

Razvoj LC/MS metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju

Velagić, Dunja

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:159:449237>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2016.

Dunja Velagić

566/PI

**RAZVOJ LC/MS METODE ZA
ODREĐIVANJE POLIFENOLA U
MASLINOVOM ULJU**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Škevin, te uz pomoć više asistentice dr. sc. Klare Kraljić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

RAZVOJ LC/MS METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLA U MASLINOVOM ULJU

Dunja Velagić, 566/PI

Sažetak: Djevičansko maslinovo ulje bogato je polifenolima koji pokazuju jak antioksidacijski karakter te su se pokazali kao važna komponenta ljudske prehrane. Najzastupljeniji polifenoli djevičanskog maslinovog ulja su sekoiridoidi, specifični spojevi koji su jedino u njemu prisutni u značajnim koncentracijama. Uz njihovu specifičnost veže se i problem identifikacije zbog nepostojanja komercijalno dostupnih standarda. Cilj ovog rada bio je razviti i validirati metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u kombinaciji s UV detekcijom i masenom spektrometrijom (LC/MS) za određivanje polifenola djevičanskog maslinovog ulja. Validacijom je ispitana selektivnost, linearnost, točnost, preciznost i stabilnost otopina te je dokazana svrsishodnost razvijene metode. Iz fenolnog sastava analiziranih djevičanskih maslinovih ulja s područja Istre vidljivo je kako sekoiridoidi čine gotovo 2/3 ukupnih fenola, a dialdehidni oblik elenolne kiseline povezan s 3,4-dihidroksipentil etanolom (3,4-DHPEA-EDA) je dominantni polifenol analiziranih ulja.

Ključne riječi: djevičansko maslinovo ulje, polifenoli, LC/MS, validacija

Rad sadrži: 51 stranica, 16 slika, 14 tablica i 22 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dubravka Škevin

Pomoć pri izradi: dr. sc. Klara Kraljić, viša asistentica

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Branka Levaj
2. Izv. prof. dr. sc. Dubravka Škevin
3. Izv. prof. dr. sc. Ksenija Marković
4. Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić (zamjena)

Datum obrane: 10. svibnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DEVELOPMENT OF LC / MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF POLYPHENOLS IN OLIVE OIL

Dunja Velagić 566/PI

Abstract: Virgin olive oil is rich in polyphenols, compounds with high antioxidant activity and known as an important component of human nutrition. Secoiridoids are the dominant polyphenols of virgin olive oil. Those specific compounds are present only in olive oil in significant concentrations. That specificity causes a problem with their determination because of the lack of commercial available standards. The aim of this study was to develop and to validate a method using high performance liquid chromatography coupled with UV detection and mass spectrometry (LC / MS) to determine content and composition of virgin olive oil polyphenols. Validation tested selectivity, linearity, accuracy, precision and stability of solution and found the expediency of the developed method. Secoiridoids are the dominant phenolic group in analyzed virgin olive oils from Istra, making almost 2/3 of total phenolic compounds, with 3,4-DHPEA-EDA as most abundant individual component.

Keywords: virgin olive oil, polyphenols, validation, LC / MS - method

Thesis contains: 51 pages, 16 figures, 14 tables, 22 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. Dubravka Škevin, Associate professor

Technical support and assistance: PhD. Klara Kraljić, Senior assistant

Reviewers:

1. PhD. Branka Levaj Full professor
2. PhD. Dubravka Škevin, Associate professor
3. PhD. Ksenija Marković, Associate professor
4. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor (substitute)

Thesis defended: 10 May 2016.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FENOLI	2
2.1.1. Fenoli u maslinama i djevičanskim maslinovim uljima	3
2.1.2. Metode određivanja fenola u ulju	8
2.1.2.1 Razdvajanje komponenata	8
2.1.2.2. Detekcija	9
2.1.3. Povezivanje LC i MS metoda	16
2.2. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA	18
2.2.1. Osnovna načela validacije analitičkih metoda	19
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. MATERIJALI	23
3.1.1. Uzorci	23
3.1.2. Reagensi	23
3.1.3. Aparatura	24
3.2. METODE RADA	25
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva	25
3.2.2. Separacija fenolnih spojeva na HPLC-u	26
3.2.3. Identifikacija fenola pomoću UV detektora	27
3.2.4. MS – analiza	28
3.2.5. Kvantifikacija fenolnih spojeva	29
3.2.6. Validacija	30
3.2.6.1. Definicija metode - svrha i namjena	30
3.2.6.2. Opis opreme i materijala	30
3.2.6.3. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti	30
3.2.6.4. Opis izvođenja validacijskih eksperimenata	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1. RAZVOJ METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLA U MASLINOVIM ULJIMA	33
4.2. VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLA U MASLINOVOM ULJU	38
4.3. SASTAV I UDIO FENOLA ANALIZIRANIH DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA	46
5. ZAKLJUČCI	49
6. LITERATURA	50

1. UVOD

Maslina (*Olea europaea* L) je od davnina poznata kao ljekovita biljka a ulje dobiveno od njenih plodova jedno je od najstarijih ulja korištenih kroz ljudsku povijest. Zapise o njegovoj ljekovitosti i blagotvornim učincima nalazimo već kod starih Grka i Rimljana. Ljekovitost ovog ulja leži u njegovom kemijskom sastavu, točnije u sastavu polifenola od koji su najznačajniji fenolni alkoholi, flavonoidi i sekoiridoidi. Ovi spojevi pokazuju jak antioksidacijski karakter zbog čega maslinovo ulje pokazuje pozitivan učinak na zdravlje čovjeka. Osim učinaka na zdravlje važno je naglasiti da su fenolne tvari učinkoviti prirodni antioksidansi koji štite maslinovo ulje od autooksidacijskih promjena, te time pridonose stabilnosti ulja u smislu očuvanja njegove kakvoće i trajnosti.

Iz navedenih razloga ovi spojevi kao i sam sastav ulja postali su tema različitih istraživanja današnjice. Najveći problem koji se javlja prilikom istraživanja je nemogućnost određivanja točnog sastava fenola u uzorku. Kod određivanja prisutnosti određenih tvari u uzorku potrebno je koristiti referentne standarde za usporedbu kojih za fenole maslinovog ulja nema na tržištu pa je samim time analiza gotovo nemoguća. Zbog važnosti ovih spojeva i navedene problematike odlučilo se na razvoj metode koja bi to omogućila.

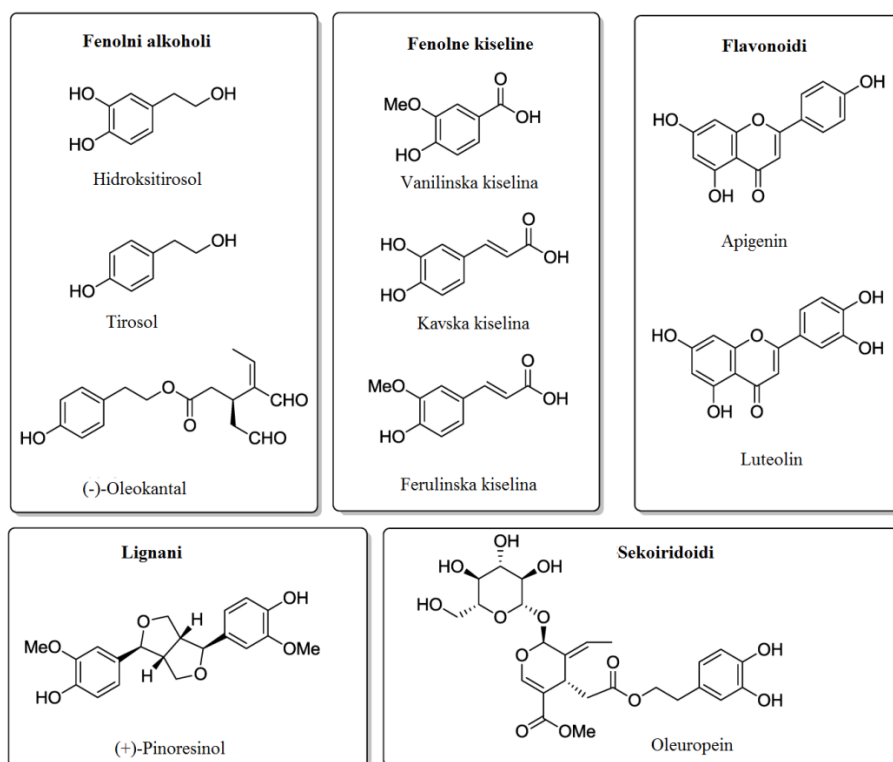
Cilj ovog rada biti će razvoj metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u kombinaciji s UV detekcijom i masenom spektrometrijom (LC/MS) za određivanje sastava polifenola u maslinovom ulju te validacija iste. Osim toga odredit će se sastav polifenola odabranih maslinovih ulja koristeći razvijenu metodu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FENOLI

Fenoli su važna skupina prirodnih spojeva, koji se sintetiziraju u sekundarnom metabolizmu mnogih biljka. Važnost ovih spojeva leži u njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti, njihovim pozitivnim učincima na mnoge degenerativne bolesti te nekim farmaceutskim učincima kao što su antikancerogena, antiaterogena i antimikrobna svojstva (Suárez i sur., 2008).

Fenolni spojevi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Slika 1) (Naczki i Shahidi, 2006; Bravo, 1998).



Slika 1. Strukturne formule fenolnih spojeva (Rodríguez-Morató i sur., 2015)

Polifenole sačinjavaju: fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni. Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline.

Aglikoni flavonoida (flavonoidi bez vezanih molekula šećera) posjeduju strukturu tipa C6–C3–C6, odnosno sadrže petnaest atoma ugljika raspoređenih tako da su dvije benzenske jezgre (prsten A i prsten B) povezane s propanskim lancem, koji može ili ne mora formirati treći prsten (prsten C). Najveće i najdetaljnije istražene skupine flavonoida su: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli (katehini) i njihovi polimeri proantocijanidini te antocijanidini. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu. Najpoznatiji predstavnik ove skupine polifenola je resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), koji postoji u dva stereoizomerna oblika: *cis*-(Z) i *trans*-(Z) (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Zbog fenolnih hidroksilnih grupa, svi ovi spojevi imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala na način da doniraju atom vodika ili elektron slobodnom radikalu, a prošireni konjugirani aromatski sustav delokalizira nespareni elektron. Antioksidacijska aktivnost polifenola može se objasniti pomoću mehanizama hvatanja slobodnih radikala kao što su reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi (ROS i RNS), sprječavanja formiranja istih inhibicijom određenih enzima, anuliranjem metala koji su uključeni u stvaranje slobodnih radikala te djelovanjem na regulaciju i zaštitu samih antioksidanata (Wang i sur., 2010; Dai i Mumper, 2010).

2.1.1. Fenoli u maslinama i djevičanskim maslinovim uljima

Plod masline sadrži visoke koncentracije fenolnih spojeva koji mogu sačinjavati između 1-3% od ukupne težine svježe pulpe. Glavne skupine fenola prisutnih u plodu masline su fenolne kiseline (kao što vanilinska kiseline i vanilin), fenolni alkoholi (kao što su hidroksitiroso i tiroso), flavonoidi (uključujući luteolin i apigenin) i sekoiridoidi (Servili i Montedoro, 2002; Suárez i sur., 2008). Osim navedenih skupina od većeg značaja po zastupljenosti mogu se izdvojiti i flavonol glikozidi (luteolin-7-glukozid i rutin) te antocijani (cijanidin i delphinidin glikozidi).

Dok se fenolne kiseline, fenolni alkoholi i flavonoidi mogu pojaviti u mnogim vrstama voća i povrća koje pripadaju različitim botaničkim obiteljima, sekoiridoidi su prisutni isključivo u

biljkama koje pripadaju obitelji *Oleaceae* koja uključuje i maslinu (*Olea europaea* L.) (Servili i Montedoro, 2002).

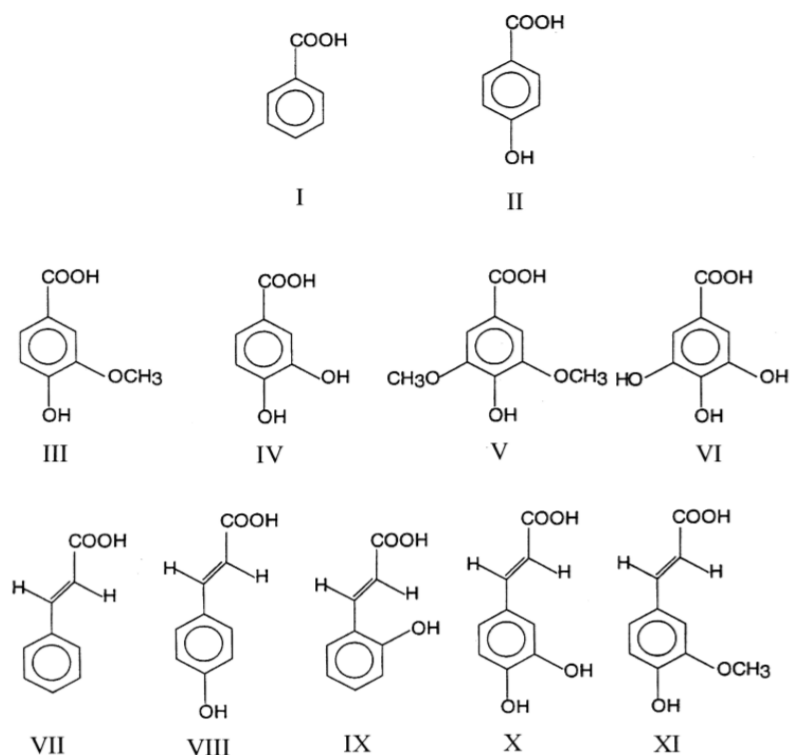
Tablica 1. Fenolne komponente djevičanskog maslinovog ulja (Servili i Montedoro, 2002)

FENOLNE KISELINE I DERIVATI
Vanilinska kiselina
Siringinska kiselina
<i>p</i> -kumarinska kiselina
<i>o</i> -kumarinska kiselina
Galna kiselina
Kavska kiselina
Protokatehinska kiselina
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina
Ferulinska kiselina
Cimetna kiselina
4-acetoksitil-1,2dihidroksibenzen
Benzojeva kiselina
FENOLNI ALKOHOLI
3,4-dihidroksipentil etanol (3,4-DHPEA)
<i>p</i> -hidroksipentil etanol (<i>p</i> -HPEA)
3,4-dihidroksipentil etanol-glukozid
SEKOIRIDOIDI
Dialdehidni oblik elenolne kiseline povezan s 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA)
Dialdehidni oblik elenolne kiseline povezan s <i>p</i> -HPEA (<i>p</i> -HPEA-EDA)
Oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA)
Ligstrozid aglikon
Oleuropein
<i>p</i> -HPEA-derivati
LIGANDI
1-acetoksipinoresinol
Pinoresinol
(+) - 1-hidroksipinoresinol
FLAVONOIDI
Apigenin
Luteolin

U proizvodnji djevičanskog maslinovog ulja jedan dio fenolnih spojeva iz ploda masline prelazi u ulje. Pojava hidrofilnih fenolnih spojeva u djevičanskim maslinovim uljima uočena je prije više od četrdeset godina. Međutim, sustavno proučavanje pojedinih skupina ovih spojeva

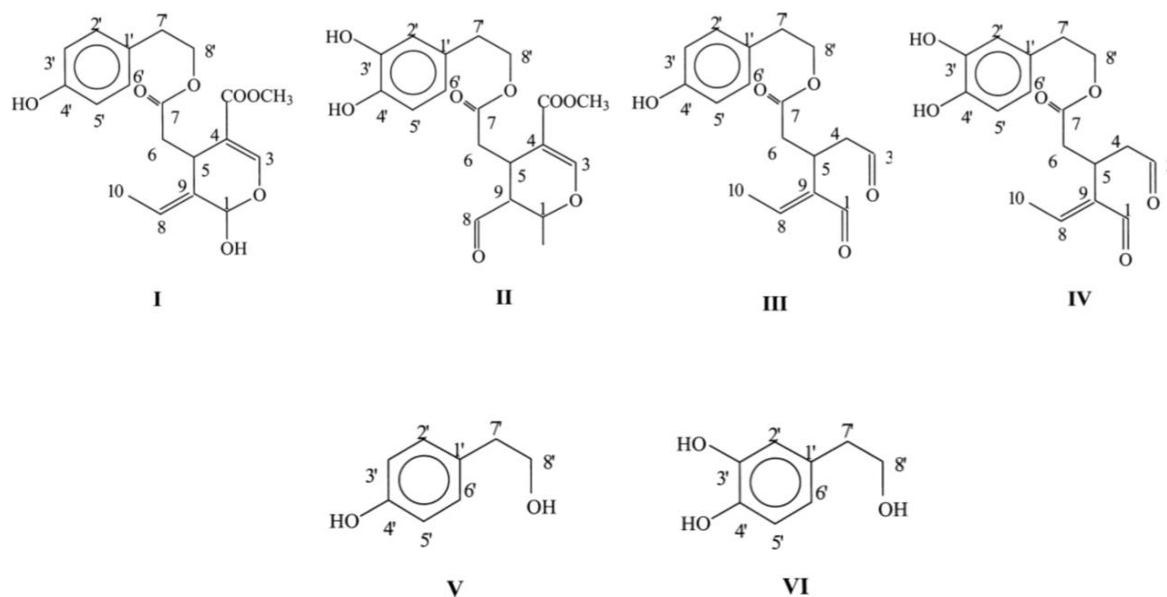
razvijeno je prije otprilike dvadeset godina. Upravo je specifični sastav fenola glavna razlika djevičanskog maslinovog ulja i svih drugih biljnih ulja. Kao što je prikazano u Tablici 1, ono sadrži različite skupine fenolnih spojeva poput fenolnih kiselina, fenolnih alkohola, flavonoida, sekoiridoida i lignana (Servili i Montedoro, 2002).

Fenolne kiseline prisutne u plodu masline i u djevičanskom maslinovom ulju prema kemijskoj strukturi možemo podijeliti u dvije skupine C6-C1 (benzojeve kiseline) te C6-C3 (cimetne kiseline). Povijesno gledano, ovi spojevi, kao što su kavaska, vanilinska, siringinska, *p*-kumarinska, *o*-kumarinska, protokatehinska, sinapinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina su prva skupina fenola istraživanih u djevičanskom maslinovom ulju (Slika 2) (Servili i Montedoro, 2002).



Slika 2. Kemijska struktura glavnih fenolnih kiselina djevičanskog maslinovog ulja. Benzojeva kiselina [I], *p*-hidroksibenzojeva kiselina [II], vanilinska kiselina [III], protokatehinska kiselina [IV], siringinska kiselina [V], galna kiselina [VI], cimetna kiselina [VII], *p*-kumarinska kiselina [VIII], *o*-kumarinska kiselina [IX], kafeinska kiselina [X], ferulinska kiselina [XI] (Servili i sur.,2002).

Različita istraživanja pokazala su kako fenolne kiseline zapravo predstavljaju manji dio fenolnih spojeva dok većinu fenola čine sekoiridoidi. Spojevi kao što su oleuropein, demetiloleuropein, ligstrozid i nuzhenid predstavljaju najrasprostranjenije derivate sekoiridoid glukozida u plodovima maslina. Sekoiridoide karakterizira prisutnost ili elenolne kiseline ili derivata elenolne kiseline u molekulskoj strukturi. Najčešće su prisutni u obliku derivata (kao što je dialdehidni oblik elenolne kiseline povezane s tirosolom (*p*-HPEA-EDA), aldehidni oblik elenolne kiseline vezane na tirosol (*p*-HPEA-EA), dialdehidni oblik elenolne kiseline povezane s hidroksitirosolom (3,4-DHPEA-EDA), 4 (acetoksietil) -1,2-dihidroksibenzol (3,4-DHPEA-AC), oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA) i njegov metilirani oblik (metil 3,4-DHPEA-EA). Osim gore navedenih skupina u maslinovom ulju zastupljeni su i derivati lignana (pinoresinol i acetoksipinoresinol) (Suárez i sur.,2008; Servili i sur.,2002).



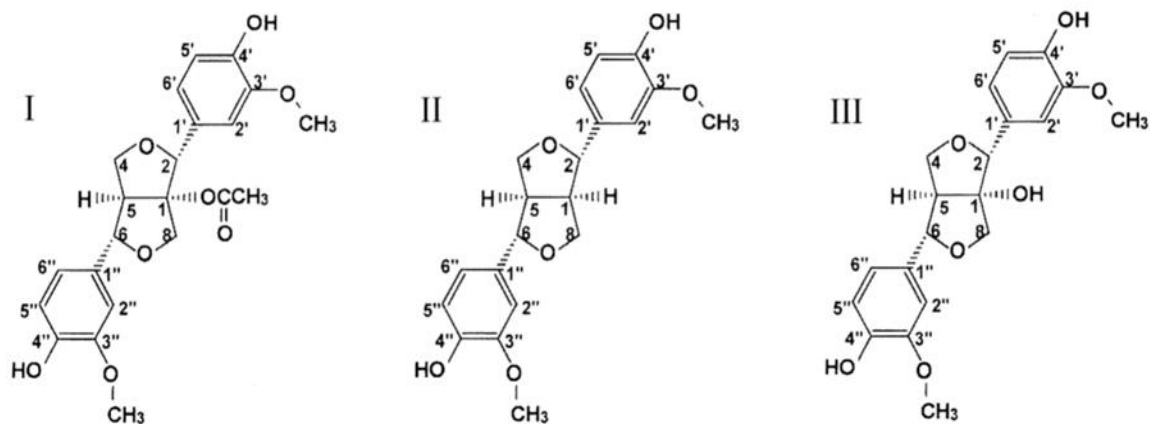
Slika 3. Kemijska struktura sekoiridoidnih derivata i fenolnih alkohola djevičanskog maslinovog ulja. Ligstrozid aglikon (*p*-HPEA-EA) [I], izomer oleuropein aglikona (3,4-DHPEA-EA) [II], dialdehidni oblik elenolne kiseline povezane s *p*-HPEA (*p*-HPEA-EDA) [III], dialdehidni oblik elenolne kiseline vezana na 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA) [IV], tirosol [V], hidroksitirosol [VI] (Servili i Montedoro, 2002).

Prisutnost oleuropeina u plodu masline otkrivena je 1908. godine dok se na otkriće njegove kemijske strukture čekalo sve do 1960. Demetiloleuropein je izoliran iz zrelih maslina. U plodu masline u malim količinama pronađen je derivat hidroksicimetne kiseline, verbaskozid. Oleuropein, demetiloleuropein i verbaskozid pronađeni su u svim dijelovima ploda poput kožica, pulpe i sjemena. Nasuprot tome, nuzhenid je pronađen samo u sjemenu (Servili i sur.,2002).

Hidroksitirosol i tirosol glavni su fenolni alkoholi u djevičanskom maslinovom ulju (Slika 3). Njihova koncentracija općenito je niska u svježim uljima, ali se tijekom skladištenja povećava. To je vjerojatno zbog hidrolize sekoiridoida kao što je 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA i 3,4-DHPEA-EA koji sadrže hidroksitirosol ili tirosol u svojoj molekularnoj strukturi (Servili i Montedoro, 2002).

Rovell i suradnici (1997) su dokazali i prisutnost flavonoida luteolina i apigenina kao dio fenolne komponente ulja (Servili i Montedoro,2002).

Posljednja skupina fenola koju možemo naći u ulju su lignani. Owen i suradnici (2000) u svom su radu izolirali i okarakterizirali (+)-1-acetoksipinoresinol, (+)-1-pinoresinol i (+)-1-hidroksipinoresinol kao najčešće prisutne lignane (Slika 4) (Servili i Montedoro,2002).



Slika 4. Kemijske strukture lignana koje se pojavljuju u djevičanskom maslinovom ulju. (+) - 1-Acetoksipinoresinol, [I], (+) - 1-pinoresinol [II], (+) - 1-hidroksipinoresinol [III] (Servili i Montedoro,2002).

Agronomski i tehnološki aspekti proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja imaju snažan utjecaj na koncentraciju hidrofilnih fenola. Stoga je određivanje prosječne koncentracije prilično teško. Međutim kolorimetrijska mjerenja ukupnih fenola u metanolnom ekstraktu ulja pokazuju variranje koncentracije između 40 i 900 mg kg⁻¹. Također su otkrivene i više koncentracije (do 1000 mg kg⁻¹) u nekoliko ulja. Provedena istraživanja pokazala su kako između djevičanskih maslinovih ulja postoje velike varijacije kako u udjelu ukupnih fenola tako i u udjelu pojedinih fenolnih komponenata (Servili i Montedoro, 2002).

2.1.2. Metode određivanja fenola u ulju

2.1.2.1 Razdvajanje komponenata

Kvalitativno i kvantitativno određivanje fenola u uzorcima ulja je vrlo važno. U početcima za analizu fenola koristile su se, nespecifične analitičke metode, poput tankoslojne kromatografije (TLC) i UV spektroskopije ali s ograničenim uspjehom. Nakon toga, ove tradicionalne metode zamijenile su one sofisticiranije, kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i plinska kromatografija (GC), a kasnije i kapilarna elektroforeza (CE). Upotreba navedenih metoda omogućila je prikaz profila i identifikaciju pojedinačnih fenolnih spojeva u uzorcima djevičanskog maslinovog ulja. U zadnjih desetak godina razvijena je i tekućinska kromatografija ultra performanse (UPLC) kao rezultat poboljšanja materijala stacionarnih faza koje se koriste za kromatografsko razdvajanje. Ova tehnika temelji se na van Deemt-ovoj jednadžbi. Temeljne prednosti korištenja UPLC u odnosu na klasične HPLC tehnike su povećanje omjera signal-šum (S / N) (uži vrhovi), smanjenje vremena za analizu i poboljšanje u rezoluciji pikova (Suárez i sur., 2008). Iako su rezultati dobiveni plinskom kromatografijom vrlo pouzdani i zanimljivi, tekućinska kromatografija i dalje je glavna tehnika u određivanju polifenolnog sastava. Razlog rjeđeg korištenja GC tehnika je potreba za derivacijskim korakom.

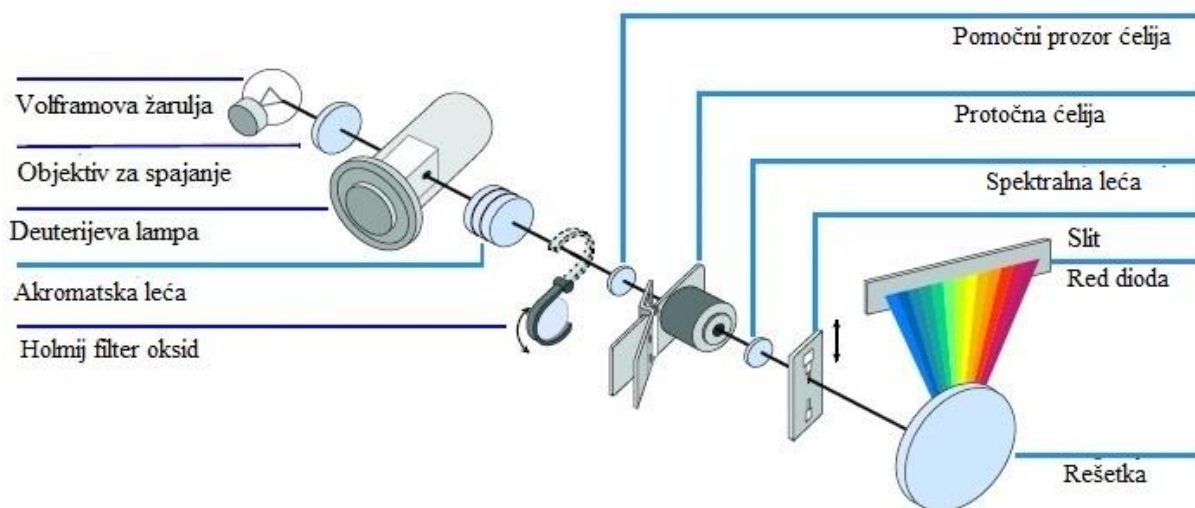
Prije početka same analize, fenolne spojeve maslinovog ulja potrebno je izolirati i pročistiti kako bi ih koncentrirali jer se u uzorcima nalaze u niskim koncentracijama. Najčešća tehnika za postizanje tog cilja je ekstrakcija tekuće-tekuće ili ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE). Iako je SPE atraktivna izolacijska tehnika u smislu brzine, niske cijene i potrošnje otapala,

znanstvenici su ipak zaključili da postoje problemi zbog njezine selektivnosti prema pojedinim fenolnim spojeva, posebice onima tipa aglikon (Suárez i sur., 2008).

Za određivanje kvalitativnog sastava fenolnih spojeva, komercijalno je dostupan široki raspon stacionarnih faza HPLC-a kako u smislu dimenzija kolone, tako i modifikacija površine, a to omogućuje optimiranje kromatografskog razdvajanja na medij koji se ispituje (Seger i sur., 2007).

2.1.2.2. Detekcija

DAD detektor



Slika 5. Prikaz principa rada DAD detektora (Anonymous 1, 2016)

Slika 5 predstavlja princip rada DAD detektora: volframova žarulja emitira svjetlo u vidljivom rasponu koje ulazi u deuterijevu lampu, koja dodaje UV (i vidljivo) svjetlo. Polikromatski snop prolazi kroz ćeliju protoka. Rešetka razdvaja polikromatski snop zraka na različite valne duljine, čiji intenzitet se mjeri nizom fotodioda. Glavna razlika u odnosu na detektor promjenjivih valnih duljina (Variable Wavelength detector, VWD) je da se sve valne duljine mjere istodobno. Što se tiče tvari koje se mogu prepoznati DAD-om možemo reći da ima visoku selektivnost.

Dodatne prednosti DAD-a:

- Volframova žarulje proširuje opseg VIS područja.
- Optička jedinica DAD-a termički je kontrolirana kako bi se dobila optimalna kvaliteta signala.
- DAD-u nije potrebna referentna dioda

Dok VWD koristi referentnu diodu, za DAD nema izravnog mjerenja signala bez apsorpcije I_0 . Umjesto toga DAD detektor koristi ravnotežno stanje, koje se može postići automatski prilikom paljenja detektora ili kada započnemo sa mjerenjem. Tijekom ravnotežnog stanja detektora apsorpcijske vrijednosti za sve valne duljine su postavljeni na nulu, što odgovara $I = I_0$ prema $\leftarrow$ Lambert Beer-ovom zakonu. Svi intenziteti izmjereni tijekom eksperimenta su sada u odnosu na ovu nulu apsorpcije intenziteta.

Iako referentna dioda VWD-a ispravlja osnovne promjene tijekom mjerenja, DAD umjesto toga koristi referentnu valnu duljinu. Referentnu valnu duljinu treba odabrati, pri čemu kod te valne duljine nema apsorpcije tijekom kromatografskog mjerenja. Relativne promjene intenziteta kasnije se koriste za ispravljanje proporcionalne promjene kod drugih valnih duljina. Holmij oksid filter, koji je također dio sklopa VWD filter, ima apsorpcijske linije za karakteristične valne duljine te se koristi za dijagnostičke testove točnosti valne duljine (Anonymous 2, 2016).

Maseni detektor

Ovaj uređaj detektira spojeve na osnovi njihove molekulske mase.

Princip rada masenog spektrometra možemo opisati u četiri koraka:

1. Ionizacija brzim elektronima – upareni uzorak se ionizira (obično se ukloni jedan elektron, ponekad dva; moderne metode i više elektrona) – pozitivno nabijene vrste ulaze u akceleracijsku komoru;

2. Akceleracija – ioni se podvrgnu djelovanju električnog polja radi ubrzanja;

3. Otklon (defleksija) – teži ioni se manje otklanjaju od lakših – odvajanje prema atomskim (molekulskim) masama tj. omjeru m/z ;

4. Detekcija – samo ioni određene mase dolaze do detektora – za detekciju svih iona treba mijenjati akceleracijsko polje ili jakost magnetnog polja – detektor bilježi svaku vrstu kao zaseban vršak (“peak”)

Budući da su ioni vrlo reaktivni i kratkog vijeka, njihov nastanak i manipulacija mora se provoditi u vakuumu. Atmosferski tlak je oko 760 tora (mm žive). Pritisak pod kojim ioni mogu biti obrađeni je oko 10^{-5} do 10^{-8} tora (Novak i Allgretti – Živčić, 2013).

Prednost masenog detektora je njegova osjetljivost i selektivnost. Selektivnost masenog detektora ovisi o rezoluciji, opsegu molekulskih masa i brzini snimanja spektra. Odabir instrumenta ovisi o zahtjevnosti analize, a izvodi se na osnovu navedenih karakteristika. Rezolucija ili moć razdvajanja, R , definira se kao najmanja razlika masa, koje se može razdvojiti. Praktično se izračunava na osnovu dimenzija snimljenog pika prema sljedećem izrazu:

$$R = \frac{x}{b_{1/2}} \cdot \frac{m}{\Delta m} \quad [1]$$

gdje je

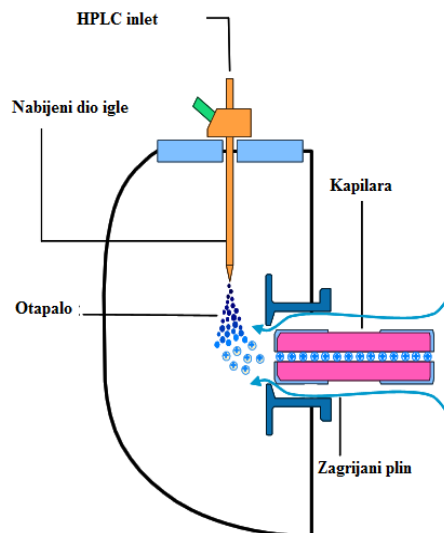
- m - nominalna masa mjereno pika
- x - rastojanje između maksimuma pikova
- $b_{1/2}$ - širina pika na polovini visine
- Δm - razlika masa između dva pika

Iz praktičnih razloga koristi se manje precizna definicija rezolucije, koja se naziva još i definicija udoline. Prema njoj su dva susjedna pika razdvojena, ako je visina udoline između njih manja od 10% zbroja visine pikova. U kvantitativnoj analizi ova veličina se ne može koristiti, ali se primjenjuje u organskoj kemiji i sličnim područjima u MS, jer doprinosi jednog pika intenzitetu susjednog, u ovom slučaju, ne utiče mnogo na rezultate (Ivanov, 2008).

Tijekom posljednjih godina razvijene su različite ionizacijske tehnike čiji odabir tijekom istraživanja ovisi o željenom učinku. Najrasprostranjenija metoda je ionizacija elektroraspršivanjem (engl. electrospray ionization, ESI) (Seeger i sur., 2007).

Važnost elektroraspršivanja i njegov ogroman doprinos modernoj spektrometriji masa je u njegovim jedinstvenim karakteristikama. To je blagi način ionizacije, a omogućuje analizu kako malih tako i velikih molekula, nekovalentnih kompleksa, nenabijenih ili ionskih spojeva itd. Jedinstveno svojstvo elektroraspršivanja je u nastajanju višestruko nabijenih iona, tako da su opaženi primjerice ioni $[M+150H]^{150+}$, što omogućuje detekciju tvari velikih molekulskih masa i s analizatorima malih vrijednosti m/z (Galić, 2004).

Kod ESI, ioni se stvaraju iz tekućine pri atmosferskom tlaku. Postava ionizacije elektroraspršivanjem je tehnički jednostavna: šuplja igla kroz koju protječe izlazna tekućina (obično $1-1000 \mu\text{Lmin}^{-1}$) je nabijena električnim potencijalom. Visoko polje na vrhu igle stvara stožasti tekući “polumjesec” iz kojega nastaju raspršene, visoko nabijene kapljice (Slika 6). Daljnje isparavanje kapljica rezultira stvaranjem iona. ESI ima neke vrlo dojmljive prednosti koje joj omogućuju primjenu kod vrlo različitih bioloških problema. Stvaranje višestruko nabijenih čestica proširuje dinamički raspon masenog spektrometra do 10^6 U i omogućuje analizu makromolekula. Nadalje, ESI se može smatrati vrlo “blagom” ionizacijskom tehnikom koja ne razara čak ni nekovalentno vezane biomolekularne komplekse. To je najvjerojatnije najkorišteniji ionizacijski izvor koji se kombinira s različitim sustavima analizatora HPLC-MS i CE-MS. Priličan nedostatak ESI, osobito kod pokusa s izravnom infuzijom (engl. direct infusion experiments, DIESI) je njena osjetljivost na supresijske učinke matriksa i iona, npr. kod koncentracija s mnogo soli u biološkim uzorcima ili visoko koncentriranim analitima koji mogu spriječiti ili ukloniti ionizaciju analita. Alternativa ESI, koja se često kombinira unutar istog izvora, je kemijska ionizacija uz atmosferski tlak (engl. atmospheric pressure chemical ionization, APCI) (Segeer i sur., 2007).



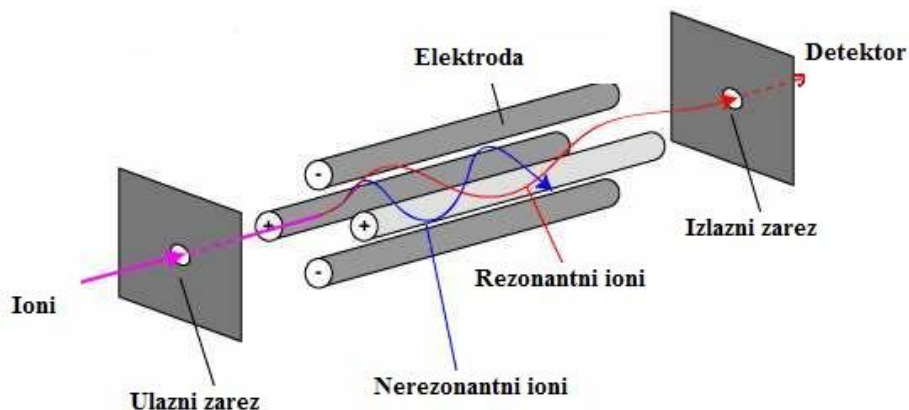
Slika 6. Prikaz ESI ionizacije (Anonymous 3, 2016)

APCI je vrlo zastupljena tehnika ionizacije, koja je kompatibilna sa svim analizatorima. Radni protok je od 0,5 ml do 2 ml u minuti . Može ionizirati polarne i ne polarne molekule. Ionizacija se događa pri atmosferskom tlaku a može biti pozitivna i negativna. Optimalna temperatura ionizacije je oko 400 °C i događa se u struji dušika. Kao i kod ESI ionizacije, ionizacija APCI tehnikom događa se pod atmosferskim tlakom u struji dušika. Ionizacija se, za razliku od ESI ionizacije, događa u plinskoj fazi, a uzrokuje ju prijenos naboja među ionima, gdje je inicijator ionizacije izbijajuća igla (2 – 5 kV) na samom ulazu pokretne faze i analita u ionizator. Kaskadnim prijenosom naboja od N^{2+} , O^{2+} i NO^+ stvara se hidratni proton $H_3O^+(H_2O)_n$ koji kao vrlo reaktivni ion vrši prijenos protona i naboja na molekulu analita. Kod negativne ionizacije izbijajuća igla emitira elektrone koji u sudaru s neutralnim česticama mogu formirati ione O^{2-} ili O^- . Najveći izvor negativnih iona u APCI ionizaciji su superoksidni anion O^{2-} i odgovarajući hidrati i klusteri $O^{2-} [H_2O]_n$ i $O^{2-} [O^2]_n$. Nakon formiranja primarnih iona molekule analita mogu se ionizirati prijenosom naboja ili protona (Cindrić i sur., 2009).

Maseni analizatori se dijele na kontinuirane i pulsne. U kontinuirane ubrajamo kvadrupolni i magnetni, a u pulsne ionsku zamku, analizator na bazi vremena preleta, sa dvostrukim fokusiranjem i drugi. Najčešće se koristi kvadrupolni, zbog manjih dimenzija uređaja,

velike brzine snimanja spektra, visoke efikasnosti transmisije (broj iona koji stigne do detektora), umjerenog vakuuma ($p \approx 10^{-4}$ mbar) i niske cijene (Ivanov, 2008).

Kvadrupolni analizator (Slika 7) se sastoji od četiri međusobno paralelne elektrode, kojima se postiže osnovni potencijal. Osnovni potencijal dvije susjedne elektrode je istog intenziteta, ali različitog predznaka. Dok prolaze kroz analizator, ioni se filtriraju na osnovu m/z vrijednosti, tako da samo pojedini bivaju propušteni, jer imaju stabilnu putanju, dok su ostali deelektrizirani na elektrodama. m/z vrijednost iona koji će proći kroz analizator, zavisi o jednosmjernom potencijalu (U), amplitudi naizmjeničnog potencijala (V) i frekvenciji naizmjeničnog potencijala (ω) (Ivanov, 2008).



Slika 7. Prikaz kvadrupolnog analizatora (Ivanov, 2008)

Radio frekventni potencijal odbija, ili prenosi ione na osnovu m/z vrijednosti, fokusirajući ih naizmjenično u različitim ravnima. Električno polje kvadrupolnog analizatora mijenja se tokom vremena snimanja pri čemu nastaje trodimenzionalni val kretanja iona. Da bi stigli na detektor, amplituda duž dvije osi treba biti takva da onemogući privlačenje iona od strane elektrode. Odabirom odgovarajuće radio frekvencije i potencijala, analizator će propuštati ione većeg m/z odnosa do detektora, a ioni manjeg m/z odnosa privući će elektrode (Ivanov, 2008).

Magnetni analizator ima veću rezoluciju i opseg mase molekula koje se mogu analizirati od kvadrupolnog analizatora, ali zahtjeva viši vakuum i često sporije snima spektar. Tipičan opseg rada je do 5000 m/z , ali može ići i do 30 000 m/z . Ioni se također razdvajaju na bazi m/z odnosa, ali u ovom slučaju primjenom magnetnog polja (Ivanov, 2008).

U analizatoru sa vremenom preleta (TOF – Time Of Flight) ionski zrak iz ionskog izvora putuje prema detektoru kroz vakuum gdje nema prisustva magnetnog polja. Vrijeme preleta je funkcija mase iona i dužine putanje, izražava se u μs i može se transformirati u m/z vrijednosti. Ovi uređaji imaju visoku osjetljivost i sposobnost brzog skeniranja. Mogu se koristiti za analizu biomolekula velikih masa (Ivanov, 2008).

Ionska zamka skladišti ione za eksperiment ili analizu unutar odabranog opsega, m/z odnos je određen naponom, a uređaj zadržava ione u površini prekrivenoj elektrodama.

Postoje dva načina prikupljanja podataka tijekom MS analize:

1. SCAN – podrazumijeva snimanje kompletnog masenog spektra
2. SIM (Selected ion monitoring) – prate se samo odabrani ioni

SCAN tehnika podrazumijeva skeniranje mase u zadanom opsegu uz istovremeno praćenje retencijskog vremena. Ovo omogućava identifikaciju analita. Zadani maseni opseg i brzina skeniranja kromatograma određuju vrijeme praćenja određene mase (dwell time). U toku jednog ciklusa svaka masa iz zadatog opsega se registrira samo jednom. Ukupni ionski kromatogram predstavlja grafički prikaz iz kojeg se dobivaju podaci o kvaliteti (retencijska vremena) i kvantiteti (površina pika). Svaka točka u ukupnom ionskom kromatogramu (TIC, engl. Total ion chromatogram) predstavlja zbir svih detektiranih iona. S druge strane, za svaku točku u memoriji kompjutera postoji cijeli maseni spektar dobiven SCAN tehnikom. Na bazi ovih podataka može se prikazati ionski kromatogram (IC). Njegovom upotrebom povećava se selektivnost kod pikova koji se preklapaju u velikoj mjeri. Skeniranje se najčešće izvodi brzinom od 0,5 do 1 scan/s. SCAN tehnika se više koristi pri kvalitativnoj analizi (Ivanov, 2008).

SIM tehnika se koristi u kvantitativnim određivanjima. Prije njene upotrebe, da bi se postigli optimalni uvjeti, mora se izvesti analiza SCAN metodom. SIM tehnikom detektiraju se vrijednosti m/z samo reprezentativnih iona promatranih molekula. Vrijeme praćenja iona je veće pa se samim tim povećava i osjetljivost čak od 100 do 1000 puta. Karakteristični ioni, vrijeme početka snimanja (start time) i vrijeme praćenja iona (dwell time) odabiru se na osnovu podataka

dobivenih pomoću SCAN tehnike. SIM tehnika se može koristiti i za kvalitativna određivanja komponenata u tragovima (Ivanov, 2008).

2.1.3. Povezivanje LC i MS metoda

Tijekom posljednjih godina kombinacija tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) i spektrometrije masa (engl. *tandem mass spectrometry*, MS/MS) (kombinacija koja je također poznata kao HPLC-MS/MS), postala je pouzdani analitički postupak. Međutim, postavljanje uređaja za HPLC-MS/MS je zahtjevno u smislu validacije analiza te robusnosti mjerenja.

Tijekom posljednjih nekoliko godina dvojni maseni spektrometri (engl. *tandem mass spectrometers*, MS/MS), također poznati kao “trostruki kvadropolni” maseni spektrometri, postali su značajni i pouzdani rutinski analitički uređaji. Ti su analizatori, osobito ako su povezani tehnikama pripreme uzorka temeljene na tekućinskoj kromatografiji visoke učinkovitosti (HPLC), omogućili provedbu kvantitativne i kvalitativne analize malih organskih molekula u femtomolskom rasponu (Seger i sur., 2007).

Spajanje HPLC i MS omogućuje analizu najrazličitijih spojeva, uključujući termički labilne analite i analite s visokom molekulskom masom gdje je analiza pomoću GC-MS nemoguća. Naime ovom metodom postignuto je kratko vrijeme analize i visoka učinkovitost razdvajanja spojeva. Nedostatak ove metode je njezina niska osjetljivost (Suárez i sur., 2008).

Jedna od značajnijih metoda je i HPLC s UV fluorescencijom, MS i tandem MS (MS / MS) detektori pokazali su se vrlo učinkovit. Navedeni detektori zbog visoke osjetljivosti osim određivanja molekulske mase imaju sposobnost analize fenolnih spojeva u maslinovom ulju, koji se u složenim uzorcima matriksa nalaze na razinama tragova.

Spajanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa ograničava otapala u HPLC-u na hlapljive puferne i organske aditive radi izbjegavanja taloženja soli u masenom spektrometru. Zbog toga su natrijevi/kalijeve fosfatni puferi, koji su bili često korišteni kao otapala u HPLC-UV, morali biti zamijenjeni amonijevim formijatom ili acetatima. (Seger i sur., 2007)

Uspješnost primjene HPLC-MS/MS sustava gdje MS služi isključivo kao detektor, zbog svoje osjetljivosti na kontaminaciju i bilo kakvu nestalnost okoline, uvelike ovisi o prethodnoj obradi uzorka i kontroliranim uvjetima u okolini.

Klimatizacija je u spektrometriji masa obvezatna, posebice ako je izabrana mala prostorija. Dovodi plina i zraka pod pritiskom moraju udovoljiti zahtjevima proizvođača koji mogu premašivati kvalitete uobičajene u rutinskoj laboratorijskoj okolini. Komplikacije u analizi složenih uzoraka “iz stvarnog svijeta” mogu nastati zbog kromatografskih interferencija, učinaka medija, tvorbi adukata i nakupina, te potiskivanja iona zbog konkurentnih metabolita ili drugih sastojaka matriksa. (Seger i sur., 2007)

Radni tok od primarnog neobrađenog uzorka do konačne otopine uzorka u bočici za HPLC mora se planirati isto toliko pažljivo kao i postavljanje kromatografskih uređaja koje predstavlja konačne korake pročišćavanja uzorka. Na temelju osjetljivosti dostupnoga masenog spektrometra, zatim odabranog pokusa, te poznavanja ciljne koncentracije analita koja se prati u uzorku potrebno je provesti ili predkoncentraciju uzorka ili razrjeđenje uzorka kao primarni korak u pripremi. Visoki povrat analita iz matriksa mora se postići kako bi se osigurala robusnost i preciznost analiza (Seger i sur., 2007).

Obvezan je i nadzor tlaka u kromatografskom sustavu jer je porast povratnog tlaka obično rani znak začepljenja kolona za HPLC zbog taloženja medija. Kolone za HPLC mogu se blokirati nakon dulje uporabe tako da preventivna zamjena može smanjiti isključenost uređaja iz rada (Seger i sur., 2007).

Kućište ionskog izvora treba često provjeravati radi vidljivih znakova kontaminacije, te redovito čistiti pokretne dijelove strojne podrške koji štite MS kako bi se izbjegla kontaminacija kvadropolova (Seger i sur., 2007).

Kvaliteta vakuuma ovisi o sustavu isisavanja; stoga se savjetuje česta provjera kvalitete ulja u prvom stupnju sisaljke. Osim navedenog važno je procijeniti postojanost svake mobilne faze i materijala za pripremu uzoraka, uključujući i matične otopine internog standarda, a pravila za pohranu uzoraka treba razviti ili primijeniti literaturne podatke (Seger i sur., 2007).

2.2. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Analitičke metode trebaju biti validirane kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Tako kaže »regulativa koja to i zahtijeva« zadnjih dvadesetak godina (Lazarić, 2012).

Hrvatska akreditacijska agencija ima uspostavljen, primijenjen i održavan sustav upravljanja, temeljen na zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17011, pripadnih normi i normativnih dokumenata, koji se neprekidno unapređuje i poboljšava (HAA, 2016).

- Zakon o akreditaciji NN 158/03
 - Ovim se Zakonom uređuje osnivanje i djelatnost tijela koje obavlja poslove nacionalne službe za akreditaciju, određuje područje u kojemu se provodi akreditacija te akreditacija u vezi s propisima o ocjenjivanju sukladnosti.
 - Definira se akreditacijsko tijelo i područje akreditacije.
- Zakon o izmjenama i dopunama zakona o akreditaciji NN 75/09
- Zakon o izmjenama i dopunama zakona o akreditaciji NN 56/13
 - Ovim se Zakonom (NN 5672013) utvrđuje okvir za provedbu Uredbe (EZ) br. 765/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 9. srpnja 2008. o utvrđivanju zahtjeva za akreditaciju i za nadzor tržišta s obzirom na stavljanje proizvoda na tržište. Ovaj zakon propisuje nacionalno akreditacijsko tijelo kao "Nadležno tijelo za provedbu Uredbe (EZ) br. 765/2008".

Akreditacija se obavlja u skladu s međunarodnim (ISO, ISO/IEC) i europskim (EN) normama, a koje su u Republici Hrvatskoj prihvaćene kao hrvatske norme (HRN) (HAA, 2016).

- Ispitni i umjerni laboratoriji **HRN EN ISO/IEC 17025**
- Certifikacijske organizacije za proizvode **HRN EN 45011**
- Certifikacijske organizacije za sustave upravljanja kvalitetom **HRN EN ISO/IEC 17021**
- Certifikacijske organizacije za sustave upravljanje okolišem **HRN EN ISO/IEC 17021**
- Certifikacijske organizacije za osobe **HRN EN ISO/IEC 17024**

- Nadzorne/inspekcijske organizacije **HRN EN ISO/IEC 17020**

Akreditaciju mogu provesti:

- **Ispitni laboratoriji** - ispitivanja i mjerenja radi određivanja danih svojstava i utvrđivanja sigurnosti industrijskih proizvoda, sigurnosti i kvalitete hrane, zaštite zdravlja građana, zaštite potrošača i zaštite okoliša
- **Umjerni laboratoriji** - umjeravanje mjerne i ispitne opreme
- **Certifikacijske organizacije** - usluge certifikacije:

proizvoda u skladu s normama za proizvode i prema određenim certifikacijskim shemama sustava upravljanja kvalitetom (HRN EN ISO/IEC 9001) sustava upravljanja okolišem (HRN EN ISO 14001) drugih sustava upravljanja (sigurnost, zdravlje) osoba (ocjenitelji za sustave kvalitete, zavarivači, ispitivači za ne razorna ispitivanja).

- **Nadzorne/inspekcijske organizacije** - inspekcija u građevinarstvu, proizvodnji tlačne opreme, ekološkoj poljoprivredi, distribuciji goriva, ovjeri mjerila, području motornih vozila i drugim područjima.

Akreditacija je postupak službenog priznanja mjerodavne državne ustanove o osposobljenosti za obavljanje zahtjeva ispitivanja i kontrole (hrane) (HAA, 2016).

2.2.1. Osnovna načela validacije analitičkih metoda

Validacija analitičkih metoda je postupak kojim dokazujemo da naša metoda služi svrsi koju smo joj namijenili, pa je prije svega potrebno znati odnosno definirati svrhu same metode. Nakon toga vrši se utvrđivanje postupaka, tj. planiraju se i provode eksperimenti čije rezultate treba prikupiti i prikazati kao dokaze o prikladnosti metode. Sigurno je da se isti postupci neće primjenjivati na sve metode – različito se pristupa validaciji kvalitativnih i kvantitativnih metoda; razlikuju se postupci validacije metode kojom se određuje analit koji dominira u uzorku i one kojom se određuju tragovi u kompleksnoj matrici (Tablica 2). Svakoju se metodi pristupa

individualno, procjenjuje se što treba napraviti za dokaz svrhovitosti. I struka i regulativa i zakonodavstvo prihvatili su osam osnovnih parametara, tj. izvedbenih značajki validacije:

- specifičnost /selektivnost
- linearnost
- područje
- preciznost – ponovljivost, eng. repeatability – međupreciznost (eng. intermediate precision) – obnovljivost (eng. reproducibility)
- točnost (eng. trueness)
- granica kvantifikacije
- granica detekcije
- stabilnost

Kombinacijom tih parametara formira se plan validacije za svaku metodu.

Specifičnost /selektivnost je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit. Metoda kojom se može određivati više komponenata istodobno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom. Selektivnost je nezaobilazan parametar za validaciju većine metoda. U praksi se dokazuje usporedbom odziva metode na referencijski materijal i analit u uzorku.

Linearnost je određena kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva metode na različite poznate koncentracije referencijskog materijala; preporučuje se najmanje pet koncentracijskih razina uz tri ponavljanja.

Područje je raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita (granice su uključene) u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost. Za određivanje područja neke metode nije potrebno provoditi zasebne eksperimente, nego se zaključci izvode iz studije linearnosti.

Preciznost se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje razlikujemo:

- preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost – pri čemu uvjeti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu, kratko razdoblje.
- međupreciznost – preciznost koja se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti, kolone, reagensi iz različitih boca i različitih dobavljača).

Istinitost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referencijske vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta. Istinitost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina:

- usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim uhodanom referencijskom metodom
- analizom uzorka poznate koncentracije, npr. certificiranoga referencijskog materijala i usporedbom izmjerenih rezultata i certificiranih vrijednosti
- cijepljenjem matrice ili uzorka poznatom koncentracijom referencijskog materijala.

Granica detekcije/kvantifikacije najmanja je količina analita u uzorku koja se može detektirati/kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Određuje se razrjeđivanjem osnovne otopine.

Robusnost se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode (Lazarić, 2012).

Tablica 2. Parametri za validaciju analitičkih metoda različitih namjena (Lazarić, 2012)

	Identifikacijski testovi	Analiza tragova		Analiza udjela
		Kvantitativna	Limit Test	
Istinitost	ne	da	ne	da
Ponovljivost	ne	da	ne	da
Međupreciznost	ne	da	ne	da
Selektivnost	da	da	da	da
Granica detekcije	ne	ne	da	ne
Granica kvantifikacije	ne	da	ne	ne
Linearnost	ne	da	ne	da
Područje	ne	da	ne	da

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za razvoj i validaciju metode za određivanje polifenola korištena su 4 uzorka djevičanskog maslinovog ulja s hrvatskog tržišta (Uzorak 1- 4). Validirana metoda korištena je za određivanje udjela i sastava fenolnih spojeva djevičanskih maslinovih ulja s područja Istre. Analizirana su tri ulja označena kao Istra 1, 2 i 3.

Svi uzorci su do analize čuvani u malim bočicama od 25 mL bez prostora iznad ulja na - 20°C u mraku kako ne bi došlo do promjene fenolnog sastava.

3.1.2. Reagensi

Svi reagensi i otapala koji su se koristili bili su najmanje HPLC stupnja čistoće. U izradi ovog rada kao reagensi korišteni su:

- voda
- metanol
- mravlja kiselina

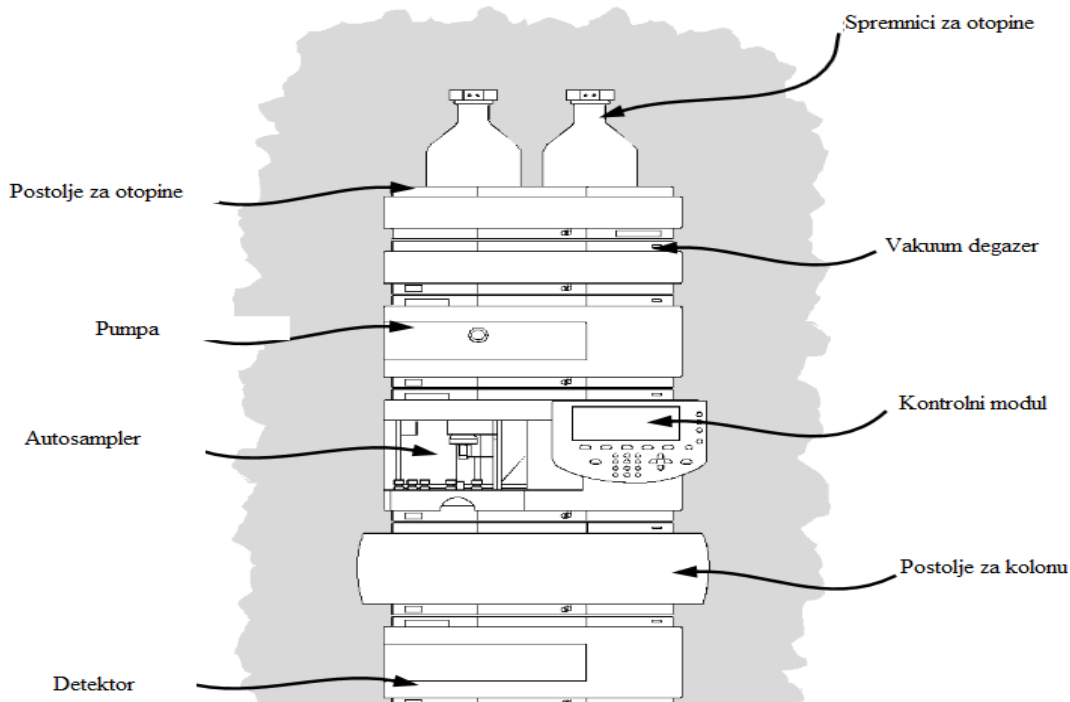
Kako bi se stvorila baza podataka prema kojoj će se kasnije identificirati spojevi u matriksu korištene su slijedeći standardi .

- 4-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- apigenin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- elaginska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- ferulinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- galna kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- genska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

- hidroksitirozol (Extrasyntheses, Genay, Francuska)
- kavska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- klorogenska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- luteolin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- oleuropein (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- protokatehinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- salicilna kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- siringaldehid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- siringinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- tirozol (Extrasyntheses, Genay, Francuska)
- *trans*-cimetna kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- vanilin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- vanilinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

3.1.3. Aparatura

Razdvajanje fenolnih spojeva je provedeno na C18 nepolarnoj koloni (Luna 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, SAD) instaliranoj na Agilent Technologies HPLC 1200 Series sustav sa binarnom pumpom, autosemplerom, DAD detektorom (Slika 8) i kvadropolom Agilent Technologies MS 6130 Series s ESI ionizacijom.



Slika 8. Prikaz HPLC sustava (Agilent Technologies, 2016)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Za ekstrakciju fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja korištena je metoda Međunarodnog vijeća za masline (IOC, 2009) koja se temelji na neposrednoj ekstrakciji polarnih spojeva maslinovog ulja pomoću otopine metanola. Siringinska kiselina se koristi kao interni standard. Otopina eksternog standarda, smjesa tirosola ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) i siringinske kiseline ($15 \mu\text{g ml}^{-1}$) korištena je kako bi se koncentracija ukupnih i pojedinačnih fenola izrazila u $\text{mg tirosola kg}^{-1}$ ulja (IOC, 2009).

U epruvetu od 10 ml odvaže se 4 g maslinovog ulja te se doda 1 ml otopine siringinske kiseline ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$). Epruveta se zatvori gumenim čepom te snažno protrese 30 sekundi.

U epruvetu se doda 5 ml otopine metanol/voda (80/20) te ponovno protrese 1 minutu. Fenolni spojevi se ekstrahiraju uz pomoć ultrazvučne kupelji 15 min na sobnoj temperaturi, a nakon toga se metanolni sloj odvoji centrifugiranjem na 5000 o min^{-1} kroz 25 minuta. Dobiveni supernatant se pomoću plastične šprice propusti kroz $0,45 \text{ um}$ PVDF filter. Filtrirani uzorak pomoću pipete prebaci se u staklene bočice za analizu.

- Priprema otopine eksternog standarda kalibracije

Pomoću analitičke vage odvagano je $0,03006 \text{ g}$ tirosola i $0,01501 \text{ g}$ siringinske kiseline u tikvicu od 10 ml . Tikvica je do oznake nadopunjena prethodno pripremljenom otopinom metanol/voda 80/20 (V/V). Od pripremljene otopine otpipetira se $100 \text{ }\mu\text{l}$ u tikvicu od 10 ml . Tikvica je nadopunjena do oznake otopinom metanol/voda 80/20. Dobivene koncentracije kalibracijskih otopina su: tirosol $0,03006 \text{ mg ml}^{-1}$, siringinska $0,01501 \text{ mg ml}^{-1}$. Otopine se čuvaju na $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (IOC, 2009).

- Priprema otopine internog standarda

Od prethodno pripremljene otopine siringinske kiseline koncentracije $0,01501 \text{ mg ml}^{-1}$ odpipetiran je 1 ml u tikvicu od 100 ml . Tikvica je nadopunjena do oznake otopinom metanol/voda 80/20. Finalna koncentracija otopine ostala je nepromijenjena. Otopina je čuvana na $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (IOC, 2009).

3.2.2. Separacija fenolnih spojeva na HPLC-u

Razdvajanje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz maslinovog ulja provedeno je na C18 nepolarnoj koloni (Luna $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$, $100 \text{ }\text{\AA}$, Phenomenex, Torrance, SAD) instaliranoj na Agilent Technologies (LC 1200) HPLC sustav. Kao mobilna faza korištene su $0,1 \text{ \%}$ otopina mravlje kiseline u vodi (mobilna faza A) i $0,1 \text{ \%}$ otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B).

Za razvoj metode korištena je otopina 24 fenolna spoja: galna kiselina ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), klorogenska ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), gentska ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), kavaska ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), vanilin ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), siringaldehid ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), *p*-kumarinska ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), ferulinska ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), siringinska ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), oleuropein ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), salicilna ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), hidroksitirosol ($30 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), protokatehinska

(30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), tirosol (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 4-hidroksibenzojeva (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), vanilinska (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), t-cimetna (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), sinapinska (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), ružmarinska (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), apigenin (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), elaginska (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), luteolin (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), pinoresinol (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Fenolni spojevi korišteni za pripremu otopine pripremljeni su iz postojećih koncentrata razrjeđivanjem s 80% metanolom. Kako bi se dobilo zadovoljavajuće razdvajanje fenolnih spojeva, optimirani su parametri metode i to brzina protoka otapala, gradijent (Tablica 3), temperatura kolone te količina injektiranog uzorka. Nakon optimiranja navedenih parametara, odabrana je metoda koja je korištena za razdvajanje fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja.

- Protok otapala: 1 ml min⁻¹
- Gradijent
 - A 0,1% mravlja kiselina u vodi
 - B 0,1% mravlja kiselina u metanolu

Tablica 3: Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine B (%)
0	10
3	10
30	50
40	60
45	100
50	100
50,1	10
60	10

- Temperatura kolone 30 °C
- Količina injektiranog uzorka 20 μl

3.2.3. Identifikacija fenola pomoću UV detektora

Za UV detekciju polifenola korišten je DAD detektor (Agilent Technologies 1200 Series (Slika 9). Tijekom cijelog vremena trajanja analize snimani su UV spektri od 190 - 400 nm. UV spektri standarada korišteni su za izradu knjižnice spektara fenolnih spojeva. Fenolni spojevi

djevičanskih maslinovih ulja identificirani su usporedbom retencijskih vremena s retencijskim vremenima standarada, a kao dodatna potvrda korišteni su spektri iz formirane knjižnice.



Slika 9. Prikaz DAD detektora (Agilent Technologies, 2016)

Uvjeti rada DAD detektora

- Valne duljine snimanja DAD detektora 280nm i 330nm
- Područje snimanja spektra od 190- 400nm
- Slit 4nm

3.2.4. MS – analiza

MS analiza provedena je na uređaju Agilent Technologies MS 6130.

Nakon prolaska kroz HPLC kolonu mobilna faza dovodi uzorak kapilarom do MS uređaja. Uzorak se uvodi u ionizator, a nakon toga u analizator u kojem dolazi do razdvajanja iona. Razdvojeni ioni odlaze na detektor. Kako bi se postigli optimalni uvjeti detekcije optimirani su parametri fragmentora i kapilarne voltaže.

Analizom dobivenih rezultata odabrani su uvjeti:

- kapilarna voltaža 3500 V
- fragmentor 150 V

Osim samih uvjeta napravljen je i izbor ionizacije. Iako uređaj omogućava korištenje obje ionizacije ta mogućnost se eliminirala zbog pojave smanjenja selektivnosti te se odabrala ESI ionizaciju koja je pokazala veću učinkovitost.

3.2.5. Kvantifikacija fenolnih spojeva

Za kvantifikaciju detektiranih spojeva korišteni su kromatogrami snimljeni DAD detektorom na 280 i na 330 nm. Spojevi su kvantificirani usporedbom odziva internog standarda s odzivom svakog pojedinog pika (formula [2]). Kako bi se rezultati mogli izraziti kao udio tirosola, svaki dan je prije početka rada injektiran eksterni standard koji je smjesa tirosola (0,030 mg ml⁻¹) i siringinske kiseline (0,015 mg ml⁻¹). Iz dobivenih vrijednosti površina ispod pikova izračunati su faktori odziva (RF) i omjer faktora odziva (RRF) tirosola i siringinske kiseline prema formulama [2] – [4].

$$\text{koncentracija fenolnog spoja (mg/kg)} = \frac{A \times 1000 \times RRF_{sir/tir} \times w_{sir}}{A_{sir} \times w} \quad [2]$$

gdje je:

A - površina ispod pika pojedinog fenolnog spoja

A_{sir} - površina ispod pika siringinske kiseline

w_{sir} - masena siringinske kiseline (mg) dodane uzorke u 1 mL otopine internog standarda

w - masa ulja korištenog za analizu (g)

RRF_{sir/tir} – korekcijski faktor za izražavanje rezultata preko tirosola (formula [3])

$$RRF_{sir/tyr} = \frac{RF_{1\mu g}(\text{siringinska kiselina})}{RF_{1\mu g}(\text{tirosol})} \quad [3]$$

gdje je

RF_{1μg} (siringinska kiselina) – faktor odziva siringinske kiseline koji se računa po formuli [4]

$$RF_{1\mu g}(\text{siringinska kiselina}) = \frac{\text{površina pika siringinske kiseline}}{\mu g \text{ injektirane siringinske kiseline}} \quad [4]$$

RF_{1μg} (tirosol) - faktor odziva tirosola koji se računa po formuli [5]

$$RF_{1\mu g}(\text{tirosol}) = \frac{\text{površina pika tirosola}}{\mu g \text{ injektiranog tirosola}} \quad [5]$$

3.2.6. Validacija

3.2.6.1. Definicija metode - svrha i namjena

Metoda za određivanje sastava i koncentracije fenolnih spojeva u djevičanskom maslinovom ulju razvijana je u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti, Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sastav fenola se određuje prema referentnim standardima, dok se koncentracija određuje usporedbom površina ispod pika svakog pojedinog fenolnog spoja s površinom ispod pika internog standarda poznate koncentracije.

3.2.6.2. Opis opreme i materijala

Potrebni materijali: - standardi fenolnih kiselina

- uzorci djevičanskog maslinovog ulja

Oprema i ostali materijal potreban za validaciju navedeni su u opisu metode.

3.2.6.3. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti

Tablica 4. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Selektivnost	Informacija
Točnost	$k \geq 0,99$
Preciznost -ponovljivost mjerenja Vremena zadržavanja Površine ispod pika - ponovljivost pripreme uzorka - međupreciznost	$RSD \leq 0,5\%$ $RSD \leq 5,0\%$ $RSD \leq 5,0\%$ $RSD \leq 5,0\%$
Linearnost	$k \geq 0,99$
Stabilnost mjernih otopina	Informacija

Parametri validacije i kriteriji prihvatljivost odabrani su prema preporukama danim u IOC metodi (2009) za ponovljivost preciznost (Tablica 4). Točnost i linearnost su parametri gotovo uvijek određivani u validaciji neke metode a kriteriji prihvatljivost odabrani su iskustveno.

3.2.6.4. Opis izvođenja validacijskih eksperimenata

Selektivnost

Selektivnost je mogućnost metode da pod određenim uvjetima točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata koje možemo očekivati u matriksu uzorka.

Selektivnost ispitivane metode provedena je pripremom otopine svih standarada. Pripremljena otopina analizirana je pod zadanim uvjetima metode.

Linearnost

Za analizu linearnosti provesti mjerenje na pet ili više koncentracijskih razina. Prema propisu pripremljene su tri odvage nominalne koncentracije ($1009 \mu\text{g ml}^{-1}$, $1010 \mu\text{g ml}^{-1}$, $1002 \mu\text{g ml}^{-1}$). Kako bi se dobile koncentracijske razine svaka od nominalnih koncentracija razrijeđena je 2, 5, 10, 20, 40, 100 i 200 puta. Pripremljene otopine injektiraju se u kromatografski sustav. Otopine je potrebno injektirati dva puta i izračunati srednju vrijednost površina, odrediti jednadžbu regresijskog pravca, nagib, odsječak te koeficijent korelacije. Rezultate prikazati grafički.

Točnost

Točnost metode ispitati na pet odvaga matriksa cijepljenog odgovarajućim volumenima otopine standarda tirosola u nominalnoj koncentraciji ($150 \mu\text{g ml}^{-1}$) tako da se postigne raspon od 50 – 150% tirosola. Iz podataka za priređene koncentracije i pripadajućih odgovora detektora za površine linearnom regresijom izračunati srednju vrijednost koncentracije, iskorištenje i RSD. Konstituirati pravac i odrediti korelaciju izmjerenih vrijednosti u odnosu na dodanu količinu tirosola.

Preciznost

- Ponovljivost mjerenja

Ponovljivost mjerenja ispitati višestrukim injektiranjem iste otopine standarda tirosola. Izračunati srednju vrijednost i RSD dobivenih površina pikova.

- Ponovljivost pripreme uzoraka

Ponovljivost pripreme uzorka ispitati višestrukom pripremom uzorka ekstrakata fenolnih spojeva djevičanskih maslinovih ulja s tržišta (Uzorci 1, 2 i 3). Provesti LC/MS analizu pripremljenih ekstrakata. Izračunati srednje vrijednosti i RSD dobivenih udjela ukupnih polifenola.

- Međupreciznost

Dva analitičara u periodu od nekoliko dana prepremiti po tri fenolna ekstrakta istog uzorka ulja (Uzorak 4). Odrediti udjel ukupnih polifenola u uzorku injektiranjem pripremljenih ekstrakata. Izračunati srednju vrijednost i RSD dobivenih rezultata.

Stabilnost mjernih otopina

Stabilnost mjernih otopina uzorka ispitati injektiranjem uzorka u periodu unutar tjedan dana. Pripremljen ekstrakt polifenola istog uzorka razdijeliti u 13 staklenih bočica. Jednu staklenu bočicu odmah injektirati u LC/MS. Ostale uzorke rasporediti u tri skupine po četiri uzorka te skladištiti u mraku na sobnoj temperaturi, na temperaturi hladnjaka (+4 °C) te na temperaturi zamrzivača (-20 °C). Svaki uzorak injektirati dva puta i izračunati srednju vrijednost injektiranja. Odrediti optimalnu temperaturu i maksimalno vrijeme skladištenja pripremljenih fenolnih ekstrakata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Fenolni spojevi najznačajniji su antioksidansi u hrani, a njihova antioksidacijska aktivnost ima pozitivan učinak na zdravlje sprečavajući oksidacijski stres, a i time razvoj bolesti (Suárez i sur., 2008). Iako se njihovo sustavno istraživanje provodi već nekoliko desetljeća, određivanje fenola djevičanskog maslinovog ulja predstavlja izazov analitičarima zbog specifičnog sastava. Većinu fenola djevičanskog maslinovog ulja čine sekoiridoidi (Servili i Montedoro, 2002), specifični spojevi čija je identifikacija standardnim metodama i detektorima otežana zbog nedostatka komercijalno dostupnih standarada. S obzirom da je na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo nedavno nabavljen LC/MS uređaj koji bi mogao olakšati identifikaciju specifičnih fenola za koje ne postoje komercijalno dostupni standardi, cilj ovog rada bio je razviti i validirati metodu za određivanje fenola djevičanskog maslinovog ulja.

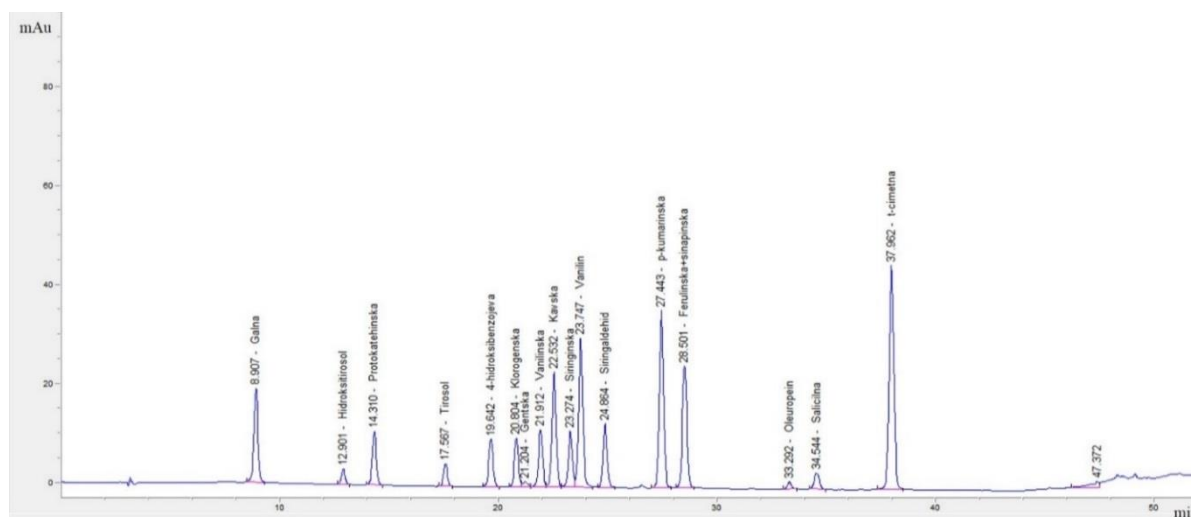
4.1. RAZVOJ METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLA U MASLINOVIM ULJIMA

Za identifikaciju i određivanje polifenola u maslinovom ulju kao tehnika odabrana je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u kombinaciji s UV detekcijom i masenom spektrometrijom (LC/MS).

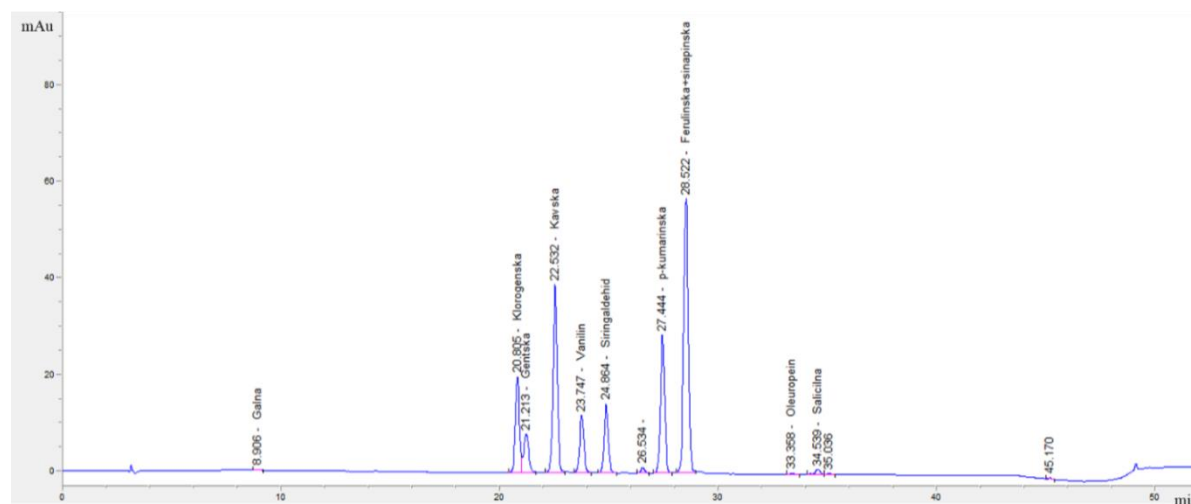
Za LC/MS metodu odlučilo se zbog brojnih prednosti spektrometrije mase koje se navode u literaturi kao što su: niska granica detekcije, selektivnost, mogućnost analize velikog broja uzoraka u kratkom vremenu te financijske isplativosti. MS analizatori povezani sa tehnikama pripreme uzoraka temeljene na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti omogućavaju provedbu kvalitativne i kvantitativne analize malih organskih molekula (Seger i sur., 2007).

Isto tako za LC analizu umjesto moguće GC (gass chromatography) analize odlučilo se iz sljedećeg razloga: ciljani spojevi ovog istraživanja su fenolni spojevi koji su po svojoj prirodi polarni spojevi. U slučaju GC analize polarnih spojeva potrebno je provesti derivacijski korak kako bi ona uopće bila moguća (Suárez i sur., 2008). Zaključilo se da bi taj korak uzrokovao nepotrebnu manipulaciju uzorkom te da će LC analiza dati zadovoljavajuće rezultate.

Nakon odabira tehnike regulirani su i parametri razdvajanja. Molekule polifenola u svojoj strukturi imaju hidroksilne i karboksilne skupine te ugljikovodične lance pa je za razdvajanje izabrana C18 kolona obrnutih faza. Za razdvajanje fenolnih spojeva korištena je gradientna kromatografija u kojoj su se koristili različiti omjeri mravlje kiseline u vodi i mravlje kiseline u metanolu u različitim omjerima tijekom trajanja analize. U optimiranje parametara metode uključena je i temperatura pri kojoj se provodi analiza i odabrana je temperatura kolone od 30 °C zbog najboljeg razdvajanja pikova. Fenolni spojevi razdvojeni na koloni snimani su na dvije valne duljine pomoću DAD detektora, 280 nm i 330 nm, te su dobiveni kromatogrami prikazani na slikama 10 (280 nm) i 11 (330 nm).



Slika 10. Kromatogram smjese fenolnih spojeva snimljen na valnoj duljini od 280 nm



Slika 11. Kromatogram smjese fenolnih spojeva snimljen na valnoj duljini od 330 nm

Spojevi djevičanskih maslinovih ulja identificirati će se usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja standarada (Tablica 5). Osim toga, tijekom cijelog vremena trajanja analize snimani su UV spektri detektiranih spojeva (od 190-400 nm) te je generirana knjižnica podataka koja će kasnije biti korištena za pomoć pri identifikaciji spojeva.

Tablica 5. Vremena zadržavanja fenolnih spojeva korištenih za razvoj metode

Fenolni spoj	Vrijeme zadržavanja (min)
Galna kiselina	8,980
Hidroksitirosol	13,100
Protokatehinska kiselina	14,450
Tirosol	17,760
4- hidroksibenzojeva kiselina	19,850
Klorogenska kiselina	21,070
Gentska kiselina	21,560
Vanilinska kiselina	22,110
Kavska kiselina	22,700
Siringinska kiselina	23,520
Vanilin	23,880
Siringaldehid	25,050
<i>p</i> -kumarinska kiselina	27,640
Ferulinska kiselina + sinapinska kiselina	28,700
Oleuropein	33,740
Elaginska kiselina	34,140
Salicilna kiselina	34,940
Pinoresinol	35,510
<i>trans</i> -cimetna kiselina	38,370
Luteolin	42,160
Apigenin	45,080

Nakon optimiranja parametara tekućinske kromatografije i UV detekcije, u sustav je spojen spektrometar masa (MS) kojem je također bilo potrebno optimirati parametre analize. Nakon optimiranja, odabrana je kapilarna voltaža od 3500 V i jačina fragmentora od 150 V. Prilikom korištenja ovih uređaja javlja se problem kontaminacije, interferencije, učinka medija, tvorbi raznih nakupina te potiskivanja iona zbog drugih sastojaka matriksa. Stoga možemo reći da ovaj uređaj pokazuje visoku osjetljivost na kontaminaciju (Seger i sur., 2007). Iz navedenog razloga tijekom analize često je provođeno čišćenje uređaja prema uputama proizvođača. Osim

navedenih parametara odabrano je područje i način snimanja spektra. Standardi korišteni za razvoj metode snimani su u SCAN načinu rada detektora snimajući molarne mase od 100-1000, a snimani su i pozitivni i negativni molekulski ioni. Molarne mase molekulskih iona standarada korištenih u razvoju metode prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Molarne mase fenolnih spojeva korištenih za razvoj metode

Fenolni spoj	Molekulski ion	
	Pozitivan [M+H] ⁺	Negativan [M-H] ⁻
Galna kiselina	/	169,1
Hidroksitirozol	/	153,2
Protokatehinska kiselina	/	153,1
Tirozol	/	137,2
4- hidroksibenzojeva kiselina	/	/
Klorogenska kiselina	/	353,1
Gentska kiselina	/	153,1
Vanilinska kiselina	/	/
Kavska kiselina	/	179,1
Siringinska kiselina	/	/
Vanilin	/	/
Siringaldehid	/	/
<i>p</i> -kumarinska kiselina	/	163,2
Ferulinska kiselina + sinapinska kiselina	/	/
Oleuropein	/	539,3
Elaginska kiselina	/	/
Salicilna kiselina	/	137,1
Pinoresinol	/	357,4
<i>trans</i> -cimetna kiselina	/	147,1
Luteolin	/	286,1
Apigenin	/	269,1

Iz rezultata prikazanih u tablici 6 vidljivo je kako masenim detektorom nisu određeni molekulski ioni za 4-hidroksibenzojevu, vanilinsku, siringinsku, ferulinsku, sinapinsku i elaginsku kiselinu te za vanilin i siringaldehid, iako su ti standardi u istim koncentracijama detektirani DAD detektorom. Razlog tome može se pronaći u lošijoj ionizaciji ovih spojeva ili

pak u njihovoj interferenciji s matriksom. Svi ostali standardi detektirani spektrometrom masa vidljivi su kao negativni molekulski ioni. Stoga je za analizu fenolnih spojeva djevičanskog maslinovog ulja korišteno samo snimanje negativnih molekulskih iona. Također, iz dobivenih rezultata vidljivo je kako najveću molekulsku masu ima negativno nabijen ion oleuropeina (539,3). Kako bi se poboljšala osjetljivost masenog detektora u SCAN načinu rada, smanjeno je područje snimanja na molarne mase od 100-550.

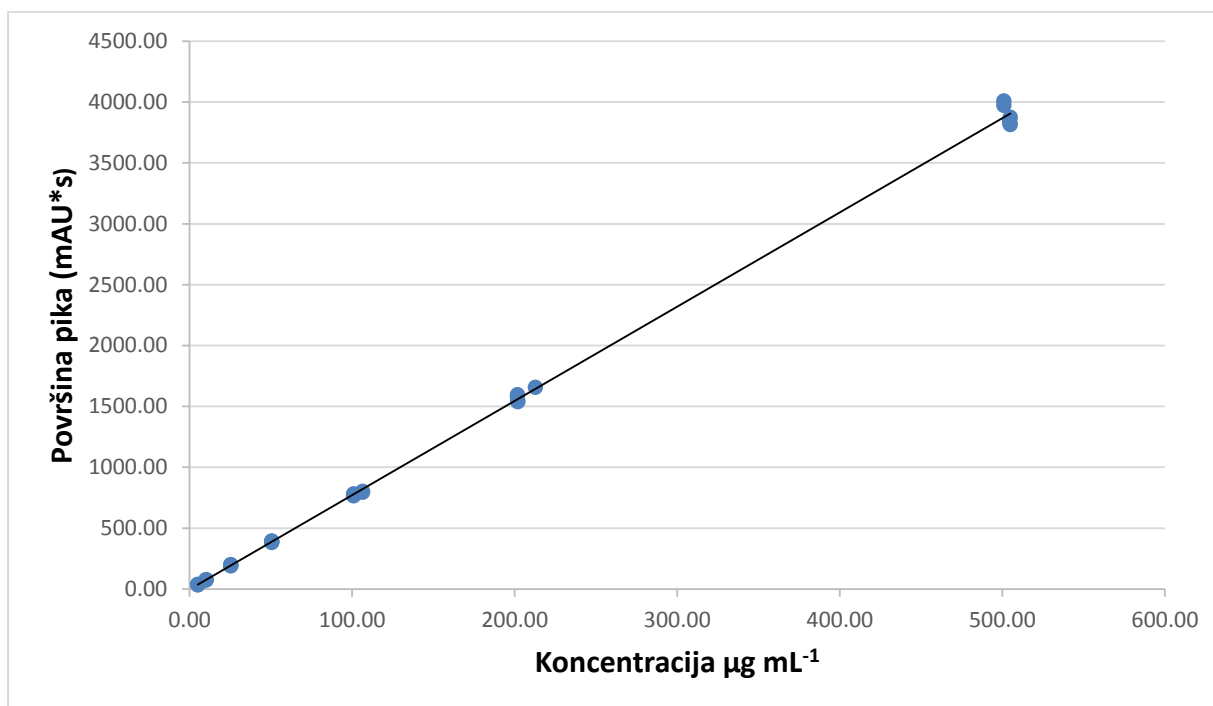
Nakon definiranja optimalnih uvjeta tekućinske kromatografije, UV i masenog detektora, definirana je metoda podvrgnuta postupku validacije.

4.2. VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLA U MASLINOVOM ULJU

Analitičke metode trebaju biti validirane kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. To je postupak kojim se dokazuje da odabrana metoda služi svrsi koja joj je namijenjena. U svrhu validacije metode za određivanje polifenola u maslinovom ulju ispitani su selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, te stabilnost otopina.

Selektivnost je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja (Lazarić, 2012). Dobra selektivnost metode postignuta je optimiranjem parametra kromatografije i parametara detektora (DAD i MS). Pregledom kromatograma prikazanih na slikama 10 i 11 može se utvrditi vrlo dobro razdvajanje pikova. Iz kromatograma je vidljivo kako dolazi do koeluiranja samo kod ferulinske i sinapinske kiseline. Zbog vrlo slične molekulske strukture (razlika između te dvije fenolne kiseline je samo u jednoj metoksi skupini vezanoj na benzenski prsten) i posljedično vrlo sličnoj polarnosti tih dviju molekula, optimiranjem uvjeta kromatografije nije bilo moguće dobiti njihove zasebne pikove. Vremena zadržavanja svih 24 standarda korištenih za razvoj metode prikazana u tablici 5 također nam daju informaciju o dobroj selektivnosti definirane metode.

Pojam linearnosti definira se kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje ispitne rezultate, u ovom slučaju površinu ispod pika, proporcionalne koncentraciji analita u uzorku (Lazarić, 2012). U tu svrhu pripremljene su tri serije uzoraka različitih koncentracija analita na sedam koncentracijskih razina. Kalibracijska krivulja prikazuje ovisnost površina pikova tirosola dobivenih u kromatogramima standarda o njegovoj koncentraciji (Slika 12). Jednadžba pravca dobivena je linearnom regresijom metodom najmanjih kvadrata te je prikazana u tablici 7. Iz grafičkog prikaza zavisnosti površine o koncentraciji pripremljene otopine tirosola (Slika 12) vidljiva je dobra linearnost ove metode u području od $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $505 \mu\text{g mL}^{-1}$, što potvrđuje i koeficijent korelacije koji iznosi 0,999196.

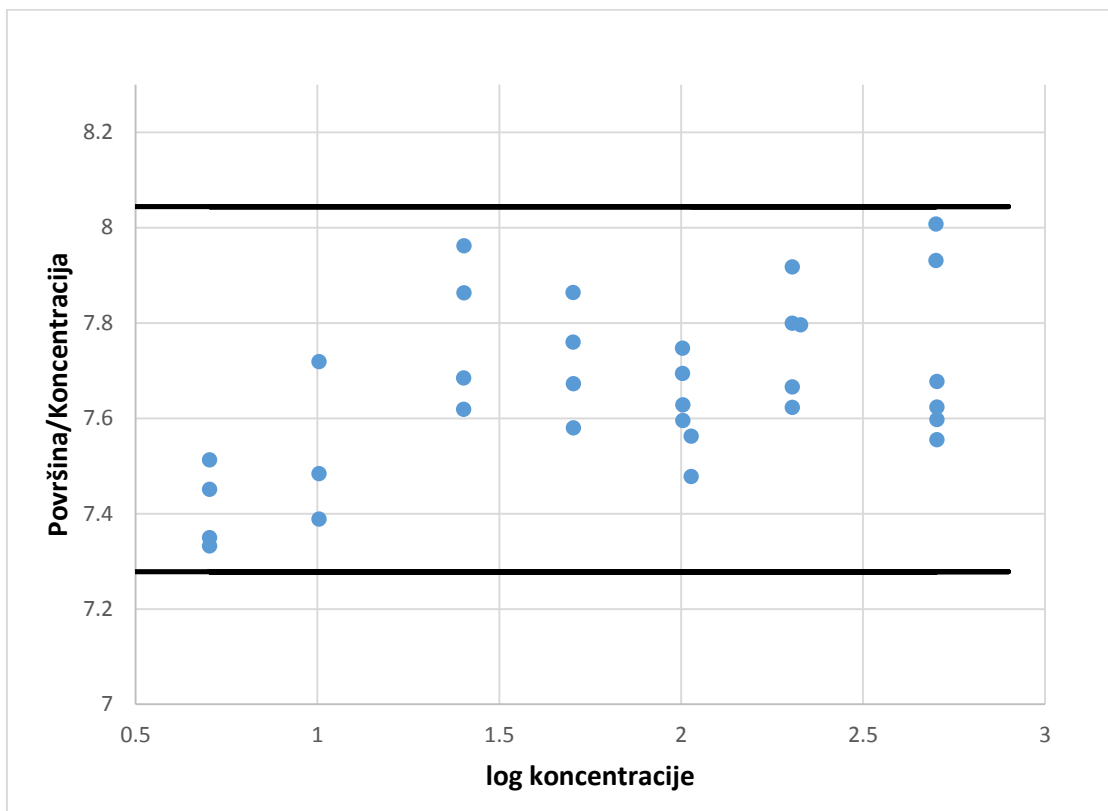


Slika 12. Grafički prikaz zavisnosti površine pika tirozola o koncentraciji pripremljene otopine

Tablica 7. Rezultati zavisnosti površine pika tirozola o koncentraciji pripremljene otopine dobiveni regresijskom analizom

Jednadžba pravca	$y = 7,737x - 2,487$
Nagib	7,737
Odsječak	-2,486683
Broj mjerenja	15
Koeficijent korelacije	0,9992

Iz rezultata za linearnost grafički je prikazano područje linearnosti koje predstavlja odnos omjera površina/koncentracija i log koncentracije (Slika 13). Iz prikaza je vidljivo kako je metoda linearna u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija (od 5 do 505 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



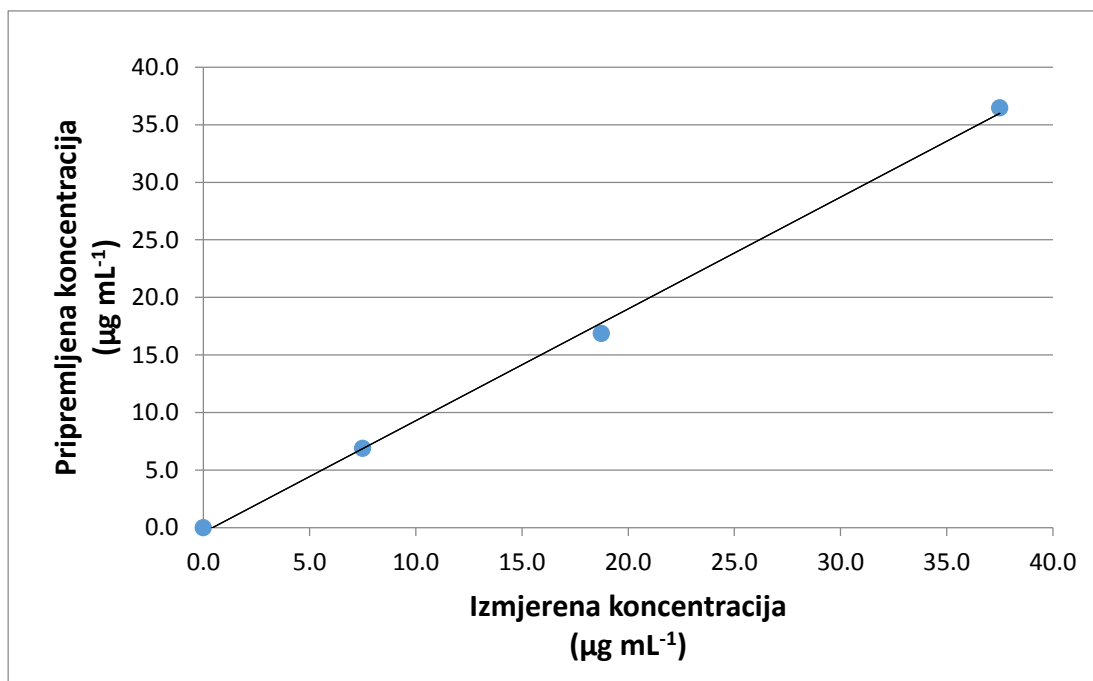
Slika 13. Prikaz područja linearnosti

Točnost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta (Lazarić, 2012). Točnost je određena analizom otopina tirosola poznatih koncentracija na četiri koncentracijske razine unutar područja linearnosti metode. Za svaku koncentraciju izvršena su tri mjerenja. Iz dobivenih površina ispod pikova tirosola izračunata je koncentracija pomoću jednadžbe pravca konstruirane prilikom određivanja linearnosti metode. Određen je analitički prinos kao omjer srednje vrijednosti izmjerene koncentracije i stvarne koncentracije te je izražen kao postotak. Iz dobivenih vrijednosti izračunato je relativno standardno odstupanje (RSD vrijednost) koja iznosi 3,30% (Tablica 8) što je unutar prihvatljivih vrijednosti zadanih validacijskim protokolom.

Tablica 8. Točnost metode za analizu sadržaja tirosola

Pripremljena koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Izmjerena koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Analitički prinos (%)
37,50	36,45	97,21
18,75	16,88	90,03
0,00	0,00	100,00
7,50	6,88	91,72
srednja vrijednost		94,74
RSD %		3,30

Rezultati su prikazani i grafički (Slika 14) kao odnos pripremljene i izmjerene koncentracije te se regresijskom analizom izrazila jednadžbu pravca (Tablica 9). Dobiveni koeficijent korelacije iznosi 0,9984 što pokazuje dobru točnost ispitivane metode.



Slika 14. Grafički prikaz odnosa pripremljene i izmjerene koncentracije

Tablica 9. Rezultati dobiveni regresijskom analizom za točnost

Jednadžba regresijskog pravca	$y = 0,9717x - 0,4336$
Nagib	0,9717
Odsječak	-0,4336
Koeficijent korelacije	0,9984
Broj mjerenja	5

Preciznost pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri istim uvjetima. Obično se provodi pet ili više mjerenja na 2-3 različite koncentracije. Izražava se kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Može biti iskazana kao repetabilnost (ponovljivost), međupreciznost i obnovljivost (reproducibilnost) (Lazarić, 2012).

Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument i laboratorij) u kratkom vremenskom periodu (Lazarić, 2012).

Ponovljivost pripreme standarda ispitana je uzastopnim injektiranjem otopine tirosole poznate koncentracije koja se nalazi unutar koncentracijskog područja linearnosti. Rezultati kao i RSD vrijednosti prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Podatci o ponovljivosti mjerenja za standard tirosole

Redni broj injektiranja	Vrijeme zadržavanja (min)	Površina (mAU*s)
1	17,56	358,55
2	17,63	351,55
3	17,64	341,23
4	17,64	326,96
5	17,67	327,44
Srednja vrijednost	17,63	341,14
RSD%	0,20	3,71

Iz rezultata je vidljivo kako nema značajnih odstupanja u vremenima zadržavanja standarda a i sva su izmjerena vremena zadržavanja unutar 0,1 min. Dobru ponovljivost pokazuje i RSD

vrijednost koja je unutar zadanih granica prihvatljivosti ($\leq 0,5\%$). Izračunata je i RSD vrijednost za površinu ispod pika tirosola te ona iznosi 3,71% što također ulazi u zadane granice prihvatljivosti ($\leq 5\%$).

Ponovljivost pripreme uzorka za određivanje polifenola ispitana je pomoću tri ulja kupljena na tržištu. Od svakog ulja pripremljena su po tri fenolna ekstrakta, a svaki ekstrakt injektiran je dva puta po zadanoj metodi. Iz dobivenih rezultata (Tablica 11) izražene su srednje i RSD vrijednosti za svaki analizirani uzorak. RSD vrijednost iznose od 2,99 do 4,41 što je unutar granice prihvatljivosti određene validacijskim protokolom (Tablica 4).

Tablica 11. Koncentracija polifenola uzoraka djevičanskog maslinovog ulja s tržišta korišteni za određivanje ponovljivosti pripreme uzorka

Broj mjerenja	Koncentracija ukupni polifenola mg kg ⁻¹		
	Uzorak* 1	Uzorak 2	Uzorak 3
1	347,50	324,19	364,74
2	370,80	353,44	334,44
3	378,80	329,24	328,43
4	373,82	324,60	340,24
5	371,98	320,98	333,17
6	364,94	352,15	325,67
Srednja vrijednost	367,97	334,10	337,78
RSD%	2,99	4,41	4,19

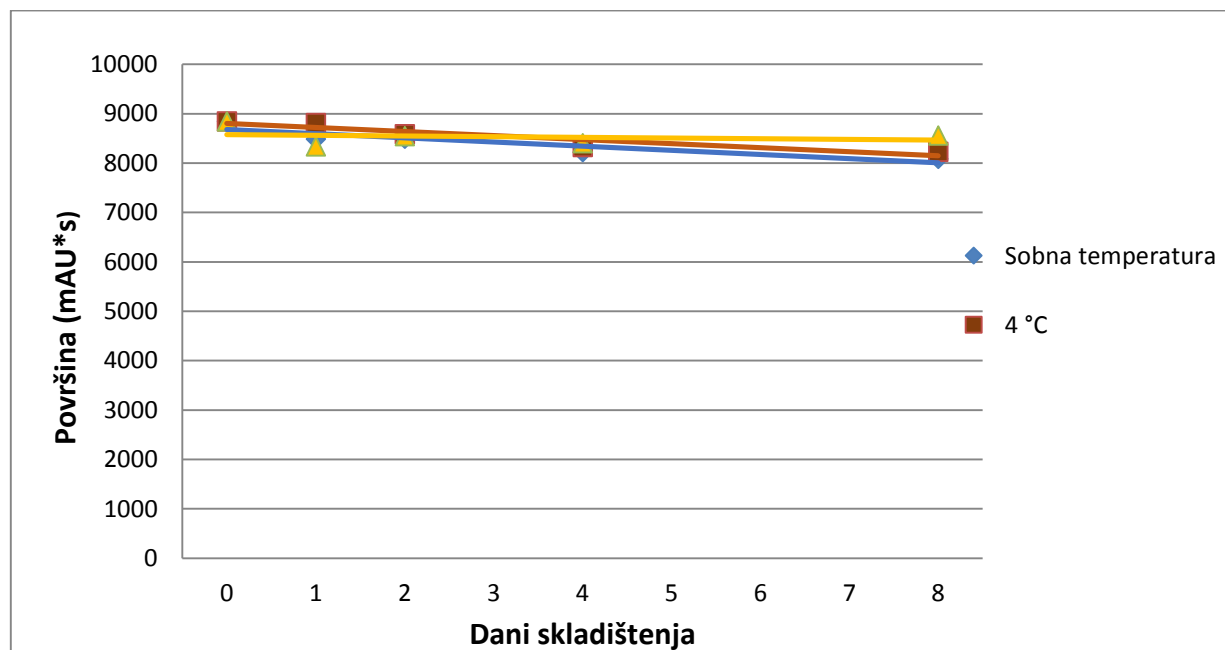
*uzorci maslinovih ulja s tržišta

Međupreciznost određena je tako da su dva analitičara zasebno pripremila svoje uzorke. Za pripremu uzorka korišteno je isto ulje (Uzorak 4) ali je svaki analitičar pripremio svoje mobilne faze i reagense. Iz dobivenih rezultata izražena je srednja i RSD vrijednost. RSD iznosi 3,77 što ulazi u zadano područje. Prikaz rezultata za međupreciznost nalazi se u tablici 12.

Tablica 12. Rezultati međupreciznosti metode

Mjerenje	Koncentracija ukupnih polifenola (mg kg ⁻¹)
1	520,64
2	508,07
3	505,16
4	491,65
5	496,60
6	465,53
Srednja vrijednost	497,94
RSD %	3,77

Stabilnost otopine pokazuje održivost uzorka obzirom na temperaturu i vrijeme skladištenja (Lazarić, 2012). Stabilnost je određena pripremanjem uzorka 4 te njegovim skladištenjem na sobnoj temperaturi, + 4 °C i -20 °C. Mjerenja su provedena na dan pripreme uzorka te nakon 1, 2, 4 i 8 dana skladištenja. Dobiveni rezultati prikazani su grafički na slici 15.



Slika 15. Grafički prikaz promjene udjela ukupnih polifenola ovisno o temperaturi i vremenu skladištenja

Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako tijekom prva dva dana dolazi do blage degradacije uzorka neovisno o temperaturi skladištenja. Nakon drugog dana uočene su veće razlike u degradaciji polifenola u odnosu na temperaturu skladištenja. Naime uzorci na sobnoj temperaturi i na temperaturi hladnjaka (+4 °C) pokazuju puno veći pad fenola u odnosu na uzorke skladištene na -20 °C. To je vidljivo i iz nagiba pravaca koji je za uzorke skladištene na sobnoj temperaturi i u hladnjaku vrlo sličan (-84,189 i -81,826) dok za uzorke skladištene u zamrzivaču na -20 °C ta vrijednost iznosi -14,238 (Tablica 13). Iz toga se zaključuje da uzorci koji su predviđeni za skladištenje dulje od dva dana moraju biti pohranjeni na temperaturi -20 °C kao bi degradacija uzorka bila što manja.

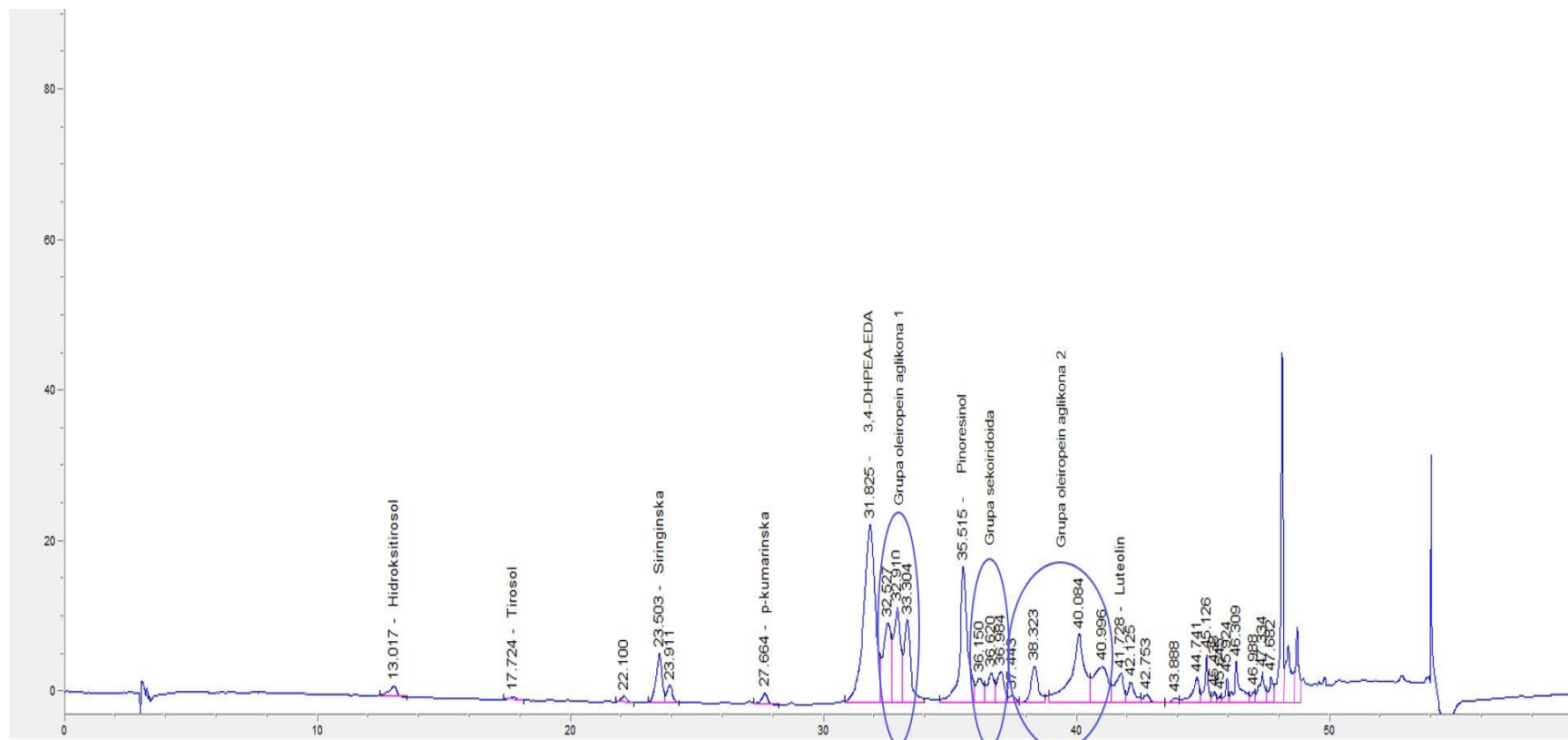
Tablica 13. Prikaz rezultata stabilnosti otopine ovisno o temperaturi i vremenu skladištenja dobivenih regresijskim modelom

	Sobna temperatura	+4 °C	-20°C
Jednadžba pravca	$y = -84,189x + 8678,2$	$y = -81,826x + 8801,3$	$y = -14,238x + 8579,1$
Nagib	-84,189	-81,826	-14,238
Odsječak	8678,2	8801,3	8579,1
Broj mjerenja	5	5	5

4.3. SASTAV I UDIO FENOLA ANALIZIRANIH DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA

Razvijena i validirana metoda korištena je za određivanje sastava i udjela fenolnih spojeva u tri djevičanska maslinova ulja s područja Istre. Na Slici 16 prikazan je kromatogram sastava fenola uzorka Istra 1 snimljen DAD detektorom na 280 nm. Iz rezultata je vidljivo kako su u uzorku detektirani hidroksitiroso, tiroso, *p*-kumarinska kiselina, pinoresinol i luteolin. Ti su spojevi identificirani usporedbom njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima standarada, te također usporedbom UV spektara snimljenih DAD detektorom. Osim navedenih spojeva, u uzorku je detektiran i dialdehidni oblik oleonolne kiseline vezan na 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA). Iako za navedeni spoj nije korišten standard u ovom radu, njegova identifikacija provedena je koristeći maseni spektar snimljenog spoja. 3,4-DHPEA-EDA javlja se na kromatogramu na 31,8 min, a njegov snimljen molekularski ion iznosi 319,2. Usporedbom mase molekularskog iona s podacima iz literature (Suarez i sur., 2008), može se zaključiti da se radi o 3,4-DHPEA-EDA. Snimljeni maseni spektri fenolnih spojeva otkrili su također i dvije skupine spojeva koje imaju zajednički molekularski ion (377,2). Usporedbom mase molekularskog iona s rezultatima ranije objavljenim u radu Suareza i suradnika (2008) može se zaključiti da se radi o derivatima oleuropeina. Masa negativnog molekularskog iona aglikona oleuropeina prema literaturi iznosi 377. Stoga su dvije skupine spojeva, tri pika oko 33. i četiri pika od 37. do 41. minute, na kromatogramu označene kao grupe oleuropein aglikona 1 i 2.

Na prikazanom kromatogramu izdvojena je još jedna grupa spojeva (3 pika) s vremenom zadržavanja oko 36 minute. To su spojevi kojima nije bilo moguće odrediti molekulske ione, vjerojatno zbog nižih koncentracija ili zbog prisutnih interferencija s matriksom. No sva tri navedena spoja pokazuju UV spektar vrlo sličan spektru tiroso. Stoga možemo zaključiti da se vjerojatno radi o derivatima tiroso prisutnima u analiziranom djevičanskom maslinovom ulju. Ti su spojevi na kromatogramu označeni kao grupa sekoiridoida. Nakon 42. minute analize detektiran je veći broj spojeva koje nismo uspjeli identificirati zbog nedostatka standarada te zbog manje osjetljivost MS detektora u SCAN načinu rada koji je korišten u ovoj analizi.



Slika 16. Kromatogram fenolnih spojeva u uzorku djevičanskog maslinovog ulja Istra 1 snimljen DAD detektorom na 280 nm

Tablica 14. Sastav i udio (mg kg^{-1}) polifenola djevičanskim maslinovih ulja s područja Istre

Fenolni spoj	Molekulski ion [M-H] ⁻	Uzorak DMU		
		Istra 1	Istra 2	Istra 3
Hidroksitirosol		5,14	4,55	2,92
Tirosol		1,62	1,98	2,07
<i>p</i> -kumarinska kiselina		4,76	0,00	0,00
3,4-DHPEA-EDA	319,2	143,47	146,99	132,88
Grupa oleuropein aglikona 1	377,2	117,35	52,48	39,75
Pinoresinol		52,01	60,65	59,41
Grupa sekoiridoida 1		20,00	11,36	9,19
Grupa oleuropein aglikona 2	377,2	136,84	150,15	163,11
Luteolin		9,65	6,39	6,11
Σ neidentificiranih fenolnih spojeva		176,00	166,38	166,77
Ukupni fenoli		667,34	600,85	582,21

Rezultati udjela fenolnih spojeva u analiziranim djevičanskim maslinovim uljima prikazani su u Tablici 14. Iz rezultata je vidljivo kako je dominantni fenolni spoj 3,4-DHPEA-EDA koji čini od 20 do 25 % ukupnih polifenola djevičanskog malinovog ulja. Ti su podaci u skladu s vrijednostima objavljenim u literaturi (Servili i sur., 2004) gdje se navodi kako je prosječna koncentracija navedenog spoja $185,7 \text{ mg kg}^{-1}$. Slijedi ga pinoresinol s koncentracijama od 52,01 do 60,65 mg kg^{-1} . Najzastupljenija skupina fenola u analiziranim djevičanskim maslinovim uljima su sekoiridoidi (3,4-DHPEA-EDA, grupa oleuropein aglikona 1 i 2 te grupa sekoiridoida) koji čine gotovo 2/3 detektiranih spojeva. U analiziranim uljima su detektirani još u niskim koncentracijama ($<10 \text{ mg kg}^{-1}$) i flavoni (luteolin), fenolni alkoholi (hidroksitirosol i tirosol) te od fenolnih kiselina samo *p*-kumarinska i to samo u uzorku Istra 1. Ti su rezultati u skladu s literaturom u kojoj se navodi kao sekoiridoidi čine dominantnu skupinu fenola djevičanskog maslinovog ulja (Servili i sur., 2004).

Svi analizirani uzorci sadrže značajne udjele neidentificiranih fenolnih spojeva, od kojih veći dio vjerojatno također pripada skupini sekoiridoida. Više od 25 % neidentificiranih spojeva upućuje na potrebu upotrebe sofisticiranije opreme koja bi omogućila potpunu karakterizaciju fenolnog sastava djevičanskih maslinovih ulja.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata i provedene rasprave izvedeni su slijedeći zaključci:

Optimiranjem parametara LC/MS uređaja postignuto je dobro razdvajanje i detekcija fenolnih spojeva što se i očituje u rezultatima vremena zadržavanja te rezultatima očitanih molekulskih iona.

Validacijom odabranih parametara (selektivnosti, linearnosti, točnosti, ponovljivosti i stabilnosti) pokazalo se da metoda zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti te da je prikladna za određivanje polifenolnog sastava djevičanskog maslinovog ulja.

Sekoiridoidi su dominantna skupina analiziranih djevičanskih maslinovih ulja s područja Istre i čine gotovo 2/3 ukupnih polifenola. 3,4-DHPEA-EDA dominantni je fenolni spoj s udjelom od 132,88 do 146,99 mg kg⁻¹. Uz njih identificirani su još i hidroksitirozol, tirosol, *p*-kumarinska kiselina, pinoresinol i luteolin.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2016) Prikaz principa rada DAD detektora <
http://www.teamcag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/detectors/dadPrinciple.html>

Pristupljeno 08.03.2016.

Anonymous 2 (2016) The DAD and MWD principle,
<http://www.teamcag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/detectors/dadPrinciple.html>.

Pristupljeno 05.03.2016.

Anonymous 3 (2016), Prikaz ESI ionizacije, <
http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1960-90079_6100_Concepts.pdf>.

Pristupljeno 08.03.2016.

Agilent Technologies (2016) <<https://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-detectors/1290-infinity-ii-diode-array-detector>>. Pristupljeno 12.03.2016.

Agilent Technologies (2016) <
http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G196090082_6100_QuickStart.pdf>.

Pristupljeno 12.03.2016.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

Cindrić, M., Marković, M., Horvatić, A. (2009) Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene Hyphenated techniques liquid chromatography-mass spectrometry: basic methodology and applications. *Medicina*, **45**, 218-232. hrcak.srce.hr/file/68074

Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352.

Galić, N. (2004) Elektroraspršenje – blagi način ionizacije u spektrometriji masa. *Kem. Ind.* **53** (3)117–123

HAA (2016) Hrvatska akreditacijska agencija, Zakonska osnova <http://www.akreditacija.hr/zakonska_osnova>. Pristupljeno 01.04.2016.

International olive council (2009) Determination of Biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc No 29

Ivanov, D. (2008) Maseni spektrometar, < <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/maseni-spektrometar>>. Pristupljeno 05.03.2016.

Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, *Svijet po mjeri* **1**,61-65.

Naczk, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereal, fruits and vegetables: Occurrence extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1523-1542.

Novak, P., Allegretti Živčić, V. (2013) Spektrometrija masa (MS) https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/12_AK2_MS_krom.pdf. Pristupljeno 01.04.2016.

Rastija, V., Medić-Šarić, M. (2009) Kromatografske analize polifenola. *Kem. Ind.* **58** (3) 121–128

Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fitó, M., Farré, M., Dierssen, M., de la Torre, R. (2015) Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, **20** (3), 4655-4680; doi:10.3390/molecules20034655

Servili, M., Montedoro, G.F. (2002) Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104** 602–613.

Seger, C., Griesmacher, A. (2007) Važni aspekti uspostave dvojne spektrometrije masa u uvjetima rutinskoga kliničkog laboratorija. *Biochemia Medica*, [online], 17(1):29-51, , <raspoloživo na: <http://www.biochemia-medica.com/content/vazni-aspekti-uspostave-dvojne-spektrometrije-masa-u-uvjetima>>, [pristupljeno 28.08.2015.].

Suárez, M., Macià, A., Romero, M.-P., Motilva, M.-J. (2008) Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Chromatogr. A*, **1214** 90–99.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., Borges, F. (2013) Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. BioMed Research International, Article ID 251754, 11 pages <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/251754/>

Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., Du, L. (2010) Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit Veg. Cereal Sci. Biotech.* **4**, 77-87.