboksilacije pri čemu nastaju aminokiseline koje utječu na konačan okus kruha. Jedan od takvih primjera je glutamin koji se reakcijama fermentacije prevodi u glutamat, koji daje specifičnu aromu krajnjem proizvodu (Gänzle i sur., 2007). Put deaminacije arginina u *Lactobacillus spp.* potiče veću proizvodnju ornitina, a time se povećava i nastanak 2-acetil pirolina koji najviše doprinosi aromi kore svježeg pečenog pšeničnog kruha (Gänzle i sur., 2007). Uz proteine, i lipidi mogu uvelike utjecati na kvalitetu kruha. Oksidacija, koja se javlja tijekom skladištenja brašna i miješanja tijesta, pokreće stvaranje spojeva poput (E)-2-nonenala i ostalih aldehida koji značajno utječu na okus pšeničnog i rižinog brašna (Vermeulen i sur., 2007).

Pokazalo se da fermentacija potiče stvaranje spojeva arome i u bezglutenskim proizvodima (Mugula i sur., 2003). Upotrebom *Issatchenkia orientalis* u kombinaciji s *Lactobacillus brevis* ili *L. plantarum* u visokoj količini nastaju spojevi iz skupine alkohola, dok se diacetil dobiva upotrebom bakterija *L. plantarum* i *Pediococcus pentosaceus*. Proizvodnja aldehida se povećava ko-fermentacijom s *L. plantarum* i upotrebom kvasaca (Edema i Sanni, 2008). Iako su potrebna daljnja istraživanja, jasno se da zaključiti da je fermentacijom kiselog tijesta s bakterijama mliječne kiseline i kvascima moguće uvelike poboljšati miris i okus bezglutenskih proizvoda (Moroni i sur., 2009).

2.2. METODE ZA ODREĐIVANJE AROMATSKOG PROFILA KRUHA

2.2.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Osnove metode mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase microextraction*, SPME) utemeljene su na Sveučilištu u Waterloo-u u Kanadi 1989. godine (Belardi i Pawliszyn, 1989), a primjena prvog SPME sustava publicirana je 1990. godine (Arthur i Pawliszyn, 1990). SPME je ponajprije razvijen za rješavanje potreba za brзом pripremom uzoraka u laboratoriju. U ovoj tehnici, mala količina ekstrakcijske faze vezane na krutom nosaču izložena je uzorku u točno definiranom vremenskom periodu (Pawliszyn, 2012).

Osnovni dio SPME sustava predstavlja tzv. SPME injekcija, koja podsjeća na kromatografsku, a razlikuje se po tome što sadrži 1-2 cm dugo vlakno smješteno unutar igle injekcije, koje je napravljeno od odgovarajućeg polimera nanesenog na nosač od SiO₂, promjera 110 μm. Proces mikroekstrakcije zasniva se na preraspodjeli analita između vlakna i matriksa uzorka, odnosno na selektivnoj apsorpciji/adsorpciji ciljanih analita u aktivnom sloju vlakna i direktnoj desorpciji u injektoru kromatografa. Postupak SPME se sastoji od nekoliko koraka. Prije same analize, vlakno je uvučeno u metalnu cjevčicu SPME injekcije. Nakon probijanja septuma bočice u koju je prethodno stavljena određena količina uzorka, vlakno se izvlači iz metalne zaštite, tj. izlaže uzorku spuštanjem klipa injekcije. Nakon određenog vremena, vlakno s ekstrahiranim analitima se ponovo uvlači u iglu, koja se izvlači iz bočice. Ekstrahirani analiti se desorbiraju s vlakna uvođenjem SPME igle u injektor kromatografskog sustava, pomoću toplinske desorpcije u slučaju primjene plinske kromatografije (engl. *Gas Chromatography*, GC), odnosno desorpcije u otapalu kod tekućinske kromatografije (*Liquid Chromatography*- LC) (Pawliszyn, 2012).

SPME je ravnotežna tehnika u kojoj se analiti raspodjeljuju između tri faze: uzorka, plinovite faze iznad uzorka i vlakna. Na vlakno se pri tome ne ekstrahira cjelokupna količina analita prisutna u uzorku, ali se odgovarajućom kalibracijom ova tehnika može koristiti i za uspješnu kvantifikaciju ciljanih spojeva (Đurović i sur., 2007). Količina analita koja se apsorbira/adsorbira na vlakno ovisi o puno faktora: debljini i polarnosti aktivnog sloja vlakna, načinu uzorkovanja, prirodi uzorka i analita, načinu i brzini miješanja uzorka, trajanju mikroekstrakcije, temperaturi na kojoj se ona izvodi, itd. (Đurović, 2011).

Da bi SPME metoda zadovoljila najvažnije analitičke parametre validacije, potrebno ju je optimirati, što podrazumijeva izbor vlakna i debljine njegovog aktivnog sloja, postavke eksperimentalnih parametara vezanih za proces mikroekstrakcije (temperatura, način i brzina

miješanja uzorka, topljivost analita, trajanje mikroekstrakcije, itd.) te optimizaciju vremena i temperature desorpcije (Wardencki i sur., 2004).

2.2.2. Plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS)

Plinska kromatografija je tehnika sa širokom primjenom čija upotreba je prvi put zabilježena prije 60 godina. Od tada, njen razvoj se nastavio i doveo do visoke osjetljivosti, svestranosti, mogućnosti automatizacije i jednostavnosti metode te širenja njene primjenjivosti. Budući da se odjeljivanje spojeva može odvijati samo u plinovitom stanju, čvrsti i tekući uzorci moraju se najprije prevesti u plinovito stanje, a to se ujedno smatra i najvećim ograničenjem ove metode (Rouessac i Rouessac, 2007).

Dijelovi od kojih se sastoji plinski kromatograf su injektor, kolona i detektor povezan s termostatski kontroliranom pećnicom koja onemogućava pregrijavanje kolone. Mobilna faza koja prolazi kroz kolonu naziva se plin nosioc i njegov je protok strogo kontroliran kako bi se omogućila ponovljivost retencijskog vremena ciljanih spojeva. Analiza započinje kada se mala količina uzorka uvodi u injektor koji ima dvostruku funkciju: prevođenje uzorka u plinovito stanje i miješanje sa strujom mobilne faze na početku kolone. Uvjeti rada injektora, kao i načini injekcije, razlikuju se ovisno o metodi. Princip rada injektora može biti izravno uparavanje, „split/splitless“ injekcija, „cold on“ – kolonska injekcija i termostatski kontrolirano uparavanje, dok korištenje automatskog injekcijskog sustava može značajno poboljšati preciznost mjerenja (Rouessac i Rouessac, 2007).

Kolona je obično uska šuplja cijev dužine 1 do 100 metara, različitog sastava i sadržaja stacionarne faze, a nalazi se u termostatski kontroliranoj pećnici koja postiže temperaturu preko 400°C. Ovisno o njihovoj izvedbi, razlikujemo dvije vrste kolona. Punjene kolone imaju stacionarnu fazu naneseu ili kemijski vezanu na poroznu podlogu, dok je kod kapilarnih kolona tanki sloj stacionarne faze položen ili vezan na unutarnju stjenku kolone. Najčešće korištene vrste stacionarne faze su polisiloksani i polietilenglikoli (Jennings i sur., 1997).

Detektori su svrstani u dvije skupine, ovisno o tome dovode li do samo jedne informacije kao što je vrijeme zadržavanja i onih koji daju, osim vremena zadržavanja, podatke o strukturi analita (Eiceman i sur., 1998). U plinskoj kromatografiji koristi se više vrsta detektora, a izbor istog provodi se na osnovi komponente koja se analizira pa tako razlikujemo detektor toplinske vodljivosti (engl. *Thermal Conductivity Detector*, TCD), plameno-ionizacijski

detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID), dušik-fosforni detektor (engl. *Nitrogen Phosphorus Detector*, NPD), detektor zarobljavanja elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD), foto-ionizacijski detektor (engl. *Photo Ionization Detector*, PID), detektor atomske emisije i maseno spektrometrijski detektor (engl. *Mass Spectrometry Detector*, MSD) (Dorman i sur., 2010).

Maseno spektrometrijski detektor sastoji se od spektrometra mase niske razlučivosti, a postavljen je na izlazu iz kolone. Ima mogućnost snimanja svih iona prisutnih u uzorku (engl. Total Ion Current, TIC) i snimanja samo odabranih iona (engl. Single Ion Monitoring, SIM). Budući da maseni spektrometri analiziraju plinovitu fazu iona, oni djeluju u visokom vakuum sustavu. Sastoje se od tri osnovna dijela: izvora ionizacije, selektivnog masenog analizatora i detektora iona. U ovom dijelu uzorak je vođen kroz nekoliko koraka: ionizacija, akceleracija, separacija, detekcija te prikaz masenog spektra. Iako ova metoda ponekad ima manju osjetljivost od klasičnih detektora, za neke vrste analiza je i dalje neophodna, osobito u studijama utjecaja na okoliš (Hites, 1997).

2.3. VALIDACIJA ANALITIČKE METODE

Poznato je da je validacija analitičke metode potrebna u svim analitičkim laboratorijima kako bi se dokazala njena učinkovitost i primjenjivost (Taverniers i sur., 2004). Važnost validacije metode naglašena je kasnih 40-ih, kada su American Chemical Society i Merck & Co došli do zaključka kako su matematika i statistika nužan preduvjet za uspješan razvoj i prilagodbu novih analitičkih metoda (Clarke, 1947). U ranim 70-ima objavljen je niz članaka u kojima se naglašava potreba provedbe dosljednog skupa definicija za utvrđivanje obilježja razvijenih analitičkih metoda te potreba za usporedbom njihovih prednosti i nedostataka zbog velikog broja novih analitičkih metoda (Wilson, 1973).

Riječ validacija potječe od latinske riječi „*validus*“ koja u doslovnom prijevodu znači jak, snažan, moćan (Araujo, 2009). Prema definiciji norme ISO 9000 iz 2005. godine, validacija analitičke metode je niz postupaka kojima se potvrđuje da je metoda prikladna za njenu namijenjenu svrhu. Prilikom validacije metode definiraju se analitički parametri koji moraju biti zadovoljeni u svrhu dokazivanja njene prikladnosti. Postupak validacije metode vrlo je usko vezan uz sam razvoj metode (Eurachem Guide, 2014).

Metoda bi trebala biti validirana kada je potrebno dokazati da su karakteristike njezine izvedbe adekvatne za korištenje u određenu svrhu. Laboratorij bi trebao validirati

nestandardne metode, novorazvijene metode, standardne metode korištene izvan opsega njezine uporabe te standardne metode koje su proširene ili modificirane (ISO/IEC 17025, 2005).

Sam postupak validacije neke metode može se provesti na različite načine, što je i opisano u različitim vodičima. Ono što je osnova validacije bilo koje analitičke metode je izvođenje eksperimenata u kojima se koriste uzorci i/ili standardi slični uzorcima za čiju je analizu metoda namijenjena (Peters i sur., 2007).

Općenito, postupak validacije se sastoji od nekoliko različitih koraka: odabira analitičke metode, načina uzorkovanja, pripreme uzorka, provođenja eksperimenata i statističke obrade podataka (Araujo, 2009). Opća procjena analitičke metode uključuje provjeru je li odabrani instrument pogodan za analizu, jesu li materijali (reagensi, standardi, itd.) odgovarajuće čistoće i stabilnosti za upotrebu u analitičkim određivanjima, imaju li analitičari odgovarajuću obuku i kvalifikacije te je li prethodna dokumentacija, kao što su analitički postupci s pravilno odobrenim protokolom, pregledana (Swartz i Krull, 1997). Ključni element za uspješnu validaciju metode je upravo priprema uzorka. Ona mora biti dobro dokumentirana, a izbor određenog postupka pripreme ovisi o vrsti i koncentraciji analita, matriksu uzorka, veličini uzorka i instrumentalnoj tehnici. Provođenje eksperimenata se odnosi na dobivanje kvalitativnih ili kvantitativnih informacija iz uzoraka s prihvatljivom razinom nesigurnosti. Analiza podataka sastoji se od matematičkih i statističkih postupaka koji vode smislenim informacijama i zaključcima o eksperimentu i validaciji metode u cjelini (Araujo, 2009).

2.4. PARAMETRI VALIDACIJE

Za analitičke postupke postoji mogućnost određivanja više parametara validacije kao što su specifičnost/selektivnost, linearnost i područje linearnosti, točnost, preciznost (ponovljivost, intermedijarna preciznost i obnovljivost), granica detekcije i granica kvantifikacije i robusnost (Shah i sur., 2000).

2.4.1. Selektivnost/ specifičnost

Specifičnost je sposobnost procjene metode da točno i specifično odredi analit u prisutnosti ostalih komponenti, gdje se očekuje njegova prisutnost (ICH, 2005). Ako govorimo o razlici između specifičnosti i selektivnosti, selektivna metoda istovremeno

određuje više komponenti (WELAC, 1993), dok se pod specifičnošću smatra određivanje samo jednog analita u uzorku (González i Herrador, 2007).

2.4.2. Linearnost i područje linearnosti

Linearnost analitičkog postupka je njegova sposobnost (unutar danog raspona) da se dobiju rezultati ispitivanja koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Područje analitičkog postupka je interval između gornje i donje koncentracije analita u uzorku (uključujući te koncentracije) za koje je dokazano da analitički postupak ima odgovarajuću razinu preciznosti, točnosti i linearnosti (ICH, 2005). Pri određivanju linearnosti metode, potrebno je analizirati kalibracijske standarde na najmanje pet koncentracijskih razina (Thompson i sur., 2002). Raspon koncentracija treba obuhvatiti najmanje 80-120 % od očekivane koncentracije analita u uzorku, uz ponavljanje mjerenja minimalno dva do tri puta (Rambla-Alegre i sur., 2012). Kao dokaz linearnosti navodi se jednadžba regresijskog pravca, koeficijent determinacije i koeficijent korelacije te prilaže grafički prikaz. Kako bi kriterij prihvatljivosti bio zadovoljen, koeficijent korelacije mora biti veći ili jednak 0,999 (Araujo, 2009). Iz rezultata određivanja linearnosti metode izračunava se i parametar iskorištenja. On odražava pogrešku baždarnog dijagrama, prikazujući odnos eksperimentalno i teoretski određene koncentracije ciljanog spoja (ICH, 2005). U tablici 1. nalaze se kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje ovisno o udjelu analita u uzorku (AOAC, 2011).

2.4.3. Točnost

Točnost analitičkog postupka odražava stupanj podudaranja između prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti koja je dobivena određenim analitičkim postupkom (ICH, 2005). Određivanje tog parametra omogućuje procjenu utjecaja sustavne pogreške metode na krajnji rezultat. Procjena točnosti može se provesti na nekoliko načina: usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim referentnom metodom, usporedbom izmjerene koncentracije analita i poznate referentne vrijednosti te metodom dodatka analita ili referentnog materijala u matriks uzorka (Araujo, 2009).

2.4.4. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka izražava bliskost slaganja između niza mjerenja dobivenih analizom više homogenih uzoraka pri definiranim uvjetima. Obično se izražava kao

odstupanje, standardna devijacija ili koeficijent varijabilnosti niza mjerenja (ICH, 2005). Ovisno o uvjetima analize, određuje se koje parametre analize je potrebno ispitati (Eurachem Guide, 2014). Ponovljivost izražava preciznost pod istim uvjetima rada u kratkom vremenskom intervalu (ICH, 2005). Analiza ponovljivosti se provodi u jednom laboratoriju, od strane jednog analitičara, na istoj aparaturi, u kratkom vremenskom razdoblju, s istim reagensima, a određuje se u najmanje 9 mjerenja (3 koncentracije u triplicatu) u definiranom području metode (AOAC, 2011). Intermedijarna preciznost (međupreciznost) označava preciznost unutar jednog laboratorija, uz moguće varijacije kao što su različiti dani analize, različiti analitičari, oprema, itd. Cilj je utvrditi hoće li rezultati biti isti, unatoč promjenama unutar laboratorija (ICH, 2005). Međulaboratorijska preciznost označava obnovljivost, odnosno reproducibilnost metode. Ona se procjenjuje pomoću međulaboratorijskih analiza, a treba ju uzeti u obzir u slučaju standardizacije analitičkog postupka (ICH, 2005). U tablici 1. nalaze se kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost ovisno o udjelu analita u uzorku, a u tablici 2. nalaze se kriteriji prihvatljivosti za reproducibilnost ovisno o udjelu analita u uzorku (AOAC, 2011).

Tablica 1. Kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje i ponovljivost (AOAC, 2011)

Udjel 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

Tablica 2. Kriteriji prihvatljivosti za reproducibilnost (AOAC, 2011)

Udjel analita (%)	Omjer analita	Reproducibilnost, RSD (%)
100 %	1,0	2
1 %	0,01	4
0,01 %	0,001	8
1 ppm	0,000001	16
10 ppb	0,00000001	32
1 ppb	0,0000000001	45

2.4.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije nekog analitičkog postupka predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati kao točna vrijednost, a granica kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznosti i točnosti. Granica kvantifikacije je parametar kvantitativnih testova za niske koncentracije analita u uzorcima te se određuje kod metoda za određivanje nečistoća i/ili produkata razgradnje (ICH, 2005). Pri određivanju granice detekcije i kvantifikacije, moguće je koristiti nekoliko pristupa. Procjena može biti vizualna, s pomoću omjera signal/šum ili statistička. Kada govorimo o vizualnoj procjeni, ona se može primijeniti i kod neinstrumentnih i instrumentnih metoda, većinom samo za granicu detekcije, a procjenjuje se najmanji signal koji se pouzdano može prepoznati. Omjer signal/šum može se primijeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom, a prihvatljivi su omjeri 3 : 1 za granicu detekcije i 10 : 1 za granicu kvantifikacije (ICH, 2005). Statistički se granice detekcije i kvantifikacije mogu odrediti na bazi standardne devijacije signala i nagiba prema jednadžbama: Granica detekcije (GD) = 3,3 STDEV/a, odnosno granica kvantifikacije (GK) = 10 STDEV/a pri čemu je a nagib, a STDEV standardna devijacija regresijskog pravca (Lazarić, 2012).

2.4.6. Robusnost

Robusnost analitičkog postupka je sposobnost metode da prilikom malih, ali namjernih promjena parametara ne dolazi do značajnih promjena rezultata analize, odnosno

da su devijacije rezultata analize unutar dozvoljenih kriterija prihvatljivosti metode (ICH, 2005). Ako promjena nekog radnog uvjeta ne utječe bitno na rezultat, kaže se da je on u području robusnosti metode. Uvjete za koje je utvrđeno da utječu na rezultat treba kontrolirati i to jasno naznačiti u opisu metode (Lazarić, 2012). U slučaju plinske kromatografije, varijacije mogu biti primjena različite kolone, male promjene u temperaturi, protoku i slično (Vander-Heyden i sur., 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uređaji i oprema

„Headspace“ mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (HS-SPME):

Termoblok, PIERCE Reacti-Therm NO. 18971

Držač SPME vlakna, SUPELCO

Vlakno Carbon/DVB/PDMS, 50/30 μm , Stableflex 24 Ga

Posude: staklene vialice, 20 mL

Čep: Crimp N20 Al, septa silikon/PTFE

Magnet: 15x6 mm, bez izbočenja

Kromatografija:

Plinski kromatograf: Agilent Technologies 6890 N

Network GC System

Maseni detektor, Agilent Technologies 5973 inert

Liner: ravni, 0,75 mm, Agilent

Baza podataka: NIST 05

3.1.2. Kemikalije i standardi

U tablici 3. prikazani su svi podaci o korištenim standardima.

Tablica 3. Podaci o korištenim standardima

Ime spoja	CAS broj	Proizvođač	Čistoća (%)
1-butanol	71-36-3	Merck	99,5
Pentanal	110-62-3	Acros Organics	97,0
2-oktanon	111-13-7	Acros Organics	99,0
Oktanal	124-13-0	Acros Organics	99,0
6-metil-5-hepten-2-on	110-93-0	Aldrich	99,0
Nonanal	124-19-6	Acros Organics	95,0
3-furaldehid	498-60-2	Acros Organics	98,0
Furfural	98-01-1	Sigma Aldrich	99,0
Dekanal	112-31-2	Acros Organics	95,0
2-nonenal, trans	18829-56-6	Fluka	AS*
Benzacetaldehid	122-78-1	Acros Organics	98,0
2,4-dekadienal, trans,trans	25152-84-5	Acros Organics	95,0
2-butanon	78-93-3	Acros Organics	99,0
Butan-2,3-dion	431-03-8	Acros Organics	99,0
2,3-prentandion	600-14-6	Acros Organics	97,0
Heksanal	66-25-1	Sigma Aldrich	98,0
2-heptanon	110-43-0	Merck	98,0
Heptanal	111-71-7	Sigma Aldrich	AS*
2-metil butanal	96-17-3	Sigma Aldrich	AS*
3-metil butanal	590-86-3	Acros Organics	98,0

*AS – analitički standard

U svrhu određivanja linearnog retencijskog indeksa ciljanih spojeva analizirana je otopina alkana C₈-C₂₀ u heksanu, približne koncentracije svakog alkana 40 mgL⁻¹ (Sigma Aldrich).

3.1.3. Bezglutenski kruh

Uzorci bezglutenskog kruha proizvedeni su u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo od slijedećih sirovina:

- 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

3.2. METODE RADA

Cilj ovog istraživanja bio je najprije optimizirati uvjete mikroekstrakcije, a zatim pri tim optimiziranim uvjetima provesti validaciju metode.

3.2.1. Eksperimentalni uvjeti

„Headspace“ mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Vrijeme uravnoteženja: 5 min

Brzina miješanja: 7

Uzorak: 0,2500 g bezglutenskog kruha

Otopina soli: 20% (m/V), pH = 3 (prilagođen 0,05 M limunskom kiselinom)

GC

Injektor:

Temperatura 260°C

Vrijeme desorpcije: 5 min

Protok plina: 50 mL/min

Uvjeti injektora: Splitless

Čišćenje vlakna nakon desorpcije: 2 min

Pećnica:

Temperaturni program

40°C, održavanje 3 min

2°C/min do 105°C

5°C/min do 130°C

10°C/min do 230°C, održavanje 5 min

Trajanje analize: 55 min

Protok helija: 1 mLmin⁻¹

MS detektor

Temperatura MS Source: 230°C

Temperatura MS Quadrupole: 150°C

Temperatura Transfer line: 280°C

Raspon omjera masa i naboja za detekciju: 35-350 amu

Uvjeti detekcije: TIC

3.2.2. Priprema 20% otopine NaCl

Otopina soli pripremljena je vaganjem 10,0000 g NaCl-a \pm 0,0001 g koji je zatim otopljen u 35 mL demineralizirane vode. Dobivenoj otopini prilagođen je pH na 3 pomoću 0,05 M otopine limunske kiseline. Nakon prilagodbe pH, otopini je dodana demineralizirana voda do ukupnog volumena vode od 40 mL. Otopina soli pripremljena je svakodnevno kako bi bila svježja.

3.2.3. Priprema otopine za analizu

Odvagano je 0,2500 g uzorka bezglutenskog kruha s točnošću \pm 0,0001 u staklenu vialicu od 20 mL. U uzorak je dodano 10 μ L internog standarda 1-butanola koncentracije 0,9455 mg/mL te određeni volumen otopine standarda, ovisno o željenoj koncentraciji. Zatim je dodana 20% otopina NaCl do ukupnog volumena koji je iznosio 5 mL.

3.2.4. Tijek analize

Nakon što je uzorak pripremljen, u vialicu je stavljen magnet i začepljena je. Potom je vialica stavljena u termoblok na uravnoteženje, a nakon toga je slijedila mikroekstrakcija pri određenoj temperaturi i vremenu provođenja analize. Provedenom analizom dobiven je kromatogram koji se dalje korišten prilikom obrade podataka.

3.2.5. Linearni retencijski indeks

Provedena je analiza otopine alkana i otopine standarda ciljanih spojeva. Iz dobivenih kromatograma je očitano retencijsko vrijeme (RT) svakog ciljanog spoja. Iz tih podataka je izračunat linearni retencijski indeks (LRI). Jednadžba prema kojoj se izračuna LRI spoja x glasi:

$$LRI(x) = 100 * z + 100 * ((RT(x) - RT(z)) / (RT(z+1) - RT(z))) \quad (1)$$

pri čemu 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 (Bianchi i sur., 2007). Usporedbom dobivenog LRI i LRI iz literature, izražava se vrijednost ΔK .

3.2.6. Optimizacija metode

Prilikom optimizacije u uzorak je dodavana otopina standarda koja je sadržavala sve ciljane spojeve i otopina internog standarda radi eliminacije utjecaja matriksa. Plan prema kojem je optimizacija provedena je uključivao mikroekstrakciju na temperaturama 60°C, 50°C i 40°C te vrijeme provođenja ekstrakcije od 30, 45 i 60 minuta. Analiza je provedena u dva ponavljanja pri svakom od definiranih uvjeta ekstrakcije.

Nakon provedene analize su iz dobivenih kromatograma očitane površine svakog pojedinog spoja pri svakom od uvjeta optimizacije. Površine analita očitane iz kromatograma korigirane su s površinom internog standarda (1-butanol) te su izračunate srednje vrijednosti korigiranih površina. Obradom tih podataka bilo je potrebno usporediti zbroj površina svih ciljanih spojeva i detektirati koji su uvjeti mikroekstrakcije optimalni. Kako različite koncentracije pojedinih spojeva ne bi utjecale na donošenje pogrešnog zaključka u procesu optimizacije ekstrakcije, rezultati su izraženi i u obliku postotka odziva pojedinog spoja pri svakom od uvjeta ekstrakcije u odnosu na njihov odziv pri uvjetima 60°C, 60 minuta.

3.2.7. Validacija metode

Provedena je validacija metode za određivanje aldehida i ketona u bezglutenskom kruhu pomoću metode „headspace“ mikroekstrakcije na čvrstoj fazi i plinske kromatografije uz maseni detektor, pri određenim optimalnim uvjetima ekstrakcije. Validacija je provedena uz uvjete mikroekstrakcije na temperaturi od 60°C i pri vremenu od 60 minuta. U svrhu validacije metode, ispitana je selektivnost, linearnost, preciznost (ponovljivost, intermedijarna preciznost), granica detekcije i granica kvantifikacije.

3.2.7.1. Selektivnost

Selektivnost metode određena je pregledom kromatograma ciljanog iona („target“ ion) i kvalifikacijskih iona (ion „qualifier“) koji su korišteni za identifikaciju i kvantifikaciju svakog pojedinog spoja. Ciljani ion je karakteristika ključnog spoja prema kojoj se taj spoj razlikuje od bilo kojeg drugog spoja sa sličnim retencijskim vremenom te se na temelju njega navedeni spoj kvantificira, dok su kvalifikacijski ioni alat za identifikaciju ciljanog spoja. Prisutnost tih iona u pravilnom omjeru s ciljanim ionom je dokaz o ispravnoj identifikaciji željenog spoja (Lesueur i sur., 2008). U tablici 4. prikazani su svi ciljani i kvalifikacijski ioni i određivanih spojeva.

Tablica 4. Popis spojeva s ciljanim ionom i kvalifikacijskim ionima

Spoj	Ciljani ion (m/z)	Kvalifikacijski ioni (m/z)
Pentanal	44	58, 41, 57
2-oktanon	58	43, 71, 59
Oktanal	43	57, 84, 69
6-metil-5-hepten-2-on	43	41, 55, 69
Nonanal	57	41, 56, 98
3-furaldehid	95	96, 39, 67
Furfural	96	95, 39
Dekanal	57	43, 70, 82
2-nonenal, trans	70	55, 83, 41
Benzacetaldehid	91	120, 65, 92
2,4-dekadienal, trans,trans	81	41, 67, 83
2-butanon	43	72, 57
Butan-2,3-dion	43	86, 42
2,3-prentandion	43	57, 100
Heksanal	56	44, 57, 72
2-heptanon	43	58, 71, 114
Heptanal	70	55, 57, 71
2-metil butanal	57	41, 58, 86
3-metil butanal	44	58, 43, 57

3.2.7.2. *Linearnost*

Linearnost metode izražena je baždarnim dijagramom koji opisuje odnos između koncentracije i odziva određenog spoja. Pri određivanju linearnosti primijenjena je metoda dodatka standarda, radi prisutnog utjecaja matriksa uzorka. Provedena je analiza ciljanih spojeva na 11 koncentracijskih razina, uz minimalno tri ponavljanja mjerenja. Budući da je uzorak sam po sebi sadržavao neke od ciljanih spojeva, pri izradi baždarnog dijagrama je provedena potrebna korekcija, odnosno oduzet je prisutan odziv ciljanog spoja porijeklom iz uzorka. Odziv odnosno površina određenog spoja je korigirana s površinom internog standarda, 1-butanola i izračunata je srednja vrijednost površine pri određenoj koncentraciji. Sve koncentracijske razine izražene su u obliku $\mu\text{g}/\text{kg}$ kruha. Obradom podataka određen je raspon koncentracija pojedinog spoja u kojem je utvrđen linearan odnos odziva detektora i koncentracije spoja. Prikazana je jednadžba regresijskog pravca, njegov nagib i odsječak na osi y. Osim toga, iz baždarnog su dijagrama određeni i koeficijent determinacije (R^2) te koeficijent korelacije (r). Vrijednost koeficijenta korelacije od 0 do 1 označava pozitivnu korelaciju, sukladan rast vrijednosti odziva i koncentracije na dijagramu, odnosno linearnu povezanost. Prilikom određivanja linearnosti, izračunat je i parametar iskorištenja, prema jednadžbi:

$$\text{Iskorištenje (\%)} = c(E) / c(T) * 100 \quad (2)$$

pri čemu je $c(E)$ eksperimentalna koncentracija očitana iz baždarnog dijagrama, a $c(T)$ teorijska koncentracija ciljanog spoja.

3.2.7.3. *Preciznost*

Prilikom obrade rezultata određena je ponovljivost i intermedijarna preciznost metode. Ponovljivost metode određena je višestrukim ispitivanjem iste otopine kalibracijskih standarda dodanih u uzorak pri čemu su mjerenja provedena u istom danu, s ciljem određivanja varijabilnost odziva instrumenta. Obradeni su rezultati mjerenja na jedanaest koncentracijskih razina u četiri ponavljanja, a prikazani su rezultati samo za koncentracije uključene u baždarni dijagram. Izračunata je srednja vrijednost i relativna standardna devijacija vrijednosti površina. Intermedijarna preciznost određena je ispitivanjem otopina kalibracijskih standarda dodanih u uzorak na tri koncentracijske razine u tri ponavljanja, uz različite dane analize kao dodatan faktor varijabilnosti.

3.2.7.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Standardna pogreška y-osi može se primijeniti za procjenu granice detekcije (LOD, engl. *Limit of detection*) i granice kvantifikacije (LOQ, engl. *Limit of quantitation*) po ICH smjernicama. Granice detekcije i kvantifikacije izračunate su prema sljedećim jednadžbama:

$$\text{Granica detekcije} = 3,3 * \sigma / S \quad (3)$$

$$\text{Granica kvantifikacije} = 10 * \sigma / S \quad (4)$$

pri čemu je σ standardna pogreška omjera odziva ciljanog spoja i internog standarda, a S nagib pravca (ICH, 2005).

3.2.8. Analiza i obrada podataka

Svi podaci obrađeni su u programu MS Excel 2007.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je optimizacija i validacija HS-SPME/GC-MS metode za određivanje aromatskog profila kruha, točnije aldehida i ketona.

Izračunati su linearni retencijski indeksi za svaki pojedini spoj te je prikazana njihova usporedba s literaturom (tablica 5.).

U ovom radu ispitano je pri kojoj temperaturi i pri kojem vremenu je optimalno provoditi mikroekstrakciju, a rezultati su prikazani za slikama 1. i 2.

U svrhu validacije, određeni su sljedeći parametri metode: selektivnost, linearnost, preciznost, granica detekcije i granica kvantifikacije.

Parametar selektivnosti prikazan je kromatogramima, od slike 3. do slike 21.

Linearnost je izražena baždarnim dijagramima koji su prikazani na slikama 22. do 40. Prikazana je jednadžba regresijskog pravca, koeficijenti korelacije i determinacije za svaki od ciljanih spojeva. Rezultati određivanja iskorištenja prikazani su od tablice 6. do tablice 24.

Preciznost metode obuhvatila je mjerenje ponovljivosti i intermedijarne preciznosti. Ponovljivost za svaki pojedini spoj je prikazana od tablice 6. do tablice 24., a intermedijarna preciznost prikazana je u tablici 25.

Granice detekcije i kvantifikacije određene su kako bi mogli odrediti je li metoda osjetljiva, a rezultati su prikazani u tablici 26.

4.1. LINEARNI RETENCIJSKI INDEKSI

Tablica 5. prikazuje retencijska vremena te izračunate linearne retencijske indekse (LRI) za svaki pojedini spoj i njihovu usporedbu s literaturom (Bianchi i sur., 2007; Raffo i sur., 2015).

Tablica 5. Prikaz retencijskih vremena i izračun retencijskog indeksa

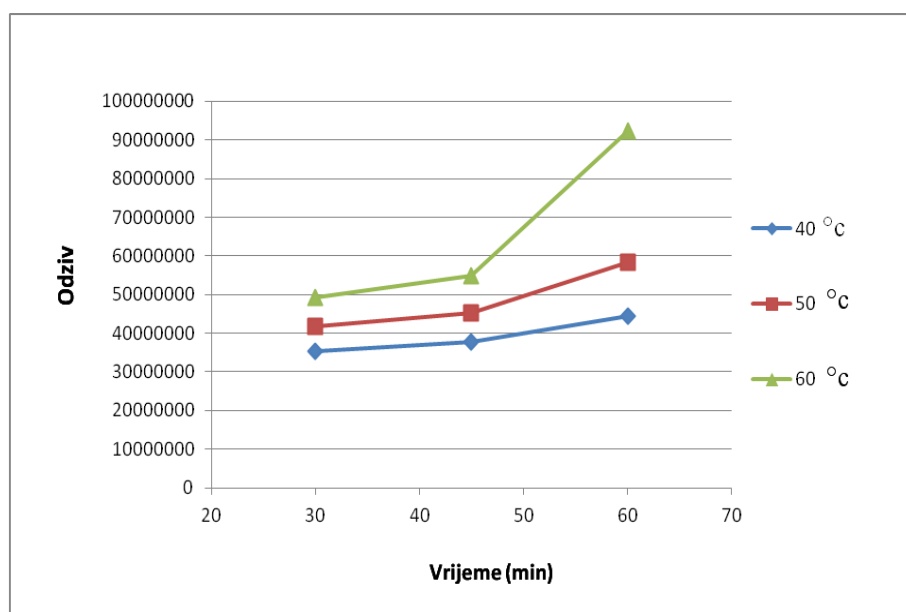
Spoj	Prosječna vrijednost RT (min)	LRI	LRI (lit.)	ΔK^*
Pentanal	4,17	978,2	977	1,2
2-oktanon	16,32	1279,4	1280	-0,6
Oktanal	16,53	1283,3	1286	-2,7
6-metil-5-hepten-2-on	19,41	1333,3	1340	-6,7
Nonanal	22,63	1388,0	1396	-8,0
3-furaldehid	25,07	1429,2	1445	-15,8
Furfural	26,97	1461,2	1474	-12,8
Dekanal	28,79	1491,9	1502	-10,1
2-nonenal, trans	30,74	1525,4	1546	-20,6
Benzacetaldehid	36,71	1636,2	-	-
2,4-dekadienal, trans,trans	42,51	1800,5	1827	-26,5
2-butanon	2,94	901,9	901	0,9
Butan-2,3-dion	4,20	980,0	986	-6,0
2,3-prentandion	6,31	1059,2	1071	-11,8
Heksanal	6,87	1077,6	1080	-2,4
2-heptanon	10,94	1176,5	1185	-8,5
Heptanal	11,03	1178,5	1186	-7,5
2-metil butanal	3,09	911,2	914	-2,8
3-metil butanal	3,15	914,7	917	-2,3

* $\Delta K = \text{LRI (lit.)} - \text{LRI}$

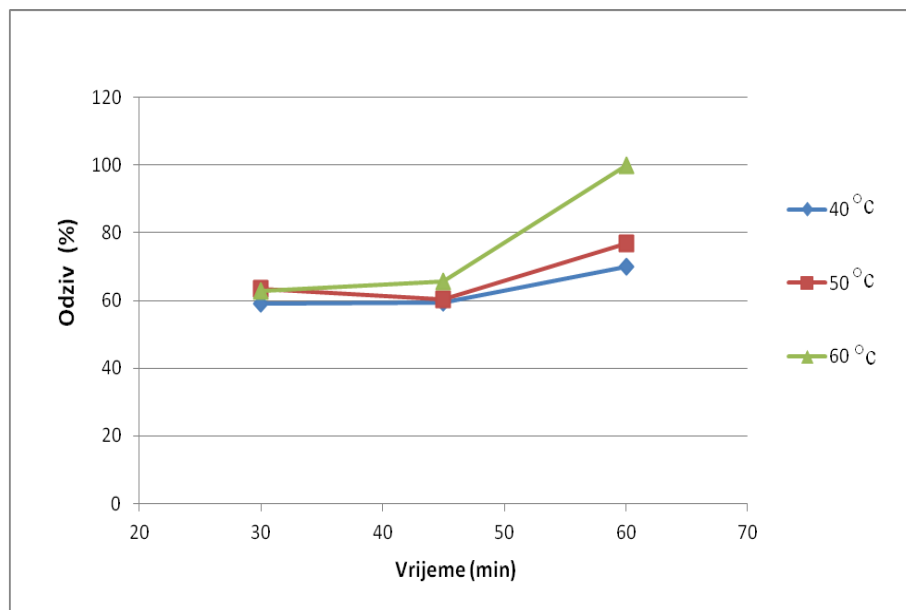
Retencijsko vrijeme je mjera vremena potrebnog da uzorak prođe kroz kromatografsku kolonu, a računa se od injektiranja uzorka u kromatograf (Chomatography Today, 2014). Kratica LRI predstavlja linearni retencijski indeks koji je izračunat prema formuli iz rada autora Bianchi i sur. (2007) i ta vrijednost predstavlja koristan način za identifikaciju spojeva. Dobiveni retencijski indeksi uspoređeni su s literaturom te se prema vrijednosti ΔK mogu vidjeti odstupanja izračunatog LRI od LRI iz literature. Ona su se nalazila u rasponu od -26, 5 do 1,2. Na različite vrijednosti dobivenih retencijskih vremena utječe niz parametara kao što je protok plina, temperaturne razlike, dužina kolone i slično pa se i LRI razlikuje u različitim literaturnim navodima (Milman, 2005).

4.2. OPTIMIZACIJA METODE

Rezultati provođenja mikroekstrakcije pri različitim uvjetima prikazani su na slici 1. i slici 2.



Slika 1. Grafički prikaz ovisnosti odziva (površine) svih analiziranih spojeva o vremenu trajanja i temperaturi ekstrakcije



Slika 2. Grafički prikaz relativnog odziva (površine) svih analiziranih spojeva pri različitom vremenu trajanja i temperaturi ekstrakcije u odnosu na njihov odziv pri uvjetima 60 °C, 60 minuta

U svrhu optimizacije uvjeta mikroekstrakcije provedena su mjerenja pri različitim temperaturama i vremenima ekstrakcije. Analiza pri svakom od uvjeta provedena je u dva uzastopna ponavljanja. Budući da se koncentracija pojedinih standarda korištenih za optimizaciju metode razlikovala, kako bi se eliminirao utjecaj razlike u koncentraciji spojeva su rezultati provedene optimizacije prikazani kao zbroj postotaka odziva svakog od spojeva pri svim ispitanim uvjetima mikroekstrakcije, u odnosu na mikroekstrakciju pri 60°C, u trajanju od 60 minuta (slika 2.). Prema dobivenim rezultatima se ukupni odziv ciljanih spojeva nije značajno razlikovao pri ekstrakciji u trajanju od 30 i 45 minuta, pri svim primijenjenim temperaturama ekstrakcije. Pri vremenu ekstrakcije od 60 minuta utvrđena je značajna razlika u ukupnom odzivu ciljanih spojeva, u odnosu na kraće vrijeme ekstrakcije i ovisno o primijenjenoj temperaturi. Mikroekstrakcija pri temperaturi 60°C i trajanju 60 minuta rezultirala je najvećim ukupnim odzivom ciljanih spojeva (slika 2.). Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da je optimalno provoditi ekstrakciju pri temperaturi od 60°C i trajanju od 60 minuta.

Raffo i suradnici (2015) u svojem su istraživanju prikazali metodu za određivanje hlapljivih spojeva iz kore i sredine kruha uz pomoć „headspace“ mikroekstrakcije na čvrstoj fazi u kombinaciji s plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (HS-SPME/GC-

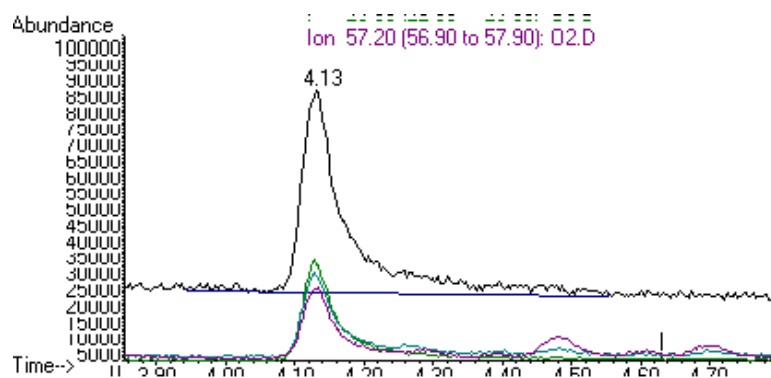
MS). Polazna točka te studije bila je studija Ruiza i suradnika (2003) koja je bila usmjerena na analizu isključivo sredine kruha pa u tom istraživanju nisu uzeti u obzir spojevi koji nastaju u kori kruha (Ruiz i sur., 2003).

U tom istraživanju također je ispitano temperaturno područje od 40 do 60 °C, a dobiveni rezultati ukazali su da je učinak temperature bio različit za različite vrste hlapljivih spojeva. Osim toga, određivano je i vrijeme koje je potrebno da se spojevi ekstrahiraju u maksimalnim količinama. Nakon procjene rezultata, uvjeti temperature od 50°C i vrijeme od 60 minuta su odabrani za nastavak procesa optimizacije (Ruiz i sur., 2003).

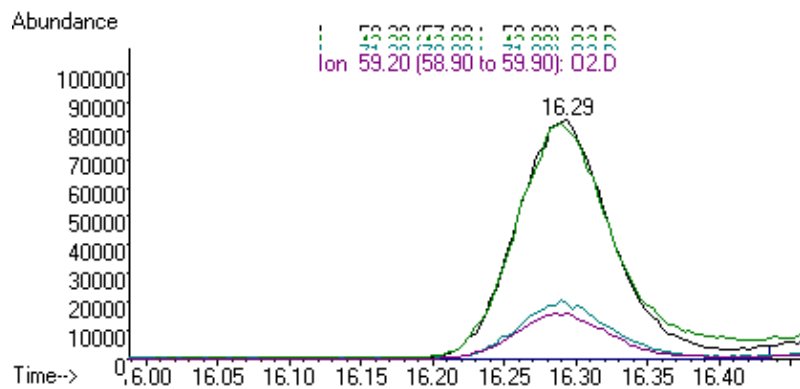
4.3. VALIDACIJA METODE

4.3.1. Selektivnost

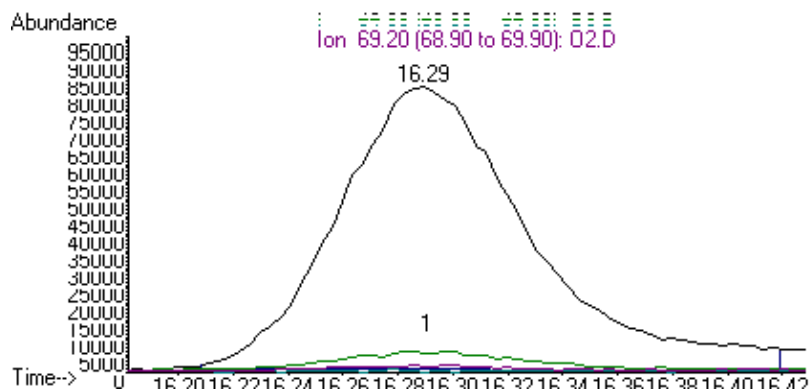
Od slike 3. do slike 21. nalaze se grafički prikazi kromatograma pojedinih spojeva.



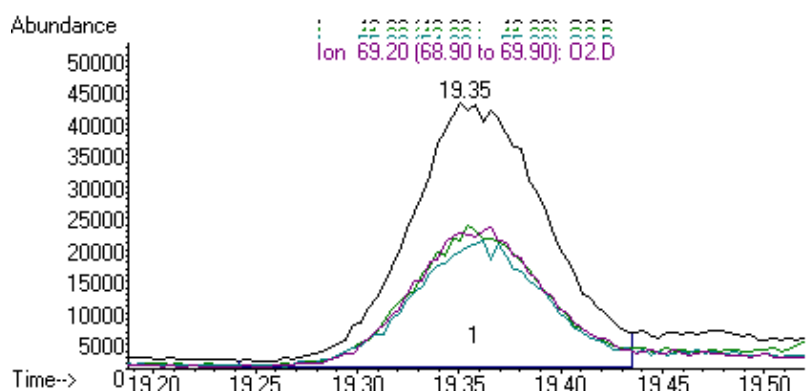
Slika 3. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za pentanal



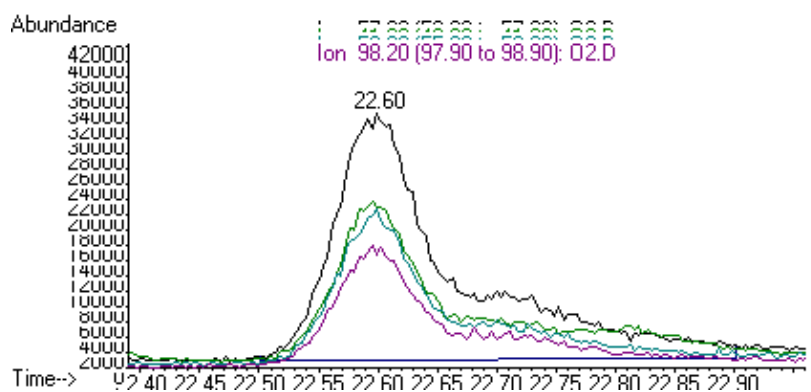
Slika 4. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-oktanon



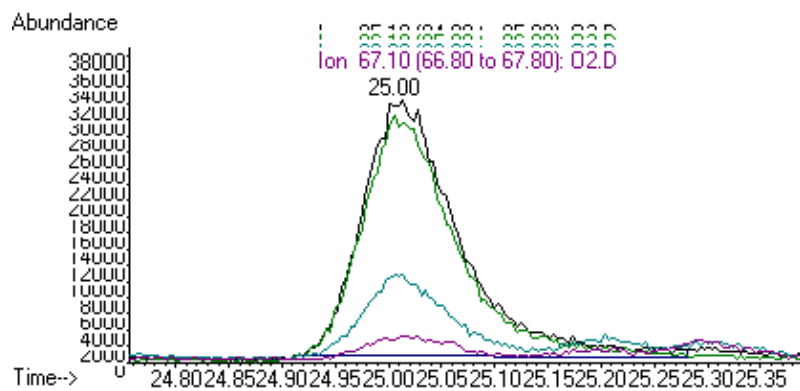
Slika 5. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za oktanal



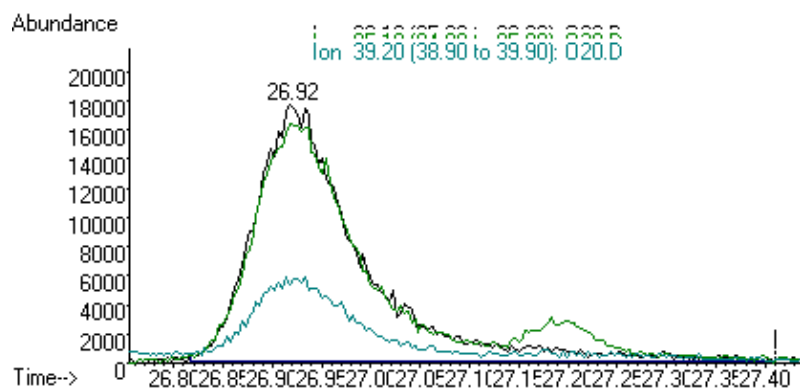
Slika 6. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 6-metil-5-hepten-2-on



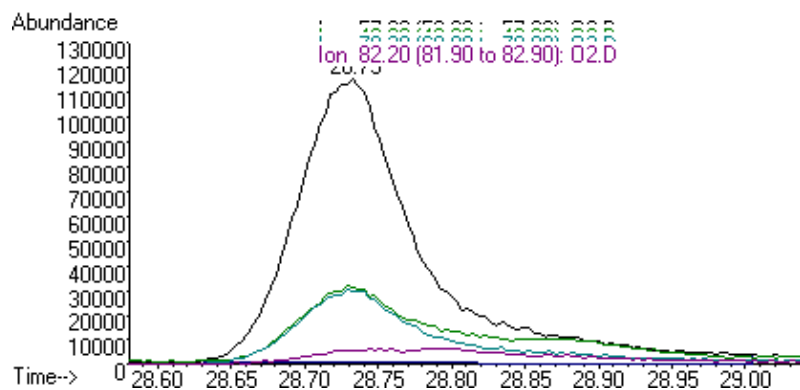
Slika 7. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za nonanal



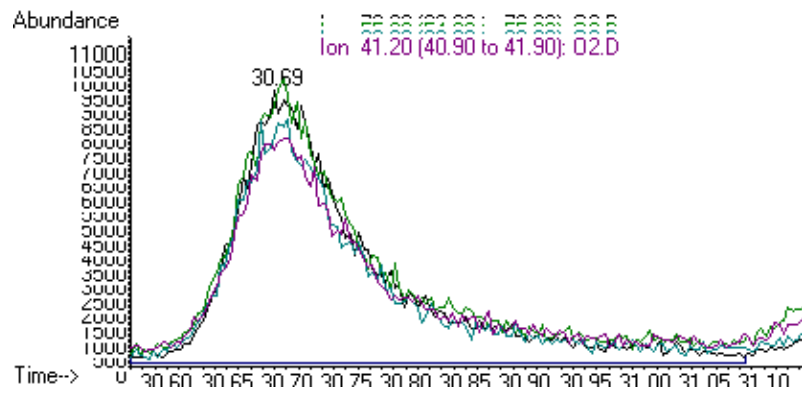
Slika 8. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 3-furaldehid



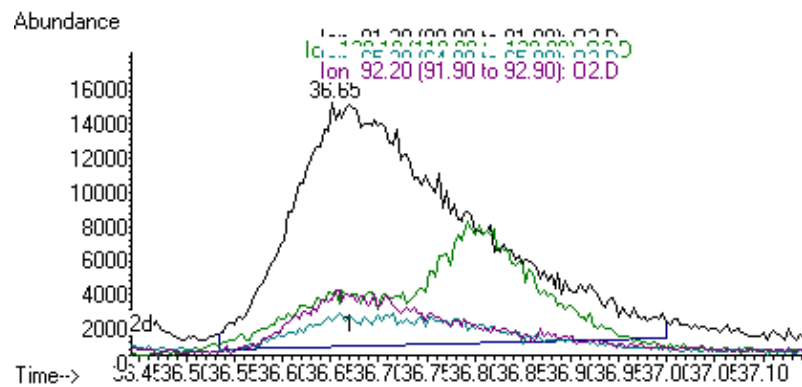
Slika 9. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za furfural



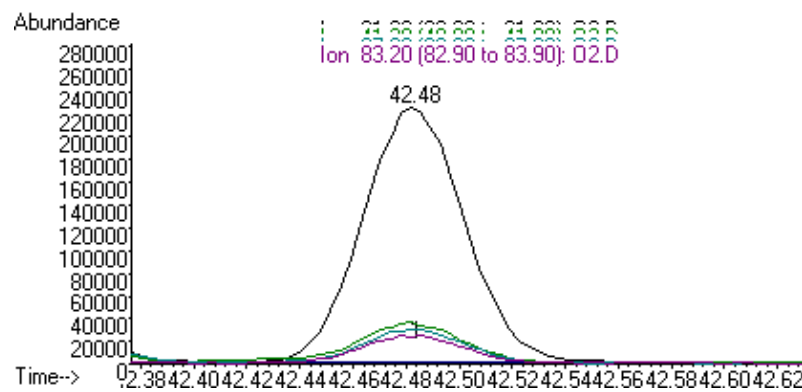
Slika 10. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za dekanal



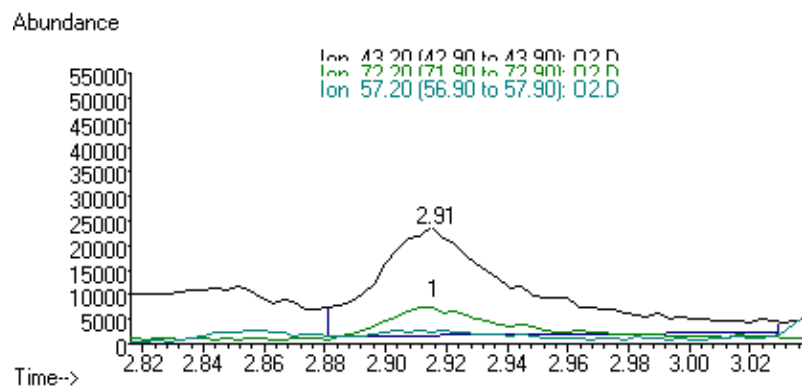
Slika 11. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-nonenal, trans



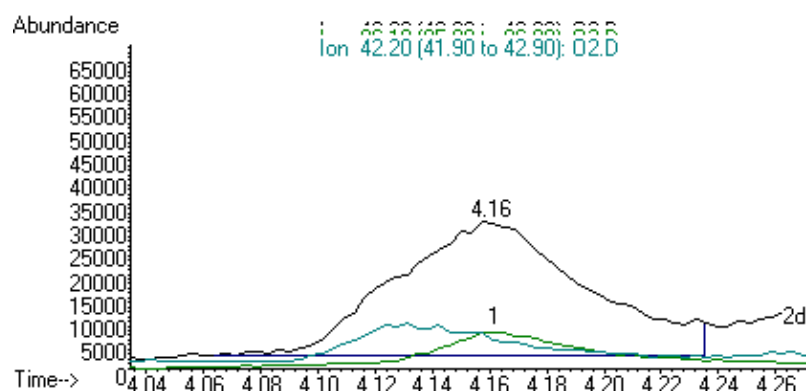
Slika 12. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za benzacetaldehid



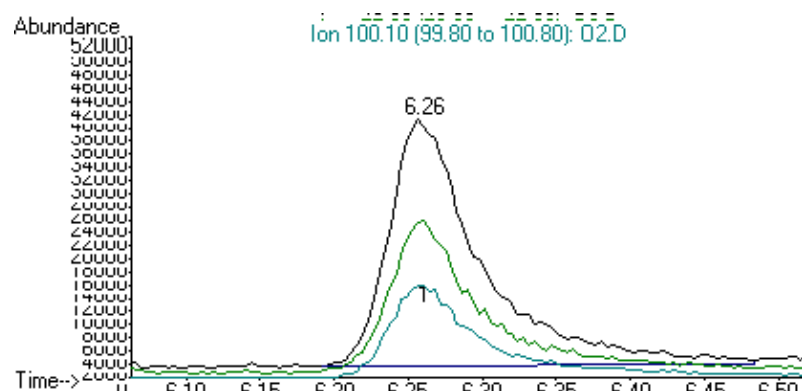
Slika 13. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2,4-dekadienal, trans, trans



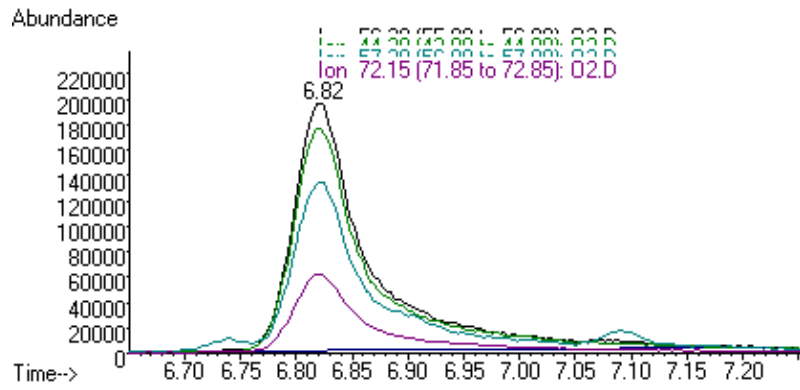
Slika 14. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-butanon



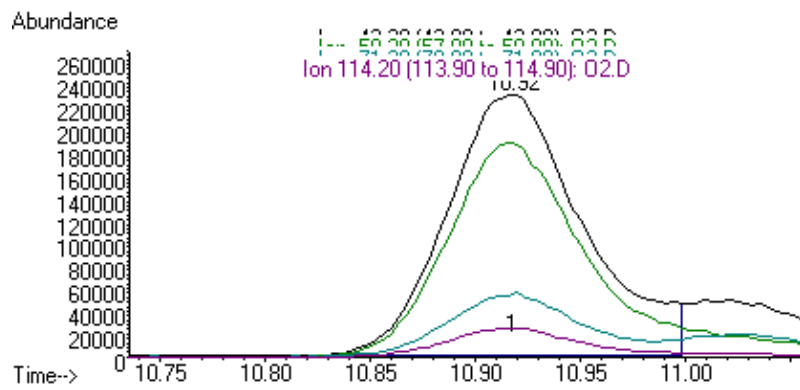
Slika 15. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za butan-2,3-dion



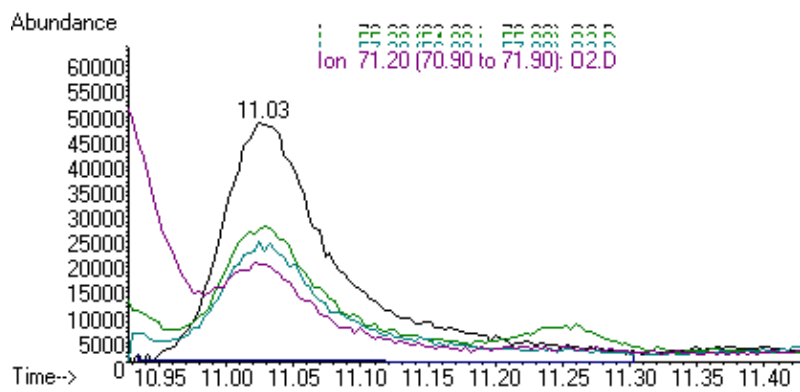
Slika 16. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2,3-pentandion



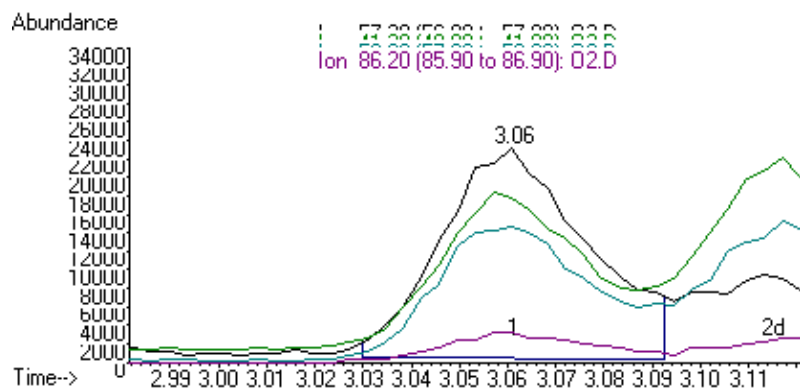
Slika 17. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za heksanal



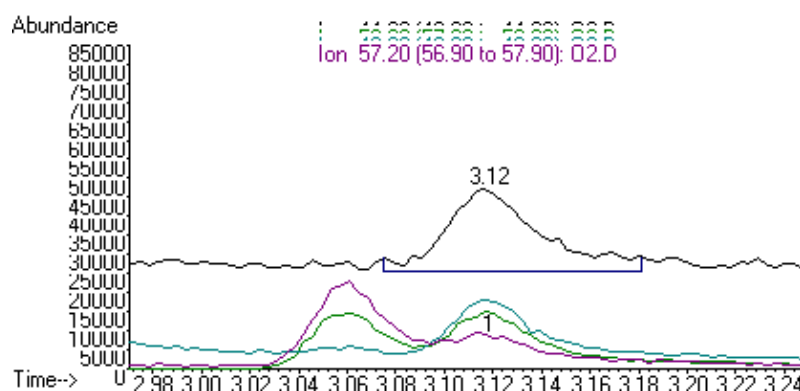
Slika 18. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-heptanon



Slika 19. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za heptanal



Slika 20. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 2-metil butanal



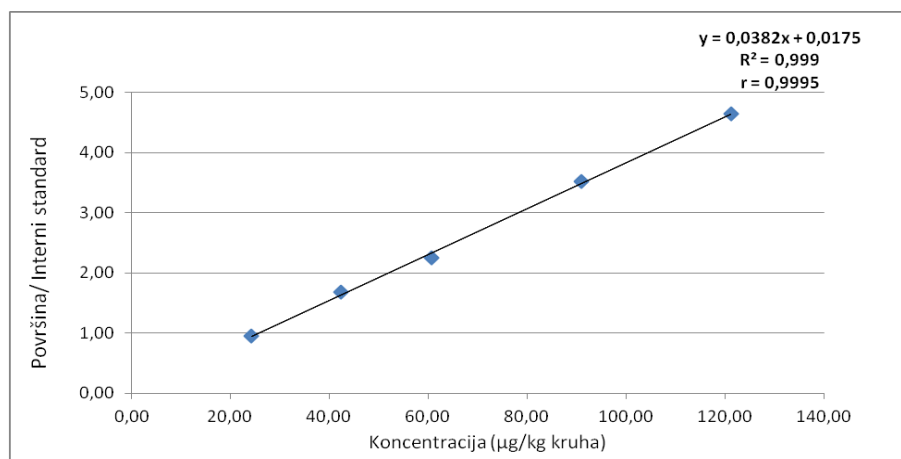
Slika 21. Kromatogram ciljanog i kvalifikacijskih iona za 3-metil butanal

Karakteristika kromatograma je izdvajanje iona u obliku pika, a površina ispod pika proporcionalna je koncentraciji određenog spoja. Ciljani ion prikazan je crnom linijom na slikama 3. do 21. i on je osnovni ion prema kojem se provodi kvantifikacija, dok su kvalifikacijski ioni prikazani plavom, zelenom i rozom linijom. Prikazani kromatogrami dokazuju da se primijenjenom metodom svaki od ciljanih analita razdvaja od ostalih prisutnih spojeva, što potvrđuje selektivnost metode.

4.3.2. Linearnost

Slike od broja 22. do 40. grafički prikazuju ovisnost površine o koncentraciji određenog spoja. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja prikazani su od tablice 6. do tablice 24.

U svrhu ispitivanja linearnosti provedeno je mjerenje na jedanaest koncentracijskih razina u četiri uzastopna ponavljanja, a obradom podataka odabrane su one koncentracije koje su zadovoljile parametar linearnosti.



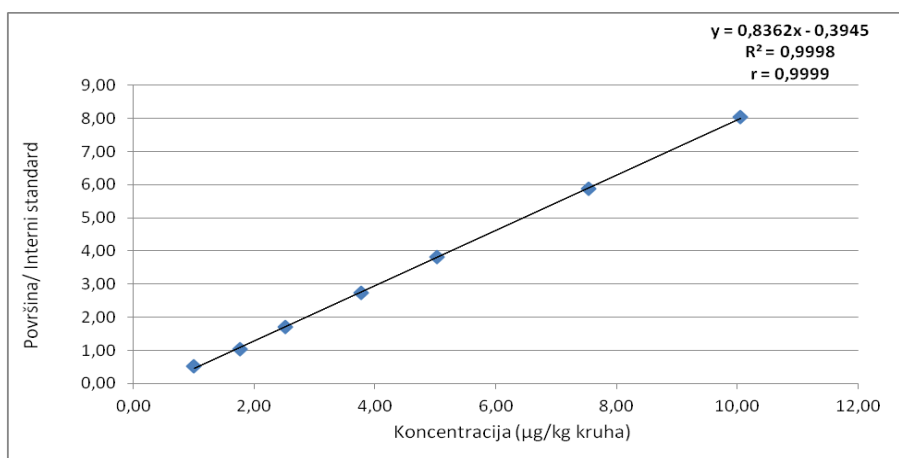
Slika 22. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji pentanala

Tablica 6. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za pentanal

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
24,250	0,9433	3,1	100,1
42,438	1,6816	6,3	97,4
60,625	2,2557	6,7	103,5
90,938	3,5254	1,4	99,0
121,250	4,6410	9,1	100,2

Na slici 22. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za pentanal i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za pentanal bilo je u rasponu koncentracija od 24,250 do 121,250 µg/kg kruha (tablica 6.). Iskorištenje pri određivanju pentanala se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 97,4 do 103,5 % (tablica 6.) sa srednjom vrijednošću od 100,0 %. Relativna standardna

devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji pentanala kretala u rasponu od 1,4 do 9,1 % (tablica 6.) sa srednjom vrijednošću od 5,3%.

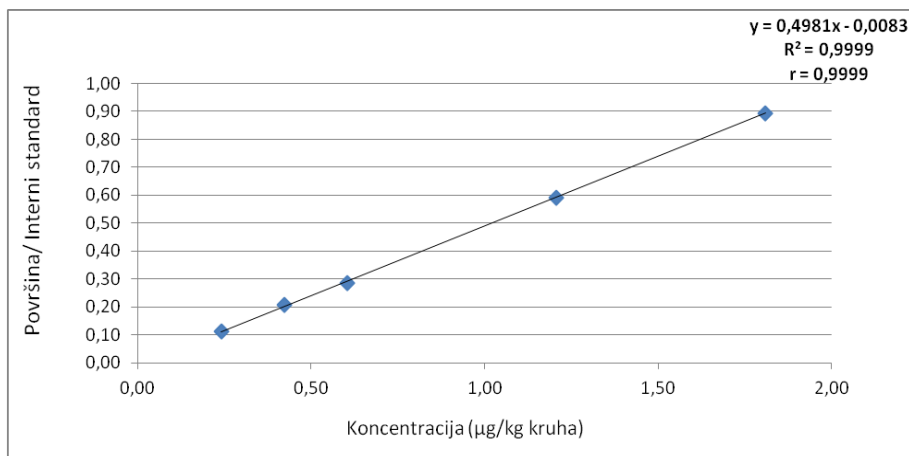


Slika 23. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 2-oktanona

Tablica 7. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 2-oktanon

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
1,005	0,5117	7,7	92,7
1,758	1,0327	8,9	103,0
2,512	1,7074	5,9	99,9
3,768	2,7245	1,4	101,0
5,024	3,8095	10,5	99,9
7,536	5,8825	2,7	100,4
10,049	8,0374	8,1	99,7

Na slici 23. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 2-oktanon i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 2-oktanon bilo je u rasponu koncentracija od 1,005 do 10,049 µg/kg kruha (tablica 7.). Iskorištenje pri određivanju 2-oktanona se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 92,7 do 103,0 % (tablica 7.) sa srednjom vrijednošću od 99,5%. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 2-oktanona kretala u rasponu od 2,7 do 10,5 % (tablica 7.) sa srednjom vrijednošću od 6,4%.

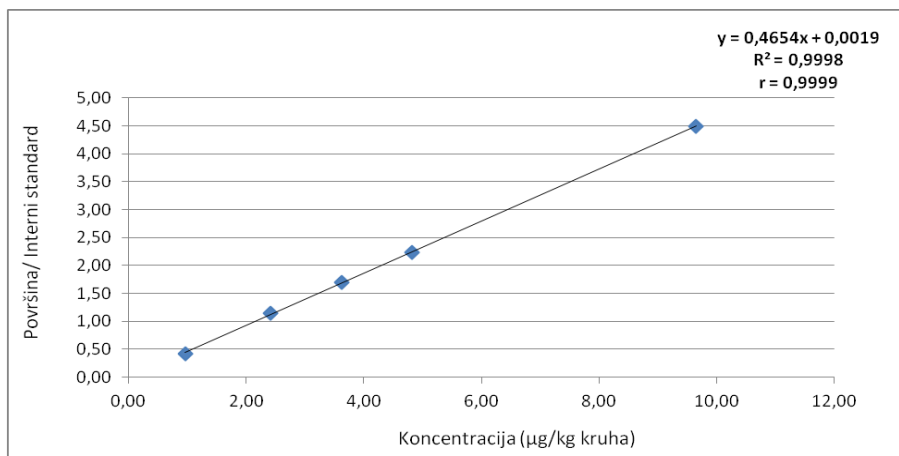


Slika 24. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji oktanal

Tablica 8. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za oktanal

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
0,241	0,1122	0,6	99,8
0,422	0,2068	2,5	97,8
0,603	0,2868	1,3	101,8
1,207	0,5920	1,9	100,1
1,810	0,8943	2,0	99,9

Na slici 24. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za oktanal i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za oktanal bilo je u rasponu koncentracija od 0,241 do 1,810 µg/kg kruha (tablica 8.). Iskorištenje pri određivanju oktanal se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 97,8 do 101,8 % (tablica 8.) sa srednjom vrijednošću od 99,9%. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji oktanal kretala u rasponu od 0,6 do 2,5 % (tablica 8.) sa srednjom vrijednošću od 1,7%.

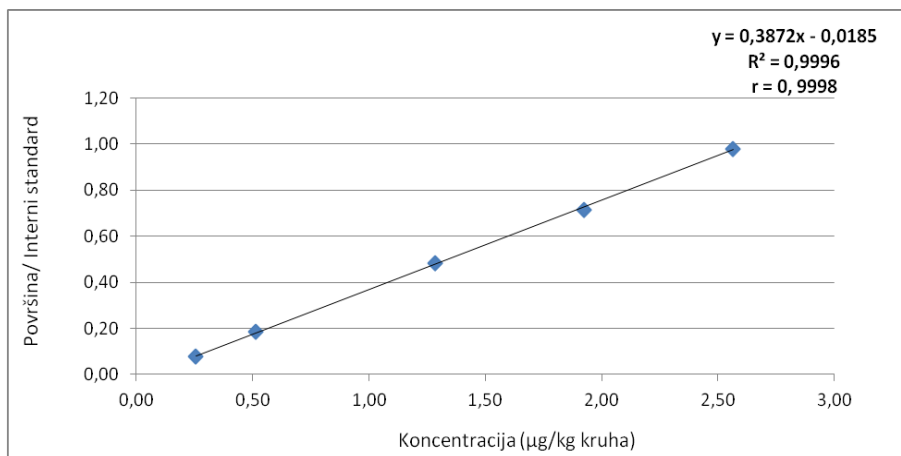


Slika 25. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 6-metil-5-hepten-2-ona

Tablica 9. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 6-metil-5-hepten-2-on

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
0,965	0,4274	2,7	105,6
2,413	1,1492	3,2	97,9
3,620	1,7047	4,9	98,9
4,826	2,2321	10,3	100,7
9,653	4,4920	3,6	100,0

Na slici 25. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 6-metil-5-hepten-2-on i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 6-metil-5-hepten-2-on bilo je u rasponu koncentracija od 0,965 do 9,653 µg/kg kruha (tablica 9.). Iskorištenje pri određivanju 6-metil-5-hepten-2-ona se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 97,9 do 105,6 % (tablica 9.) sa srednjom vrijednošću od 100,6 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 6-metil-5-hepten-2-ona kretala u rasponu od 2,7 do 10,3 % (tablica 9.) sa srednjom vrijednošću od 4,9 %.

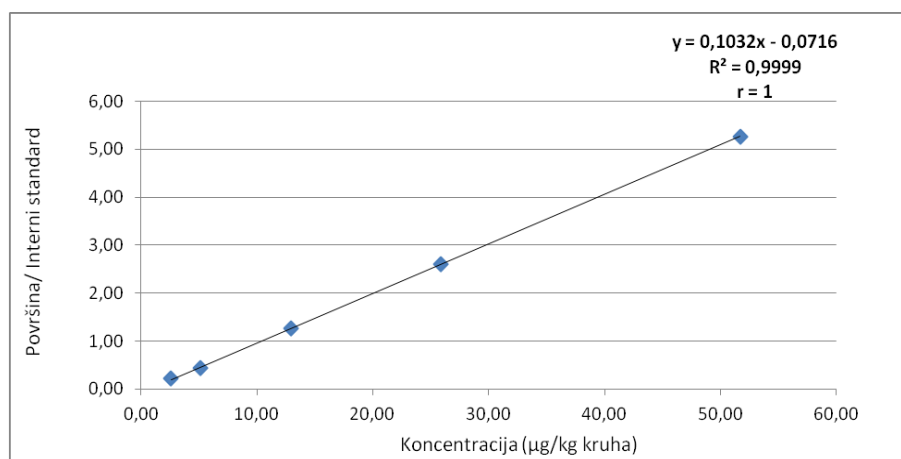


Slika 26. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji nonanala

Tablica 10. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za nonanal

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
0,257	0,0780	3,5	103,0
0,513	0,1847	9,1	97,8
1,283	0,4817	8,9	99,3
1,924	0,7155	13,5	101,5
2,565	0,9806	11,7	99,4

Na slici 26. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za nonanal i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za nonanal bilo je u rasponu koncentracija od 0,257 do 2,565 µg/kg kruha (tablica 10.). Iskorištenje pri određivanju nonanala se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 97,8 do 103,0 % (tablica 10.) sa srednjom vrijednošću od 100,2 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji nonanala kretala u rasponu od 3,5 do 13,5 % (tablica 10.) sa srednjom vrijednošću od 9,4 %.

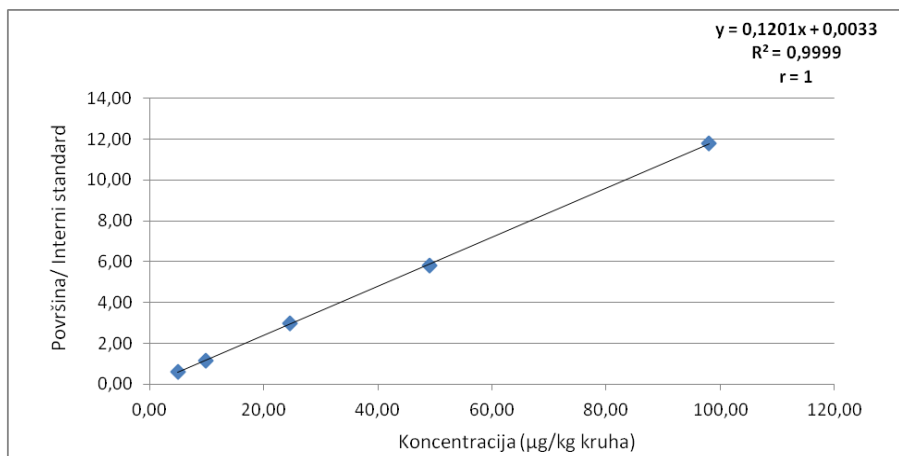


Slika 27. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 3-furaldehida

Tablica 11. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 3-furaldehid

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
2,585	0,2112	5,8	94,3
5,170	0,4339	9,0	105,5
12,924	1,2706	9,9	99,4
25,848	2,6042	7,6	99,7
51,695	5,2601	4,8	100,1

Na slici 27. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 3-furaldehid i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 3-furaldehid bilo je u rasponu koncentracija od 2,585 do 51,695 µg/kg kruha (tablica 11.). Iskorištenje pri određivanju 3-furaldehida se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 94,3 do 105,5 % (tablica 11.) sa srednjom vrijednošću od 99,8 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 3-furaldehida kretala u rasponu od 4,8 do 9,9 % (tablica 11.) sa srednjom vrijednošću od 7,4 %.

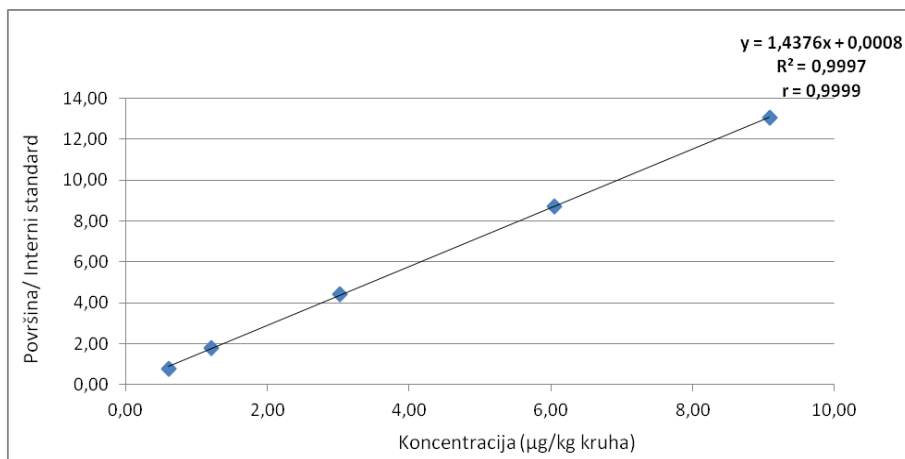


Slika 28. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji furfurala

Tablica 12. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za furfural

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
4,901	0,6160	4,9	96,1
9,801	1,1719	8,6	100,7
24,503	2,9682	6,1	99,3
49,005	5,8292	5,1	101,0
98,010	11,8034	2,2	99,8

Na slici 28. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za furfural i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za furfural bilo je u rasponu koncentracija od 4,901 do 98,010 µg/kg kruha (tablica 12.). Iskorištenje pri određivanju furfurala se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 96,1 do 101,0 % (tablica 12.) sa srednjom vrijednošću od 99,4 %. Iskorištenje za furfural koje su u svojim istraživanjima utvrdili Ruiz i suradnici (2003) iznosilo je od 111 do 116 % za jednu vrstu kruha te 145 do 168 % za drugu vrstu kruha. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji furfurala kretalo u rasponu od 2,2 do 8,6 % (tablica 12.) sa srednjom vrijednošću od 5,4 %.

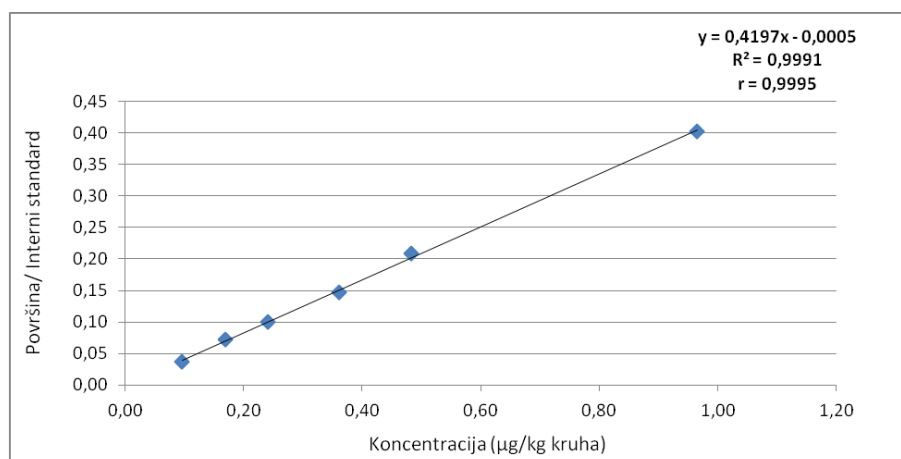


Slika 29. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji dekanala

Tablica 13. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za dekanal

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
0,606	0,7524	14,3	115,8
1,211	1,8089	1,5	96,3
3,028	4,4396	1,6	98,1
6,056	8,6967	16,8	100,1
9,084	13,0388	4,8	100,2

Na slici 29. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za dekanal i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za dekanal bilo je u rasponu koncentracija od 0,606 do 9,084 µg/kg kruha (tablica 13.). Iskorištenje pri određivanju dekanala se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 96,3 do 115,8 % (tablica 13.) sa srednjom vrijednošću od 102,1 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji dekanala kretala u rasponu od 1,5 do 16,8 % (tablica 13.) sa srednjom vrijednošću od 7,8 %.

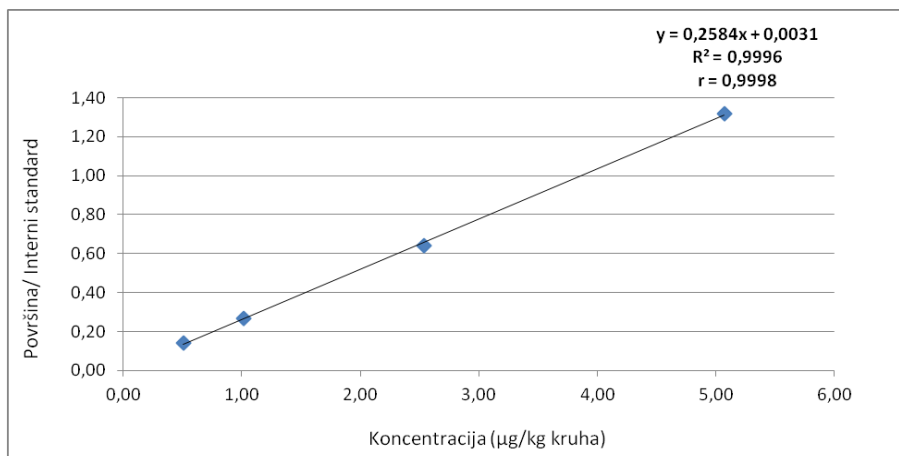


Slika 30. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 2-nonenal,trans-a

Tablica 14. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 2-nonenal,trans

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
0,097	0,0368	10,9	108,5
0,169	0,0725	16,5	97,0
0,241	0,1009	17,9	99,8
0,362	0,1473	12,9	102,7
0,483	0,2087	15,1	96,8
0,965	0,4025	8,7	100,5

Na slici 30. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 2-nonenal,trans i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 2-nonenal,trans bilo je u rasponu koncentracija od 0,097 do 0,965 µg/kg kruha (tablica 14.). Raspon koncentracija u kojem su Raffo i suradnici (2015) ispitivali linearnost za 2-nonenal,trans iznosio je od 102 do 434 µg/kg. Iskorištenje pri određivanju 2-nonenal,transa se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 96,8 do 108,5 % (tablica 14.) sa srednjom vrijednošću od 100,9 %. Iskorištenje za 2-nonenal, trans koje su u svojim istraživanjima utvrdili Ruiz i suradnici (2003) iznosilo je od 81 do 106 % za jednu vrstu kruha te 80 do 118 % za drugu vrstu kruha. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 2-nonenal, transa kretala u rasponu od 8,7 do 17,9 % (tablica 14.) sa srednjom vrijednošću od 13,7 %. Raffo i suradnici (2015) su u svojem istraživanju za spoj 2-nonenal, trans dobili rezultate ponovljivosti od 9,1 % u kori kruha te 7,2 % u cijeloj šniti kruha.

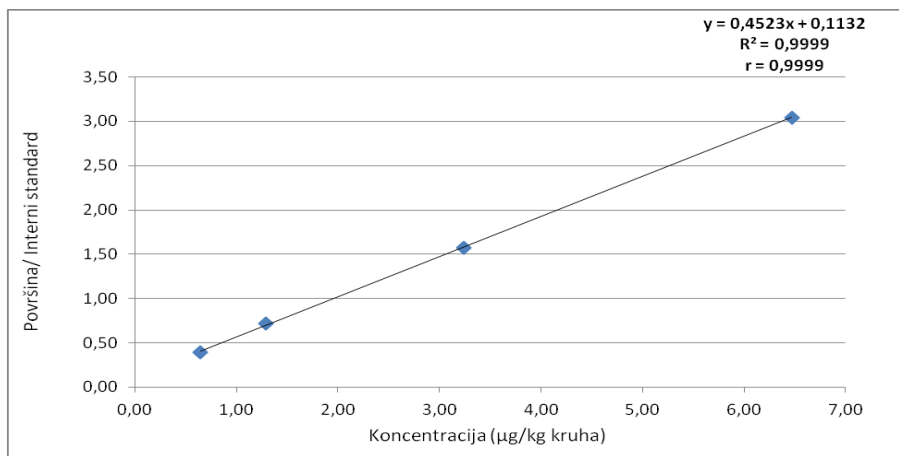


Slika 31. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji benzacetaldehida

Tablica 15. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za benzacetaldehid

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
0,507	0,1393	11,9	96,2
1,014	0,2697	5,9	98,3
2,536	0,6422	5,3	102,5
5,072	1,3204	7,2	99,5

Na slici 31. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za benzacetaldehid iznosi i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za benzacetaldehid bilo je u rasponu koncentracija od 0,507 do 5,072 µg/kg kruha (tablica 15.). Iskorištenje pri određivanju benzacetaldehida se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 96,2 do 102,5 % (tablica 15.) sa srednjom vrijednošću od 99,1 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji benzacetaldehida kretala u rasponu od 5,3 do 11,9 % (tablica 15.) sa srednjom vrijednošću od 7,6 %.

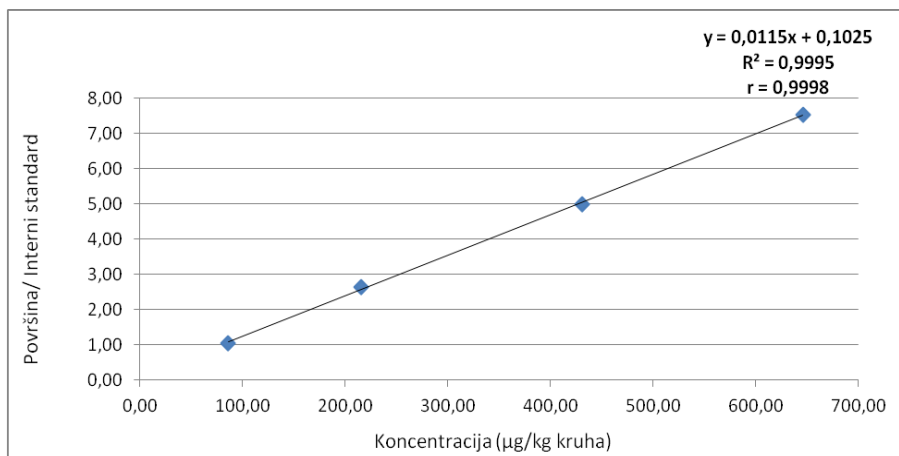


Slika 32. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 2,4-dekadienal,trans,trans-a

Tablica 16. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 2,4-dekadienal,trans,trans

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
0,647	0,3918	11,9	105,1
1,294	0,7179	16,7	96,8
3,236	1,5716	9,2	100,4
6,472	3,0409	10,1	100,0

Na slici 32. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 2,4-dekadienal, trans, trans i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 2,4-dekadienal, trans, trans bilo je u rasponu koncentracija od 0,647 do 6,472 µg/kg kruha (tablica 16.). Raspon koncentracija u kojem su Raffo i suradnici (2015) ispitivali linearnost za 2,4-dekadienal, trans, trans iznosio je od 11 do 97 µg/kg. Iskorištenje pri određivanju 2,4-dekadienal,trans,transa se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 96,8 do 105,1 % (tablica 16.) sa srednjom vrijednošću od 100,6 %. Iskorištenje za 2,4-dekadienal, trans, trans koje su u svojim istraživanjima utvrdili Ruiz i suradnici (2003) iznosilo je od 67 do 141 % za jednu vrstu kruha te 120 do 156 % za drugu vrstu kruha. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 2,4-dekadienal, trans, transa kretala u rasponu od 9,2 do 16,7 % (tablica 16.) sa srednjom vrijednošću od 12,0 %. Raffo i suradnici (2015) su u svojem istraživanju za spoj 2,4-dekadienal, trans, trans dobili rezultate ponovljivosti od 11,6 % u kori kruha te 12,9 % u cijeloj šniti kruha.

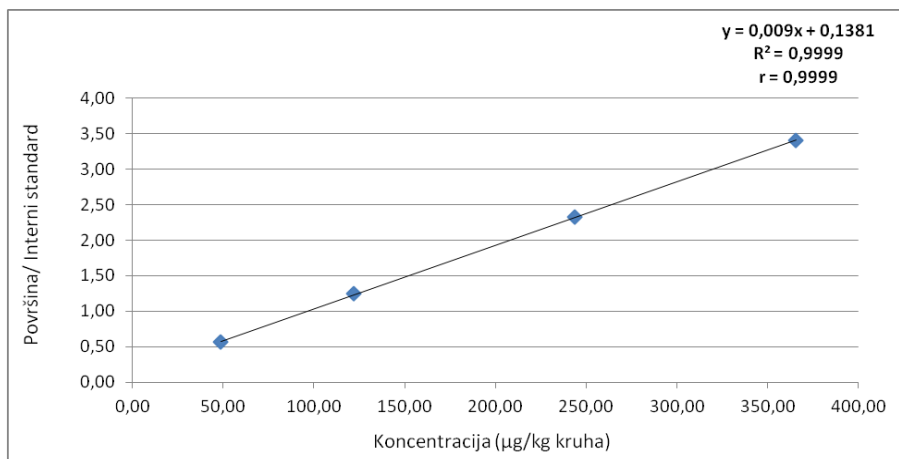


Slika 33. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 2-butanona

Tablica 17. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 2-butanon

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
86,130	1,0486	16,0	104,7
215,325	2,6502	6,8	97,2
430,650	4,9855	10,3	101,4
645,975	7,5206	3,1	100,1

Na slici 33. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 2-butanon i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 2-butanon bilo je u rasponu koncentracija od 86,130 do 645,975 µg/kg kruha (tablica 17.) sa srednjom vrijednošću od 100,9 %. Iskorištenje pri određivanju 2-butanona se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 97,2 do 104,7 % (tablica 17.). Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 2-butanona kretala u rasponu od 3,1 do 16,0 % (tablica 17.) sa srednjom vrijednošću od 9,1 %.

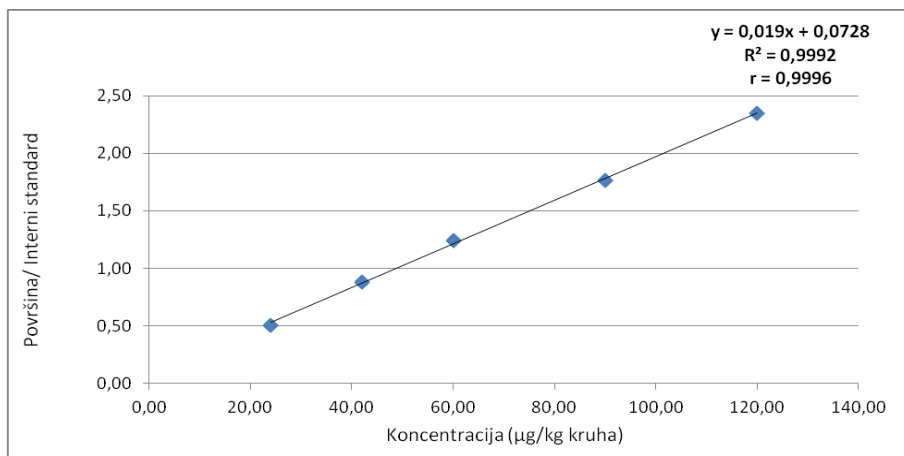


Slika 34. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji butan-2,3-diona

Tablica 18. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za butan-2,3-dion

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
48,758	0,5609	10,6	103,8
121,894	1,2454	6,9	99,1
243,788	2,3319	2,6	100,0
365,681	3,4078	1,0	100,7

Na slici 34. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za butan-2,3-dion i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za butan-2,3-dion bilo je u rasponu koncentracija od 48,758 do 365,681 µg/kg kruha (tablica 18.). Raspon koncentracija u kojem su Raffo i suradnici (2015) ispitivali linearnost za butan-2,3-dion iznosio je od 60 do 1260 µg/kg. Iskorištenje pri određivanju butan-2,3-diona se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 99,1 do 103,8 % (tablica 18.) sa srednjom vrijednošću od 100,9 %. Iskorištenje za butan-2,3-dion koje su u svojim istraživanjima utvrdili Ruiz i suradnici (2003) iznosilo je od 112 do 132 % za jednu vrstu kruha te 98 do 130 % za drugu vrstu kruha. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji butan-2,3-diona kretala u rasponu od 1,0 do 10,6 % (tablica 18.) sa srednjom vrijednošću od 5,3 %. Raffo i suradnici (2015) su u svojem istraživanju za spoj butan-2,3-dion dobili rezultate ponovljivosti od 5,5 % u kori kruha te 4,2 % u cijeloj šniti kruha.

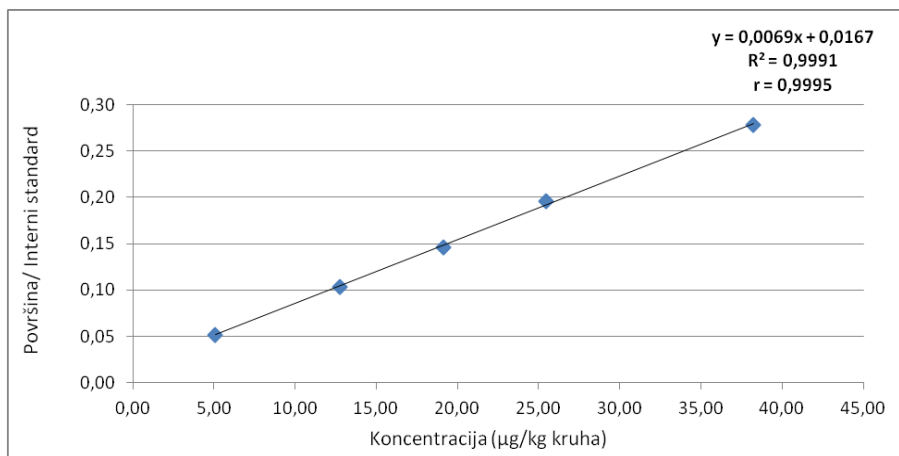


Slika 35. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 2,3-pentandiona

Tablica 19. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 2,3-pentandion

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
24,008	0,5059	8,9	105,3
42,013	0,8821	7,0	98,6
60,019	1,2416	3,4	97,6
90,028	1,7666	0,1	101,0
120,038	2,3495	4,7	100,2

Na slici 35. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 2,3-pentandion i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 2,3-pentandion bilo je u rasponu koncentracija od 24,008 do 120,038 µg/kg kruha (tablica 19.). Iskorištenje pri određivanju 2,3-pentandiona se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 97,6 do 105,3 % (tablica 19.) sa srednjom vrijednošću od 100,5 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 2,3-pentandiona kretala u rasponu od 0,1 do 8,9 % (tablica 19.) sa srednjom vrijednošću od 4,8 %.

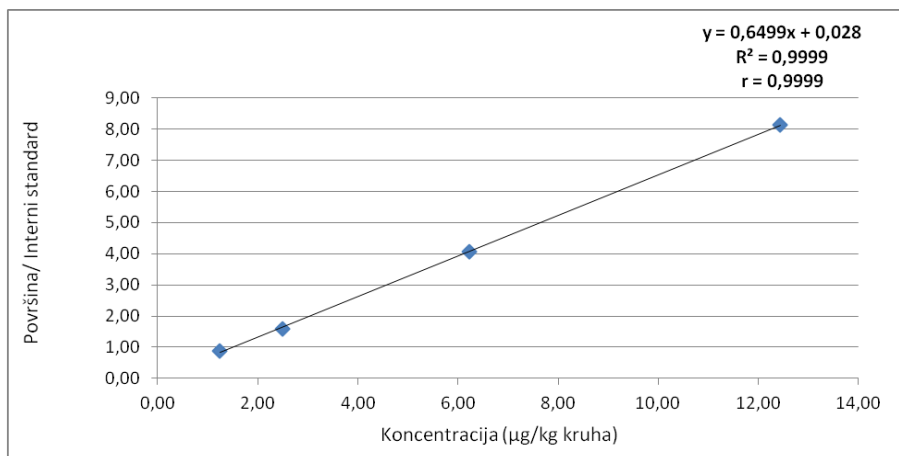


Slika 36. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji heksanala

Tablica 20. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za heksanal

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
5,096	0,0519	4,6	100,0
12,740	0,1037	5,0	101,0
19,110	0,1459	0,2	102,1
25,480	0,1964	2,7	97,8
38,220	0,2781	1,4	100,9

Na slici 36. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za heksanal i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za heksanal bilo je u rasponu koncentracija od 5,096 do 38,220 µg/kg kruha (tablica 20.). Raspon koncentracija u kojem su Raffo i suradnici (2015) ispitivali linearnost za heksanal iznosio je od 400 do 1710 µg/kg. Iskorištenje pri određivanju heksanala se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 97,8 do 102,1 % (tablica 20.) sa srednjom vrijednošću od 100,4 %. Iskorištenje za heksanal koje su u svojim istraživanjima utvrdili Ruiz i suradnici (2003) iznosilo je od 89 do 112 % za jednu vrstu kruha te 83 do 87 % za drugu vrstu kruha. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji heksanala kretala u rasponu od 0,2 do 5,0 % (tablica 20.) sa srednjom vrijednošću od 2,8 %. Raffo i suradnici su u svojem istraživanju za spoj heksanal dobili rezultate ponovljivosti od 8,6 % u kori kruha te 6,6 % u cijeloj šniti kruha (Raffo i sur., 2015).

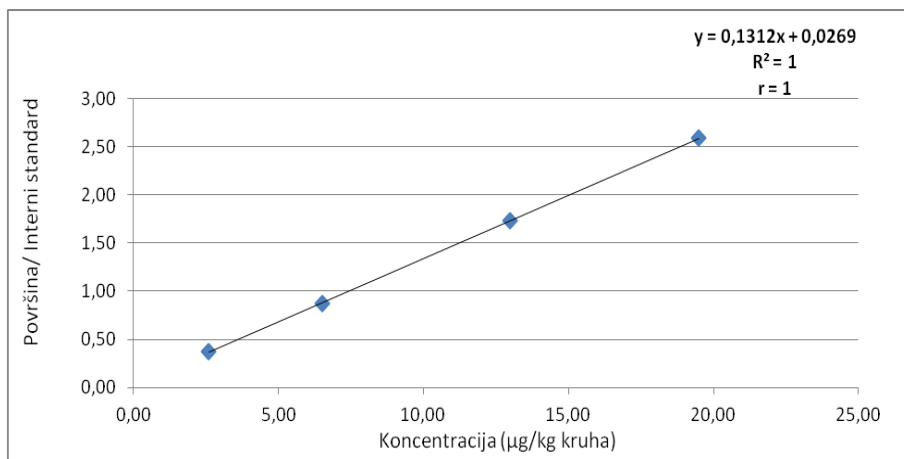


Slika 37. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 2-heptanona

Tablica 21. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 2-heptanon

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
1,243	0,8819	28,3	94,6
2,487	1,6032	13,7	102,6
6,217	4,0518	6,6	100,4
12,434	8,1211	4,7	99,8

Na slici 37. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 2-heptanon i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 2-heptanon bilo je u rasponu koncentracija od 1,243 do 12,434 µg/kg kruha (tablica 21.). Iskorištenje pri određivanju 2-heptanona se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 94,6 do 102,6 % (tablica 21.) sa srednjom vrijednošću od 99,4 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 2-heptanona kretala u rasponu od 4,7 do 28,3 % (tablica 21.) sa srednjom vrijednošću od 13,3 %.

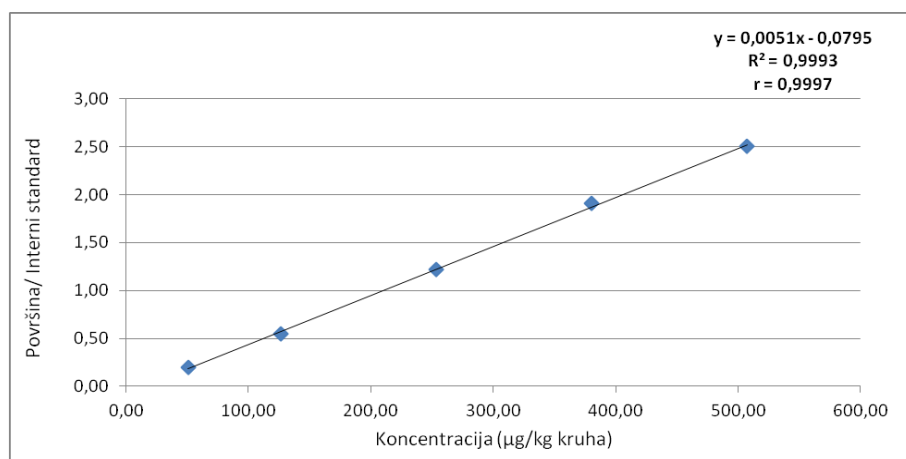


Slika 38. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji heptanala

Tablica 22. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za heptanal

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
2,600	0,3733	15,4	98,5
6,500	0,8726	1,3	100,8
13,000	1,7347	6,7	99,9
19,500	2,5870	5,3	99,9

Na slici 38. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za heptanal i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za heptanal bilo je u rasponu koncentracija od 2,600 do 19,500 µg/kg kruha (tablica 22.). Iskorištenje pri određivanju heptanala se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 98,5 do 100,8 % (tablica 22.) sa srednjom vrijednošću od 99,8 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji heptanala kretalo u rasponu od 1,3 do 15,4 % (tablica 22.) sa srednjom vrijednošću od 7,2 %.

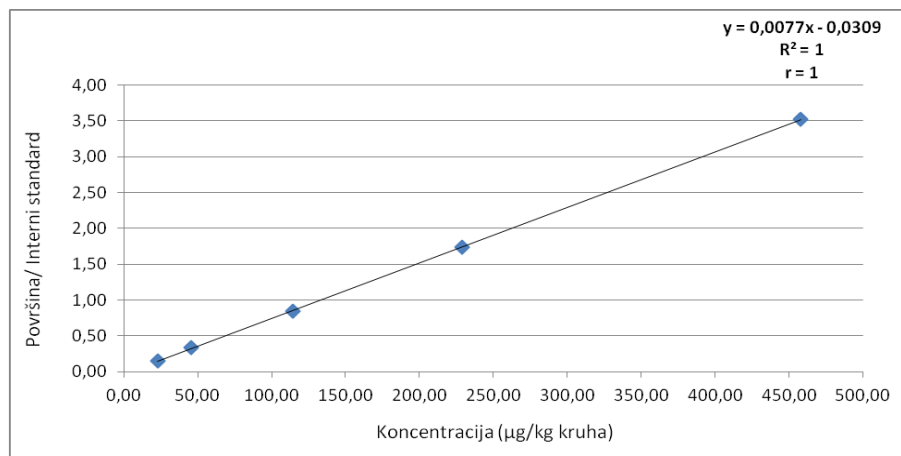


Slika 39. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 2-metil butanala

Tablica 23. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 2-metil-butanal

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
50,750	0,1979	11,7	93,3
126,875	0,5434	2,6	103,9
253,750	1,2175	10,4	99,8
380,625	1,9058	1,3	97,8
507,500	2,5075	15,6	100,1

Na slici 39. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 2-metil butanal i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 2-metil butanal bilo je u rasponu koncentracija od 50,750 do 507,500 µg/kg kruha (tablica 23.). Raspon koncentracija u kojem su Raffo i suradnici (2015) ispitivali linearnost za 2-metil butanal iznosio je od 120 do 1380 µg/kg. Iskorištenje pri određivanju 2-metil butanala se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 93,3 do 103,9 % (tablica 23.) sa srednjom vrijednošću od 99,0 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 2-metil butanala kretala u rasponu od 1,3 do 15,6 % (tablica 23.) sa srednjom vrijednošću od 8,3 %. Raffo i suradnici (2015) su u svojem istraživanju za spoj 2-metil butanal dobili rezultate ponovljivosti od 8,0 % u kori kruha te 11,1 % u cijeloj šniti kruha.



Slika 40. Grafički prikaz ovisnosti površine o koncentraciji 3-metil butanala

Tablica 24. Rezultati ispitivanja linearnosti, ponovljivosti i iskorištenja za 3-metil-butanal

Koncentracija (µg/kg kruha)	Srednja vrijednost površine/interni standard	Ponovljivost, RSD (%)	Iskorištenje (%)
22,908	0,1512	9,3	96,9
45,815	0,3301	7,3	97,7
114,538	0,8492	3,5	100,2
229,075	1,7320	1,4	100,1
458,150	3,5219	1,0	99,3

Na slici 40. prikazana je jednadžba regresijskog pravca dobivena određivanjem linearnosti za 3-metil butanal i koeficijent korelacije. Područje metode u kojem je određena linearnost za 3-metil butanal bilo je u rasponu koncentracija od 22,908 do 458,150 µg/kg kruha (tablica 24.). Raspon koncentracija u kojem su Raffo i suradnici (2015) ispitivali linearnost za 3-metil butanal iznosio je od 50 do 1060 µg/kg. Iskorištenje pri određivanju 3-metil butanala se ovisno o koncentraciji kretalo u rasponu od 96,9 do 100,2 % (tablica 24.) sa srednjom vrijednošću od 98,8 %. Relativna standardna devijacija odziva (površine) se ovisno o koncentraciji 3-metil butanala kretalo u rasponu od 1,0 do 9,3 % (tablica 24.) sa srednjom vrijednošću od 4,5 %. Raffo i suradnici (2015) su u svojem istraživanju za spoj 3-metil butanal dobili rezultate ponovljivosti od 6,3 % u kori kruha te 11,5 % u cijeloj šniti kruha.

U prikazanom istraživanju postignut je linearan odnos između odziva detektora, odnosno površine i koncentracije spojeva u ispitivanom području metode. Raspon linearnosti metode razlikovao se između spojeva, a prilagođen je kako bi kriteriji za linearnost bili

zadovoljeni. Pri određivanju linearnosti, koeficijent korelacije je pri ispitivanju svih spojeva bio jednak ili veći od 0,999, što je ujedno bio i kriterij prihvatljivosti, a iz navedenog se može zaključiti da je on zadovoljen.

Također, ono što je prikazano putem parametra linearnosti je i iskorištenje. Bilo je potrebno da svaki pojedini spoj na određenoj koncentracijskoj razini odgovara kriterijima prihvatljivosti za iskorištenje iz priručnika AOAC (2011) navedenim u tablici 1. Usporedbom dobivenih rezultata s tablicom 1., može se utvrditi da se ovom metodom postiže odgovarajuće iskorištenje te da je zadovoljen kriterij prihvatljivosti pri određivanju svih navedenih spojeva. Iz prikazanog se može zaključiti i da je iskorištenje pri određivanju aldehida i ketona u ovom istraživanju u skladu s rezultatima drugih istraživača.

Ponovljivost metode određena je pomoću rezultata niza ponovljenih mjerenja na odabranim koncentracijskim razinama. Da bi se metodu smatralo ponovljivom potrebno je zadovoljiti kriterije prihvatljivosti za vrijednosti relativne standardne devijacije iz priručnika AOAC (2011) koje se nalaze u tablici 1. Vrijednosti relativne standardne devijacije u ovom istraživanju odgovaraju granicama koje se nalaze u tablici 1. te se može zaključiti da dobiveni rezultati zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti.

4.3.3. Intermedijarna preciznost

U tablici 25. prikazani su rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti.

Tablica 25. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti

Spoj	Koncentracija ($\mu\text{g/kg}$ kruha)	Intermedijarna preciznost, RSD (%)
Pentanal	24,250	9,5
	60,625	6,3
	121,250	9,7
2-oktanon	1,005	15,5
	2,512	15,0
	5,024	16,1
Oktanal	0,241	17,8
	0,603	12,1
	1,207	15,8

Tablica 25. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti – nastavak

Spoj	Koncentracija ($\mu\text{g/kg}$ kruha)	Intermedijarna preciznost, RSD (%)
6-metil-5-hepten-2-on	0,965	11,8
	2,413	10,8
	4,826	13,4
Nonanal	0,513	21,6
	1,283	13,1
	2,565	16,3
3-furaldehid	5,170	15,6
	12,924	14,2
	25,848	13,9
Furfural	9,801	13,0
	24,503	12,0
	49,005	17,4
Dekanal	1,211	14,7
	3,028	11,8
	6,056	7,7
2-nonenal, trans	0,097	12,3
	0,241	11,3
	0,483	13,2
Benzacetaldehid	1,014	22,7
	2,536	11,4
	5,072	11,0
2,4-dekadienal, trans,trans	1,294	16,2
	3,236	11,5
	6,472	14,7
2-butanon	86,130	16,0
	215,325	10,0
	430,650	12,7
Butan-2,3-dion	48,758	12,7
	121,894	8,3
	243,788	6,9
2,3-prentandion	24,008	8,5
	60,019	4,2
	120,038	3,6

Tablica 25. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti – nastavak

Spoj	Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$ kruha)	Intermedijarna preciznost, RSD (%)
Heksanal	5,096	8,2
	12,740	5,8
	25,480	5,1
2-heptanon	2,487	17,5
	6,217	6,6
	12,434	6,5
Heptanal	2,600	12,4
	6,500	21,3
	13,000	18,6
2-metil butanal	50,750	20,4
	126,875	10,0
	253,750	9,2
3-metil butanal	45,815	11,4
	114,538	5,5
	229,075	5,5

Intermedijarna preciznost određena je pomoću mjerenja na tri koncentracijske razine uz tri ponavljanja u tri različita dana.

Raffo i suradnici (2015) u svojem su istraživanju također ispitivali vrijednosti intermedijarne preciznosti. Za spoj 2-nonanal, trans utvrdili su intermedijarnu preciznost u kori kruha i ona je iznosila 10,3 %, a u cijeloj šniti 11,1 %. Za spoj 2,4-dekadienal, trans intermedijarna preciznost u kori kruha iznosila je 17,0 %, a u cijeloj šniti 12,9 %. Za spoj butan-2,3-dion dobili su rezultate intermedijarne preciznosti u kori kruha u iznosu 6,7 %, a u cijeloj šniti 4,2 %. Intermedijarna preciznost za heksanal u kori kruha iznosila je 8,9 %, a u cijeloj šniti 7,8 %. Spoj 2-metil butanal imao je intermedijarne preciznosti u kori kruha od 8,1 %, a u cijeloj šniti 11,1 %, dok je za spoj 3-metil butanal ona iznosila u kori kruha 9,7 %, a u cijeloj šniti 11,5 % (Raffo i sur., 2015).

4.3.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

U tablici 26. prikazani su rezultati ispitivanja granice detekcije i granice kvantifikacije za svaki pojedini analit.

Tablica 26. Rezultati ispitivanja granice detekcije i granice kvantifikacije

Analit	Granica detekcije ($\mu\text{g}/\text{kg}$ kruha)	Granica kvantifikacije ($\mu\text{g}/\text{kg}$ kruha)
Pentanal	4,686	14,201
2-oktanon	0,112	0,339
Oktanal	0,022	0,068
6-metil-5-hepten-2-on	0,134	0,407
Nonanal	0,056	0,170
3-furaldehid	0,423	1,281
Furfural	0,781	2,367
Dekanal	0,155	0,471
2-nonenal, trans	0,024	0,072
Benzacetaldehid	0,138	0,419
2,4-dekadienal, trans,trans	0,103	0,311
2-butanon	20,341	61,638
Butan-2,3-dion	5,839	17,693
2,3-prentandion	4,142	12,552
Heksanal	1,325	4,015
2-heptanon	0,190	0,574
Heptanal	0,155	0,471
2-metil butanal	15,426	46,745
3-metil butanal	2,595	7,865

Granica detekcije i granica kvantifikacije predstavljaju parametre pomoću kojih je određena osjetljivost metode.

Ruiz i suradnici (2003) su utvrdili granicu detekcije za neke spojeve pa je tako ona za furfural iznosila 0,005 $\mu\text{g/g}$, za 2-nonenal,trans 0,002 $\mu\text{g/g}$, a za spoj 2,4-dekadienal,trans,trans 0,001 $\mu\text{g/g}$. Za butan-2,3-dion granica detekcije je iznosila 0,005 $\mu\text{g/g}$, a za heksanal ona je iznosila 0,017 $\mu\text{g/g}$ (Ruiz i sur., 2003).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju dokazuju osjetljivost metode pri određivanju navedenih aldehida i ketona. Pri usporedbi s rezultatima drugih istraživača uočene su razlike u osjetljivosti, što se djelomično može objasniti različitim načinom izračuna granice detekcije i kvantifikacije.

5. ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje imalo je za cilj optimizirati i validirati HS-SPME/GC-MS metodu za određivanje 19 aldehida i ketona u uzorcima bezglutenskog kruha.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- 1) Optimizirana je HS-SPME/GC-MS metoda za određivanje aldehida i ketona u uzorcima bezglutenskog kruha. Optimalna temperatura mikroekstrakcije iznosila je 60°C, a optimalno vrijeme mikroekstrakcije bilo je 60 minuta.
- 2) Validacijski eksperimenti provedeni su pod optimalnim uvjetima mikroekstrakcije. Ključni parametri pri validaciji razvijene metode bili su selektivnost, linearnost, preciznost, granica detekcije i granica kvantifikacije.
- 3) Pregledom kromatograma utvrđeno je da je metoda selektivna za sve analizirane spojeve: pentanal, 2-oktanon, oktanal, 6-metil-5-hepten-2-on, nonanal, 3-furaldehid, furfural, dekanal, 2-nonenal, trans, benzacetaldehid, 2,4-dekadienal, trans, trans, 2-butanon, butan-2,3-dion, 2,3-pentandion, heksanal, 2-heptanon, heptanal, 2-metil butanal i 3-metil butanal.
- 4) Koeficijent korelacije je unutar radnog područja metode za sve ciljane spojeve bio $\geq 0,999$ što potvrđuje da je metoda linearna.
- 5) Rezultati ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti dokazuju da se vrijednosti relativnih standardnih devijacija nalaze unutar raspona određenog kriterija prihvatljivosti u ovisnosti o koncentracijama ispitivanih spojeva, što potvrđuje preciznost metode.
- 6) Određene granice detekcije i kvantifikacije ukazuju da je metoda prihvatljive osjetljivosti za određivanje ispitivanih aldehida i ketona u uzorcima bezglutenskog kruha.
- 7) HS-SPME/GC-MS metoda za određivanje aldehida i ketona u uzorcima bezglutenskog kruha je prema svim ispitivanim parametrima validacije prikladna za njenu namijenjenu svrhu.

6. LITERATURA

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.

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

Belardi, R.P., Pawliszyn, J. (1989) Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Poll. Res. J. Can.* **24**, 179-187.

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.

Chomatography Today (2014) Understanding the Difference Between Retention Time and Relative Retention Time, <<http://www.chromatographytoday.com/>>. Pristupljeno 30. lipnja 2016.

Clarke, B.L. (1947) Introductory Remarks. *Anal. Chem.* **19**, 943.

Cranney, A., Zarkadas, M., Graham, I.D., Butzner, J.D., Rashid, M., Warren, R., Molloy, M., Case, S., Burrows, V., Switzer, C. (2007) The Canadian celiac health survey. *Dig. Dis. Sci.* **52**, 1087–1095.

Dorman, F.L., Whiting, J.J., Cochran, J.W., Gardea-Torresdey, J. (2010) Gas Chromatography. *Anal. Chem.* **82**, 4775-4785.

Đurović, R. (2011) Mikroekstrakcija u čvrstoj fazi (SPME) u određivanju ostataka pesticida u uzorcima zemljišta. *Pestic. Fitomed.* **26**, 177-184.

Đurović, R., Marković, M., Marković, D. (2007) Headspace solid phase microextraction in the analysis of pesticide residues – kinetics and quantification prior to the attainment of partition equilibrium. *J. Serb. Chem. Soc.* **72**, 879-887.

Edema, M.O., Sanni, A.I. (2008) Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. *Food Microbiol.* **25**, 616–625.

Eiceman, G.A., Hill Jr., H.H., Gardea-Torresdey, J. (1998) Gas Chromatography. *Anal. Chem.* **70**, 321-339.

Eurachem Guide (2014) The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2.izd., Gent.

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., Di Cagno, R., Rizzello, C.G. (2008) Sourdough lactic/acid bacteria. U: *Gluten-free Cereals Products and Beverages*, (Arendt, E.K., Dal Bello, F., ured.), Elsevier, Burlington/ San Diego/ London, str. 267–288.

González, A.G., Herrador, M.A. (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal. Chem.* **26**, 227-238.

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

Hites, R.A. (1997) Gas Chromatography Mass Spectrometry. U: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, (Settle, F.A., ured.), Prentice Hall PTR, New Jersey, str. 609-627.

Houben, A., Höchstötter A., Becker, T. (2012) Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: an overview. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 195-208.

Husby, S., Koleizko, S., Korponay-Szabo, I.R., Mearin, M.L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Leigeman, M., Maki, M., Ribes Koninckx, C., Ventura, A., Zimmer, K. P. (2012) European Society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **56**, 136.

Hüttner, E.K., Arendt, E.K. (2010) Recent advances in gluten-free baking and the current status of oats. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 303-312.

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

ISO 9000:2005 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary, ISO Geneva.

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

Jennings, W., Mittlefehldt, E., Stremple, P. (1997) *Analytical Gas Chromatography*, 2.izd., J & W Scientific, Folsom, California.

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 chromatography- mass spectrometry and liquid chromatography- ion trap- mass spectrometry. *Talanta* **75**, 284-293.

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

Mansueto, P., Seidita, A., D'Alcamo, A., Carroccio, A. (2014) Non-celiac gluten sensitivity: literature review. *J. Am. Coll. Nutr.* **33**, 39–54.

Milman, B.L. (2005) Identification of chemical compounds. *Anal. Chem.* **24**,493-508.

Moore, M.M., Schober, T.J., Dockery, P., Arendt, E.K. (2004) Textural comparisons of gluten-free and wheat-based doughs, batters, and breads. *Cereal Chem.* **81**, 567–575.

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.

Mugula, J.K., Nnko, S.A.M., Narvhus, J.A., Sorhaug, T. (2003) Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 187–199.

Mustalahti, K., Lohiniemi, S., Collin, C., Vuolteeho, N., Laippala, P., Maki, M. (2002) Gluten-free diet and quality of life in patients with screen-detected celiac disease. *Eff. Clin. Pract.* **5**, 105–113.

Onyango, C., Unbehend, G., Lindhauer, M. (2009) Effect of cellulose-derivatives and emulsifiers on creep-recovery and crumb properties of gluten-free bread prepared from sorghum and gelatinised cassava starch. *Food Res. Int.* **42**, 949–955.

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**, 216-224.

Pszczola D.E. (2012) The rise of gluten-free. *Food Technol.* **66**, 55–66.

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.

Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S. (2012) Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *J. Chromatogr. A.* **1232**, 101-109.

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

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

Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powell, M.L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T., Yacobi, A. (2000) Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* **17**, 1551-1557.

Shepherd, S., Gibson, P.R. (2013) Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease. *J. Hum. Nutr. Diet.* **26**, 349–358.

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

Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004) Trend sin quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Analyt. Chem.* **23**, 535-552.

Thiele, C., Gänzle, M.G., Vogel, R.F. (2002) Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chem.* **79**, 45–51.

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.

Vander-Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G., Massart, D.L. (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 723–753.

Vermeulen, N., Czerny, M., Gänzle, M.G., Schieberle, P., Vogel, R.F. (2007) Reduction of (E)-2-nonenal and (E, E)-2,4-decadienal during sourdough fermentation. *J. Cereal Sci.* **45**, 78–87.

Wardencki, W., Michulec, M., Curylo, J. (2004) A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Tech.* **39**, 703-717.

WELAC (1993) Guidance Document WG D2, EURACHEM/Western European Laboratory Accreditation Cooperation Chemistry, Teddington.

Wilson, A.L. (1973) The performance characteristics of analytical methods—III. *Talanta* **20**, 725-732.