

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Tea Böhm

691/USH

**RAZVOJ I VALIDACIJA
HS-SPME/GC-MS METODE ZA
ODREĐIVANJE AKROLEINA U
KISELOM TIJESTU**

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

RAZVOJ I VALIDACIJA HS-SPME/GC-MS METODE ZA ODREĐIVANJE AKROLEINA U KISELOM TIJESTU

Tea Böhm, 691/USH

Sažetak: U ovom radu provedeni su razvoj i validacija HS-SPME/GC-MS metode za određivanje akroleina u kiselom tijestu. Pri optimizaciji mikroekstrakcije na čvrstoj fazi analiziran je utjecaj dva parametra – temperature (40 i 50 °C) i vremena ekstrakcije (10, 15 i 20 minuta). Najveći odziv akroleina dobiven je pri 40 °C i 20 minuta te je stoga validacija metode provedena pri tim uvjetima. Ključni parametri validacije bili su selektivnost, linearnost i područje, preciznost, točnost, stabilnost te granice detekcije i kvantifikacije. Ispitivanjem točnosti utvrđeno je da matriks uzorka značajno utječe na odziv dodanog standarda akroleina te je stoga metoda dodatka standarda u uzorak primijenjena za izradu baždarnog dijagrama. Rezultati su pokazali da je metoda selektivna, linearna i precizna unutar ispitivanog područja. S obzirom da su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti svih validacijskih parametara, može se zaključiti da je razvijena HS-SPME/GC-MS metoda prikladna za određivanje akroleina u kiselom tijestu.

Ključne riječi: akrolein, HS-SPME/GC-MS, kiselo tijesto, optimizacija, validacija

Rad sadrži: 41 stranicu, 10 slika, 8 tablica, 34 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. Nikolina Čukelj
4. Izv.prof.dr.sc. Damir Stanzer (zamjena)

Datum obrane: 30. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Quality Control

Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HS-SPME/GC-MS METHOD FOR DETERMINATION OF ACROLEIN IN SOURDOUGH

Tea Böhm, 691/USH

Abstract: *In this thesis HS-SPME/GC-MS method for determination of acrolein in sourdough was developed and validated. Two parameters were analyzed for SPME optimization, temperature (40 and 50°C) and extraction time (10, 15 and 20 minutes). The best results were obtained at 40 °C and 20 minutes of extraction so the validation process was conducted under these conditions. Key validation parameters were selectivity, linearity and range, precision, accuracy, stability, and limits of detection and quantification. During the accuracy experiments, significant influence of sample matrix on the acrolein response was determined, so the calibration curve was created by standard addition method. Results of validation experiments confirmed that this method is selective, linear in working range and precise. It can be concluded that developed HS-SPME/GC-MS method for the determination of acrolein in sourdough is suitable for its intended purpose.*

Keywords: *acrolein, HS-SPME/GC-MS, optimization, sourdough, validation*

Thesis contains: 41 pages, 10 figures, 8 tables, 34 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, Associated professor
2. PhD. Marina Krpan, Assistant professor
3. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant professor
4. PhD. Damir Stanzer, Associated professor (substitute)

Thesis defended: 30th of September 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KISELO TIJESTO	2
2.1.1. Taksonomija bakterija mliječne kiseline u kiselom tijestu	3
2.1.2. Priprema i skladištenje kiselog tijesta	3
2.1.3. Pozitivni aspekti kiselog tijesta	4
2.1.3.1. <i>Utjecaj metabolita BMK na glikemijski indeks</i>	4
2.1.3.2. <i>Utjecaj fermentacije na proteine</i>	5
2.1.3.3. <i>Antimikrobna svojstva BMK</i>	5
2.1.4. <i>Lactobacillus reuteri</i>	6
2.1.4.1. <i>Probiotička aktivnost L. reuteri</i>	6
2.1.4.2. <i>Antimikrobna aktivnost reuterina</i>	7
2.2. AKROLEIN	7
2.2.1. Sinteza akroleina	7
2.2.2. Akrolein u hrani i alkoholnim pićima	8
2.2.3. Mehanizmi toksičnosti akroleina	9
2.3. METODE ODREĐIVANJA AKROLEINA	11
2.3.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi	11
2.3.2. Plinska kromatografija i masena spektrometrija	12
2.4. VALIDACIJA METODE	13
2.4.1. Selektivnost/specifičnost	14
2.4.2. Linearnost i područje	14
2.4.3. Točnost	15
2.4.4. Preciznost	15
2.4.4.1. <i>Repetibilnost (ponovljivost)</i>	15
2.4.4.2. <i>Intermedijarna preciznost</i>	15

2.4.4.3. <i>Reproducibilnost (obnovljivost)</i>	16
2.4.5. Stabilnost	16
2.4.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Uređaji i oprema	17
3.1.2. Kemikalije.....	17
3.1.3. Uzorak.....	18
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Uvjeti analize	18
3.2.2. Optimizacija metode	19
3.2.3. Validacija metode	19
3.2.3.1. <i>Selektivnost</i>	20
3.2.3.2. <i>Linearnost i područje rada</i>	20
3.2.3.3. <i>Preciznost</i>	20
3.2.3.4. <i>Točnost</i>	21
3.2.3.5. <i>Stabilnost</i>	21
3.2.3.6. <i>Granica detekcije i granica kvantifikacije</i>	21
3.2.4. Analiza i obrada podataka.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. OPTIMIZACIJA METODE	24
4.2. VALIDACIJA METODE.....	25
4.2.1. Selektivnost.....	25
4.2.2. Linearnost i područje	26
4.2.3. Preciznost.....	29
4.2.4. Točnost.....	31
4.2.5. Stabilnost	33

4.2.6. Granica detekcije i granica kvanitfikacije	35
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. LITERATURA.....	38

1. UVOD

U posljednjih nekoliko godina svijest ljudi o nutritivno bogatijoj prehrani i namirnicama sve više raste. Stoga se i prehrambena industrija usredotočila na proizvodnju novih, nutritivno bogatijih proizvoda. Proizvodnja proizvoda s dodatkom kiselog tijesta nije novost, no tehnologija se na tom području veoma brzo razvija i sve je više novih proizvoda s njegovim dodatkom. Kruh s dodatkom kiselog tijesta s razlogom je postao omiljen među pobornicima zdravog života zbog mnogih pozitivnih aspekata koji su posljedica metabolizma bakterija mliječne kiseline. Proizvodi s dodatkom kiselog tijesta imaju niži glikemijski indeks, aktivnost prisutnih metabolita dovodi do djelomične razgradnje glutena, tekstura kruha je mnogo bolja u usporedbi s drugim vrstama kruha, a trajnost je produžena zbog snižene pH-vrijednosti koja je posljedica sinteze mliječne kiseline.

Pojedini sojevi bakterija mliječne kiseline koji se koriste prilikom fermentacije kiselog tijesta produciraju metabolit reuterin koji se u određenim okolišnim uvjetima može degradirati u toksičan spoj akrolein. Akrolein je veoma nestabilan i hlapiv spoj koji se svrstava u skupinu aldehida. Industrijski se dobiva oksidacijom propena, a primarno se koristi kao kontaktni herbicid. Izrazito je toksičan i izlaganjem uzrokuje snažnu iritaciju kože, očiju te dišnih puteva. Svjetska zdravstvena organizacija za podnošljivu dnevnu oralnu konzumaciju akroleina navodi 7,5 µg po kilogramu tjelesne mase.

U posljednjih tridesetak godina raste svijest o toksičnosti akroleina pa se tako i razvijaju mnogobrojne analitičke metode za njegovo određivanje iz mnogobrojnih izvora (vode, raznih prehrambenih namirnica, urina, itd.). Cilj svake analitičke metode, osim njezine točnosti, je da je što ekonomičnija, jednostavnija i brža. Svaku razvijenu analitičku metodu potrebno je validirati koristeći neke od ključnih validacijskih parametara kako bi se utvrdila njena prikladnost za namijenjenu svrhu.

Cilj ovog rada bio je razviti i validirati metodu za određivanje akroleina u kiselom tijestu pomoću „headspace“ mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Headspace Solid Phase Microextraction*, HS-SPME) uz primjenu plinske kromatografije-masene spektrometrije (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KISELO TIJESTO

Povijest kiselog tijesta i povezanih proizvoda datira kroz cijelo tisućljeće i prati razvoj ljudske civilizacije, od začetaka agrikulture do danas. Kiselo tijesto i ostali proizvodi bazirani na kiselome tijestu napravljeni od žitarica, suma su različitih tipova znanja, od agrikulturne prakse i tehnoloških procesa pa sve do kulturnog nasljeđa [1].

Povijesno, proizvodnja kiselog tijesta započela je kao *conditio sine qua non* (lat. uvjet bez kojeg se ne može) kao korak prerade žitarica za pripremu pekarskih proizvoda. Prije nekoliko tisuća godina prva proizvodnja kruha bazirala se na fermentaciji pomoću divljih bakterija mliječne kiseline (BMK) i nije bila povezana s kvascima [2]. Moć dizanja slučajno je otkriće kada je kvasac iz okoline fermentirao tijesto mnogo intenzivnije. Tek krajem 19. stoljeća su se starter kulture kvasca počele dodavati prilikom proizvodnje kruha [2].

Tehnologija proizvodnje kiselog tijesta često se primjenjuje pri izradi kruha zbog prisutnosti poželjnih metabolita BMK (ponajprije mliječne kiseline), poboljšanja senzorskih, tehnoloških, nutritivnih svojstava te trajnosti krajnjeg proizvoda [2,3,4,5,6]. Kiselo tijesto nastaje fermentacijom brašna (najčešće pšeničnog ili raženog), vode i eventualno male količine soli, uz pomoć bakterija mliječne kiseline i kvasaca (iz okoline ili brašna) [6,7] koji određuju stupanj zakiseljavanja i sposobnost dizanja tijesta. Navedene karakteristike dobivaju se i optimiziraju kroz uzastopna osvježenja tijesta. Pojam osvježenje odnosi se na tehniku kojom tijesto dobiveno od brašna, vode i mogućih drugih sastojaka, spontano fermentira kroz određeni vremenski period te se zatim dodaje kao inokulum kako bi se započela fermentacija nove smjese brašna i vode [7]. Kada se taj proces odvija kroz određeni broj intervala, dobiva se kiselo tijesto s konstantnom sposobnosti dizanja tijesta i zakiseljavanja temeljenom na rastu bakterija mliječne kiseline i kvasaca koji su se prilagodili na okolinu. Nakon pripreme kiselog tijesta, ono se osvježava kako bi se konstantno održavala metabolička aktivnost mikrobioloških kultura. Mikroflora kiselog tijesta sastoji se od promjenjivog broja bakterija mliječne kiseline i kvasaca [5], varirajući od 10^7 do 10^9 CFU g^{-1} te od 10^5 do 10^7 CFU g^{-1} , pri čemu je omjer BMK i kvasaca 100 : 1 [6]. Glavna uloga BMK (uglavnom obligatorni i fakultativno heterofermentativni laktobacili) je u procesu zakiseljavanja dok kvasci uglavnom utječu na moć dizanja tijesta otpuštanjem CO_2 [5,7].

2.1.1. Taksonomija bakterija mliječne kiseline u kiselom tijestu

Bakterije mliječne kiseline su heterogena skupina Gram-pozitivnih, nesporulirajućih bakterija čiji je glavni produkt fermentacije mliječna kiselina koja ima bitan utjecaj na organoleptička i tehnološka svojstva fermentiranih prehrambenih proizvoda i njihovu trajnost. Iako su obigatorne homofermentativne BMK izolirane iz kiselog tijesta, obigatorne ili fakultativne heterofermentativne BMK [8] se bolje prilagođavaju rastu u ovim specifičnim uvjetima. Identificirano je više od 55 *Lactobacillus* vrsta u kiselom tijestu [2].

2.1.2. Priprema i skladištenje kiselog tijesta

Priprema kiselog tijesta može se provesti prema mnogo različitih protokola. Glavni cilj je dobivanje smjese s velikom sposobnosti dizanja koja sadrži dobro prilagođene mikroorganizme. Mikroorganizmi trebaju proizvesti dovoljne količine CO₂ kako bi došlo do dizanja tijesta, organske kiseline i druge metabolite koji osiguravaju dobru teksturu kruha i senzorska svojstva te produljeni rok trajanja. Razlikuju se dvije klasične procedure pripreme, francuski i američki sistem [7]. Također, razlikuju se tri tipa kiselog tijesta, ovisno o temperaturi i vremenskom periodu fermentacije [6]. Tradicionalna fermentacija u Europi provodi se u temperaturnom rasponu od 25 do 35 °C te dominiraju mezofilne BMK. Optimalne pH-vrijednosti za rast i razvoj BMK u kiselom tijestu su između 5,0 i 6,0 [7].

Tekuće kiselo tijesto može se skladištiti pri 1-2 °C te se upotrebljava kao inokulum za nove fermentacije u roku 2 do 3 dana bez faze osvježanja. U slučaju produljenog skladištenja (10 dana), potrebno je jedno ili dva osvježanja kako bi se aktivirao metabolizam BMK i kvasaca. Produljeno skladištenje kiselog tijesta tijekom više mjeseci pri temperaturi 4 do 5 °C moguće je uz omjer vode i brašna oko 30 : 70. U tom slučaju, dobiva se čvrsto kiselo tijesto i takav način skladištenja zahtijeva reaktivaciju tijesta prije upotrebe. U nekim slučajevima, kiselo tijesto može se zamrznuti i ponovno upotrijebiti nakon dodatka inokuluma [7] tehnikom koja je navedena u poglavlju 2.1.

2.1.3. Pozitivni aspekti kiselog tijesta

Kiselo tijesto je najpoznatije radi utjecaja na senzorsku kvalitetu i trajnost pekarskih proizvoda te su u tom području provedena brojna istraživanja. Zakiseljavanje, aktivacija enzima i njihov utjecaj na stanice žitarica, a također i sinteza mikrobnih metabolita utječu na promjene u tijestu koje posljedično utječu i na nutritivnu kvalitetu proizvoda. Kruh s dodatkom kiselog tijesta ima sniženi glikemijski indeksi povećanu koncentraciju bioiskoristivih mineralnih tvari. Tijekom fermentacije kiselog tijesta, uslijed metabolizma mikroorganizama također može doći do sinteze nutritivno aktivnih komponenti, kao što su vitamini i potencijalno prebiotički egzopolisaharidi. Primjenom tehnologije kiselog tijesta pri proizvodnji pekarskih proizvoda smanjuje se ili eliminira potreba za korištenjem aditiva, što postaje sve važnije potrošačima [4].

2.1.3.1. Utjecaj metabolita BMK na glikemijski indeks

Predloženo je nekoliko mehanizama kojima prilikom kiseljenja tijesta dolazi do poboljšane probavljivosti škroba. Sintaza organskih kiselina, posebno mliječne kiseline, tijekom fermentacije mogući je glavni faktor utjecaja [4]. Provedena je studija u kojoj je ispitan utjecaj kiselog tijesta na sniženje koncentracije inzulina u krvi. Kruhovi su pripremljeni s dodatkom predfermentiranog raženog brašna u iznosu od 40 % od ukupne mase kruha. Rezultati navedenog istraživanja su pokazali kako je potrebna niža koncentracija inzulina koja regulira koncentraciju glukoze u krvi nakon konzumacije kruha s dodatkom kiselog tijesta dobivenog od raženog brašna u usporedbi s istom količinom škroba iz pšeničnog kruha [9]. Ipak, nemaju svi kruhovi pripremljeni s dodatkom kiselog tijesta niski glikemijski indeks (GI). Općenito, relativno niski pH kiselog tijesta i kruha potrebni su kako bi se snizio GI (3,5-4 za kiselo tijesto i 3,8-5,1 za kruh s dodatkom kiselog tijesta). Niska pH-vrijednost u mnogim slučajevima utječe na smanjenje volumena i povećanje gustoće kruha što posljedično utječe na niži GI. Senzorska kvaliteta kruha s visokim udjelom organskih kiselina ograničavajući je faktor prihvatljivosti proizvoda kod potrošača, odnosno poželjni su kruhovi s višim pH-vrijednostima. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio direktan utjecaj metabolita prisutnih u kiselom tijestu (kiselina, peptida i egzopolisaharida) na probavljivost škroba te indirektan utjecaj fermentacije kiselog tijesta na svojstva žitarica vezana uz probavljivost (gustoću, oslobađanje fenolnih spojeva, udio i sastav proteina, nastanak rezistentnog škroba) [4].

2.1.3.2. Utjecaj fermentacije na proteine

Degradacija proteina do koje dolazi tijekom fermentacije kiselog tijesta jedan je od ključnih faktora koji imaju sveukupan utjecaj na kvalitetu kruha s dodatkom kiselog tijesta. Proteoliza koja se događa tijekom fermentacije kiselog tijesta intenzivnija je nego u tijestima u kojima je prisutan samo kvasac. Proteolizu provode enzimi bakterija mliječne kiseline pri čemu dolazi do nastanka malih peptida i slobodnih aminokiselina, važnih za brzi mikrobiološki rast i zakiseljavanje. Nadalje, ta proteolitička aktivnost ima mogućnost smanjenja koncentracije određenih alergena prisutnih u hrani. Proteini pšenice mogu inducirati klasičnu alergijsku reakciju koja se ispoljava na koži, u crijevima i respiratornom traktu [4].

Primarni utjecaj kiselina na proteinske frakcije je povećano bubrenje i topivost glutena do čega dolazi zbog pozitivnog neto naboja proteina u kiselom okruženju. Povećana intramolekularna elektrostatska odbijanja uzrokuju otvaranje molekula glutena pri čemu hidrofobne grupe postaju dostupnije. Prisutnost jakih intermolekularnih elektrostatskih odbijanja sprečava stvaranje novih veza. U konačnici rezultat je manje stabilno mekše tijesto s potrebnim kraćim vremenom mješanja. Također, mekoća glutena utječe na bubrenje i povećanje vezanja vode [4].

2.1.3.3. Antimikrobna svojstva BMK

Inhibitorna aktivnost bakterija mliječne kiseline u kiselom tijestu općenito se pripisuje brzom potrošnji kisika i fermentabilnih ugljikohidrata te sintezi mliječne kiseline pri čemu dolazi do sniženja pH-vrijednosti. Ostali metaboliti koji pridonose specifičnoj antimikrobnoj aktivnosti su diacetil, vodikov peroksid, kratkolančane masne kiseline i brojni drugi spojevi specifični za pojedine sojeve BMK. Sintaza acetata pomoću heterofermentativnih laktobacila može se poboljšati dodatkom saharoze ili pentoza te u konačnici dolazi do produljenja trajnosti kruha s dodatkom kiselog tijesta [3]. Bakterije mliječne kiseline u kiselom tijestu su djelotvorne protiv kvarenja uzrokovanim *Bacillus* spp., zbog nastanka organskih kiselina i drugih antibakterijskih komponenti [10].

2.1.4. *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri je heterofermentativna bakterija mliječne kiseline koja pripada autohtonj humanoj i animalnoj mikrobioti [11], odnosno nalazi se u probavnom sustavu ljudi [12,13] i životinja u obliku biofilma [12]. *L. reuteri* može proizvesti reuterin, antimikrobnu tvar koja djeluje aktivno protiv bakterija, kvasaca i plijesni. Sposobnost produkcije reuterina relativno je neuobičajena u prirodi te je *L.reuteri* jedina bakterija mliječne kiseline koja se učestalo nalazi u hrani, a koja ima mogućnost sinteze i izlučivanja velike količine reuterina [13].

2.1.4.1. Probiotička aktivnost *L. reuteri*

Kao i mnoge druge vrste iz roda *Lactobacillus*, *L. reuteri* ima probiotička svojstva. Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se primjene u dovoljnoj količini, pridonose zdravstvenim pogodnostima domaćina. Probiotičke bakterije moraju biti sigurne za domaćina, genetički stabilne te moraju imati mogućnost prebivanja u probavnom sustavu. Glavni koraci djelovanja probiotičkih bakterija su prilagodba uvjetima intestinalne flore, adhezijana mukoznu membranu, kompeticija s patogenim mikroorganizmima, prilagodba na enzimске aktivnosti u debelom crijevu, stimulacija imunološkog sustava te produkcija kratkolančanih masnih kiselina i drugih metabolita. *L. reuteri* ima mogućnost preživljavanja i prilagodbe u probavnom sustavu ljudi. Pojedini izolirani sojevi mogu preživjeti u uvjetima niske pH-vrijednosti (3,0) i žučne soli, što demonstrira da *L. reuteri* preživljava uvjete želuca i crijeva [13].

Zbog visoke kompleksnosti kemije HPA-sustava (engl. *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*, HPA), model probiotičkog djelovanja reuterina na mikrobiološki rast teško je razjašnjiv. Pretpostavlja se da reuterin inhibira aktivnost bakterijske ribonukleotid reduktaze, enzima koji katalizira prvi korak u DNA sintezi, kompeticijom s ribonukleotidima za aktivno mjesto [11,14]. Inhibicija konverzije ribonukleotida u deoksiribonukleotid objašnjava širok spektar aktivnosti reuterina [11].

2.1.4.2. Antimikrobna aktivnost reuterina

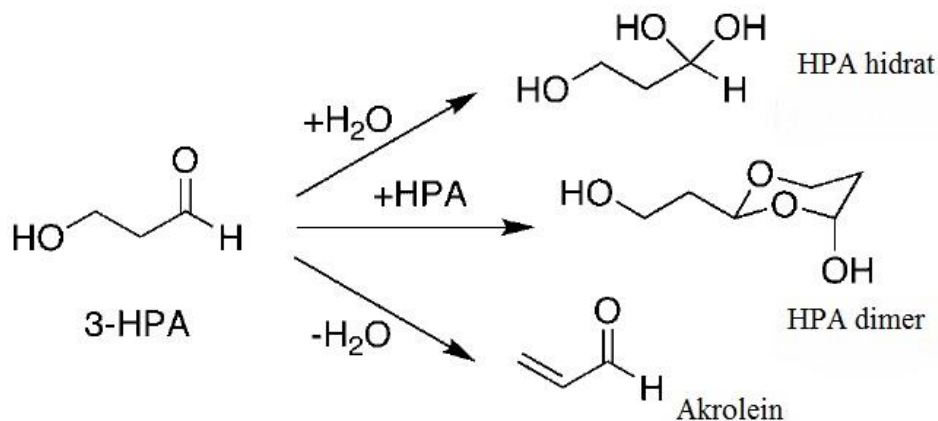
Reuterin (β -hidroksipropionaldehid, 3-HPA) je spoj s antimikrobnim djelovanjem prema patogenim organizmima i organizmima koji uzrokuju kvarenje hrane [14] što je razlog velikog industrijskog interesa [13]. Sastoji se od hidratiziranih, nehidratiziranih i dimernih formi 3-HPA [13]. Potencijalan je konzervans i može se dodati u prehrambene namirnice kako bi se spriječilo mikrobiološko kvarenje [12,13,14]. Provedena su mnoga istraživanja osjetljivosti velikog broja organizama na reuterin, uključujući Gram-pozitivne (npr. *Listeria monocytogenes*) i Gram-negativne bakterije (npr. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*), kvasce i protozoe. Reuterin, osim što ima inhibirajući učinak na mikrobiološki rast, ima i baktericidni učinak pri višim koncentracijama, što znači da osim svojstva konzervansa ima i dezinfekcijsko svojstvo [13].

2.2. AKROLEIN

Akrolein, poznat i kao akrilaldehid, propenal, propen-2-al, bistra je i prozirna tekućina [15,16,17], ponekad može biti žute boje [17], prodornog slatkog mirisa [15,17]. Navedeni nezasićen aldehid nastaje prilikom fermentacije i procesa zrenja voća i povrća [15], toplinskog procesiranja životinjskih i biljnih masti, ugljikohidrata i aminokiselina [16]. Tijekom procesiranja namirnica s visokim udjelom ugljikohidrata, akrolein nastaje kao posljedica Maillardovih reakcija. Također, prilikom šumskih požara emitira se u atmosferu u visokim koncentracijama kao posljedica nepotpunog izgaranja [15,17]. Primarna primjena akroleina je u kemijskoj industriji za proizvodnju drugih kemikalija te kao kontaktni herbicid u kanalima kako bi se kontrolirao rast podzemnog bilja (npr. algi) [16,17].

2.2.1. Sinteza akroleina

Aldehidna grupa reuterina izrazito je reaktivna stoga se u vodenoj otopini iz reuterina mogu formirati drugi spojevi. Dehidracijom reuterina nastaje toksičan spoj akrolein (Slika 1.) [18].



Slika 1. Sinteza akroleina iz 3-hidroksipropionaldehida [18]

Sriramula i sur. te Rodriguez i sur. sintetizirali su akrolein prema metodi Smileyja i Soborova s pojedinim modifikacijama. Iz prekonoćne kulture stanica bakterije *Lactobacillus reuteri*, pripremljene u MRS-MOD (engl. *Man-Rogosa-Sharpe modified*) mediju s dodatkom 20 mM glicerola, uzet je supernatant. U supernatant je dodana otopina triptofana i 35 % klorovodična kiselina. Otopina je zagrijavana pri 60 °C 5 minuta. Reuterin je pri tim uvjetima dehidrirao u akrolein što se moglo zaključiti po žutom obojenju otopine. Otopina je analizirana spektrometrijski pri 490 nm te je u usporedbi sa standardom akroleina dokazana sinteza akroleina iz reuterina pri navedenim uvjetima [19,20].

2.2.2. Akrolein u hrani i alkoholnim pićima

Akrolein može nastati prilikom različitih koraka pripreme hrane iz aminokiselina, masti i ugljikohidrata. U kućanstvu najčešće nastaje zagrijavanjem i/ili pregrijavanjem povrća i životinjskih masti (npr. prilikom pohanja ili pohanja u fritezi). Prilikom tog procesa, trigliceridi se hidrolitički razgrađuju u prisutnosti rezidualne vode i nastaje glicerol koji se dehidratizira. Formacija akroleina tijekom zagrijavanja ulja ovisi o sastavu masnih kiselina, vremenu zagrijavanja te temperaturi. Ulja i masti koja nakon procesa rafinacije nisu toplinski obrađivana, sadrže niže koncentracije akroleina (do 20 µg kg⁻¹). Suprotno tome, ulja korištena prilikom prženja u fritezi sadrže više koncentracije akroleina (0,2-1,4 mg kg⁻¹) [21]. U Tablici 1. naveden je udio akroleina u pojedinim namirnicama. Prihvatljiv dnevni unos (engl.

Tolerable Daily Intake, TDI) za akrolein je $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ tjelesne mase [22] dok ta vrijednost za unos preko prehrambenih namirnica iznosi $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ [15].

Do formacije akroleina može doći tijekom proizvodnje jakih alkoholnih pića zbog uvjeta koji pogoduju njegovom nastanku, primjerice dehidracijom glicerola. Kao što je ranije rečeno, akrolein može nastati kao nusprodukt metabolizma pojedinih mikroorganizama dehidracijom 3-HPA, što je također slučaj prilikom destilacije. Druga alkoholna pića, poput crvenog vina i lager piva, mogu sadržavati akrolein, ali u nižim koncentracijama [21].

Tablica 1. Udio akroleina u različitim namirnicama i procjena unosa [16]

Namirnica	Koncentracija akroleina (mg L^{-1})	Srednja vrijednost konzumacije (g dan^{-1})	Dnevni unos ($\mu\text{g dan}^{-1}$)
Domijati sir	0,300-1,300 (ovisno o zrelosti sira)	42	13-55
Vino	$\leq 3,800$	43	≤ 163
Voće	$< 0,010$ -0,050	337 (bez sokova i orašastih plodova)	< 3 -17
Povrće	$\leq 0,590$	341	≤ 201
Lager pivo	0,001-0,002	142	0,100-0,300
Brendi/konjak	1,400-1,500	3	2-33
Viski	0,700-11,100		

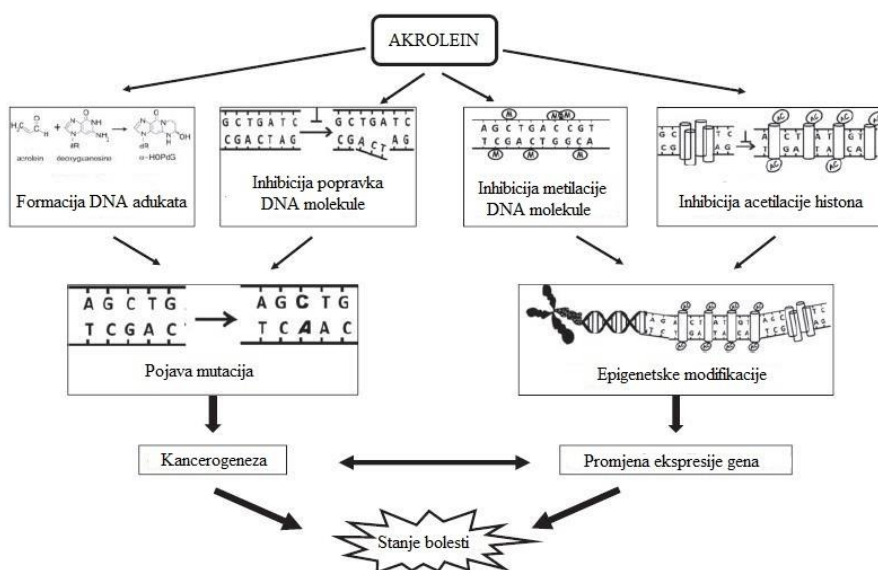
2.2.3. Mehanizmi toksičnosti akroleina

S obzirom da je snažan elektrofil, akrolein pokazuje visoku reaktivnost s staničnim nukleofilima poput proteina, DNA i RNA. Može se vezati sa sulfhidrilnom skupinom cisteina, imidazolnom grupom histidina te amino grupom lizina [22], a također i s primarnim i

sekundarnim aminima [16]. Navedeni aminokiselinski ostaci imaju značajnu fiziološku ulogu te su uključeni u mnoge stanične procese poput enzimske katalize, redoks signalizacije i osjetljivosti kisikovih reaktivnih spojeva. Stoga može doći do promjene funkcija proteina u stanici [22]. Akrolein također može uzrokovati „cross-linking“ proteina kao i peptida/proteina s DNA molekulom [16].

Mitochondriji imaju dinamičnu ulogu u ljudskim stanicama kontrolirajući oksidativnu fosforilaciju kako bi se sintetizirao ATP (engl. *Adenosine Triphosphate*), pomažući prilikom razgradnje masnih kiselina i sinteze steroida te u procesu apoptoze. Akrolein je mitohondrijski toksin koji utječe na navedene funkcije, ponajprije na proces apoptoze. Većina znanstvenih studija rađena je *in vitro*, a manjak mnogo potrebnijih *in vivo* studija postavlja pitanje o njihovoj relevantnosti [22].

Oštećenje DNA molekule može biti uzrokovano izlaganjem pojedinim kemikalijama, kisikovim reaktivnim vrstama i reaktivnim metabolitima kao što je akrolein. Akrolein posljedično uzrokuje mutacije i kancerogenezu [22], kao što je prikazano na Slici 2.



Slika 2. Utjecaj akroleina na DNA molekulom

Adukti akrolein-DNA karakterizirani su *in vitro* i također detektirani *in vivo* u sedam različitih životinjskih i ljudskih tkiva i stanica. Ukoliko ne dođe do učinkovitog popravka adukata, može doći do mutacija kritičnih gena stoga se može zaključiti da je akrolein potencijalan mutagen i može pridonijeti procesu kancerogeneze. Dosadašnje studije

ispitivanja mutagenosti akroleina pokazale su nedosljednost, no također su pokazale da moguć utjecaj akroleina na kancerogenezu ovisi o vrsti stanice i DNA sekvenci [22].

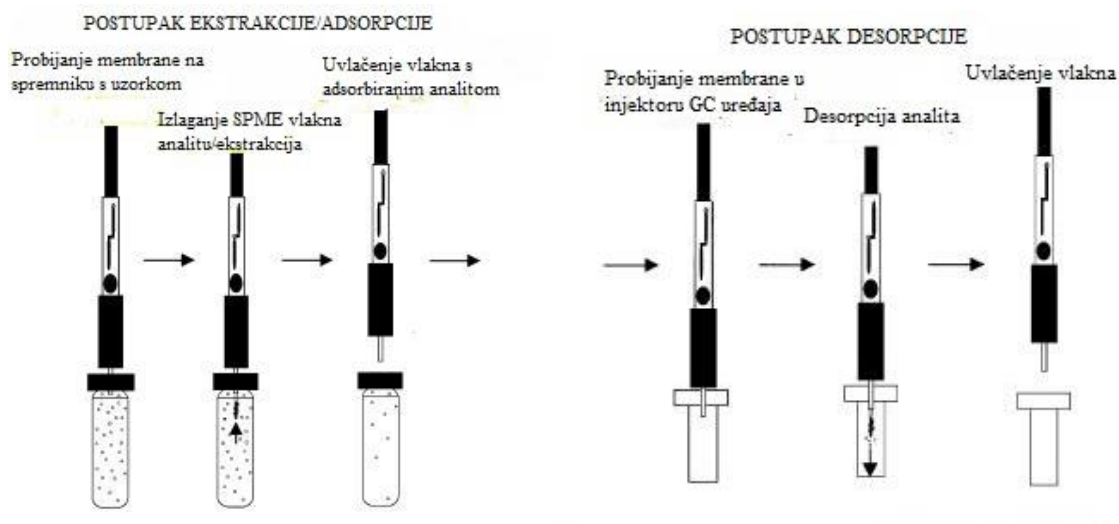
Akrolein je izrazito citotoksičan *in vitro* kao i *in vivo*. U kulturi stanica, akrolein smanjuje vijabilnost brojnih staničnih linija, primjerice stanica bronhijalnog endotela i epitela, epitelnih stanica retinalnog pigmenta te živčanih stanica. Također, uzrokuje smrt stanica putem procesa apoptoze (npr. u ljudskim stanicama pluća) [16]. Provedena je epidemiološka studija u kojoj je ispitivana povišena učestalost raka pluća kod Kineskinja nepušačica koje tradicionalno kuhaju u wok tavi. U usporedbi s kontrolnom skupinom, te žene su imale značajno više koncentracije merkapturne kiseline u urinu, koja je posljedica metabolizma akroleina, i krotonaldehida. Međunarodna agencija za istraživanje raka klasificirala je emisiju akroleina koji nastaje prilikom prženja pri visokim temperaturama kao moguć karcinogen za ljude [16].

2.3. METODE ODREĐIVANJA AKROLEINA

2.3.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi jednostavna je metoda adsorpcije i desorpcije razvijena na Sveučilištu Waterloo u Kanadi [23]. Potreba za potpunom eliminacijom organskih otapala iz analitičkih ekstrakcija dovela je do razvoja SPME metode. SPME se temelji na principu sličnom ekstrakciji tekuće-tekuće osim što je organska faza zamijenjena sa stacionarnom fazom, polimernim vlaknom [24].

Analiza uzoraka ekstrakcijom tekuće-tekuće može potrajati od četiri do osamnaest sati dok ekstrakcija na čvrstoj fazi traje oko jednog do dva sata. Također, ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija na čvrstoj fazi mogu sadržavati kontaminante koji utječu na određivanje željenog analita. Vrijeme trajanja SPME metode mnogo je kraće od dva ranije navedena postupka ekstrakcije, a isto tako zahtjeva mnogo manju količinu uzorka dok je potreba za organskim otapalima eliminirana. Identifikacija i kvantifikacija analita SPME metodom mnogo su pouzdanije jer dolazi do redukcije interferirajućih odziva mogućih kontaminanata prisutnih u uzorku [23]. Na Slici 3. prikazan je postupak ekstrakcije pomoću SPME metode u kombinaciji s plinskom kromatografijom.



Slika 3. Postupak ekstrakcije SPME metodom [23]

Vlakno duljine 1 cm, premazano polimerima, nalazi se u držaču koji nalikuje na modificiranu mikrolitarsku injekciju. Klip pomiče vlakno unutra-van kroz šuplju iglu, kojom se probija čep posudice u kojoj se nalazi uzorak. Nakon probijanja membrane čepa, vlakno se izvlači iz igle i u tom trenutku započinje adsorpcija/apsorpcija spojeva iz zračnog prostora iznad uzorka (engl. *headspace*, HS). Vrijeme ekstrakcije je parametar koji se određuje prilikom optimizacije metode. Po završetku ekstrakcije, vlakno se uvlači u iglu dok se igla vadi iz posudice. SPME se potom uvodi u injektor plinskog kromatografa te dolazi do desorpcije tvari ekstrahiranih na vlakno. Desorbirane tvari dolaze u kromatografske kolone koja omogućuje njihovo razdvajanje [23,24].

2.3.2. Plinska kromatografija i masena spektrometrija

Sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije kombinira razdvajanje komponenata visokom rezolucijom i osjetljivu masenu detekciju. Velika prednost GC-MS metode je sposobnost identifikacije nepoznatih spojeva pomoću dostupnih baza masenih spektara kemijskih spojeva [25]. GC-MS zahtjeva hlapive analite koji su termalno stabilni. To je i primarni nedostatak s obzirom da je samo 10 % svih organskih spojeva prikladno za GC-

MS analizu. GC-MS analiza se koristi za kvalitativnu identifikaciju nepoznatih spojeva i precizno kvantitativno određivanje istih [25].

GC-MS metoda za direktno određivanje akroleina iz urina razvijena je 1998. godine. Mali volumen urina zagrijavan je do 80 °C pri čemu akrolein prelazi u „headspace“ te se zatim analizira koristeći GC-MS. Metoda omogućava osjetljivost detekcije između 1 i 5 nM [16].

Osório i Cardeal razvili su SPME-GC/MS metodu određivanja akroleina iz uzoraka prženih krumpirića koja je pokazala dobru rezoluciju, repetibilnost, granice detekcije i kvantifikacije te linearnost odziva [26].

2.4. VALIDACIJA METODE

U znanstvenim istraživanjima nepouzdana rezultati mogu dovesti do njihove krive interpretacije te pogrešnih zaključaka. Ukoliko ih stručnjaci iz istog područja službeno ne ospore, može doći do njihovog umnožavanja unutar znanstvene zajednice ili mogu postati dijelom općeprihvaćenog znanja u pojedinom području istraživanja i tako uzrokovati daljnje pogrešne interpretacije [27].

Temelj svake analitičke metode su pouzdani podaci. Svaka nova analitička metoda zahtjeva temeljiti razvoj te validaciju. Kvaliteta analitičke metode uvelike ovisi o razvoju metode, a ne toliko o validaciji. Vrlo je bitno da razvijena metoda odgovara svojoj namijenjenoj svrsi [27], pri čemu je svaki analitički rezultat dobiven s prihvatljivom razinom pouzdanosti [28]. Proces validacije objektivno prikazuje svojstvenu kvalitetu analitičke metode preko ispunjenja minimalno prihvatljivih kriterija i time dokazuje njenu primjenjivost za namijenjenu svrhu [28]. Validacija metode važna je za svaki analitički laboratorij radi dokaza kvalitete rezultata [28]. Proces revalidacije je potreban kada se neka komponenta analitičkog sustava mijenja ili kada postoje indikacije da se utemeljena metoda više ne provodi na adekvatan način [27]. Prikladnost svih metoda uvijek bi trebala biti verificirana pri stvarnim uvjetima i dobro dokumentirana [29].

Parametri koji se prilikom validacije analitičke metode procjenjuju su: selektivnost/specifičnost, linearnost i područje rada, točnost, preciznost (intermedijarna preciznost, repetibilnost, reproducibilnost), granica detekcije i granica kvantifikacije, stabilnost te robusnost [27,28,30].

2.4.1. Selektivnost/specifičnost

Specifičnost/selektivnost svojstvo je metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matriksu uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. U praksi se ponekad poistovjećuju, no specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit. Metoda prvenstveno mora pokazati visoku specifičnost prije nego što se provede točna kvantifikacija [27]. Metoda kojom se može određivati više komponenata istovremeno, ali pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj pri određivanju, naziva se selektivnom [31]. Metoda je selektivna kada se odziv analita razlikuje od ostalih odziva. U tom slučaju, s velikom preciznošću može se odrediti količina analita u prisustvu interferencija [27].

2.4.2. Linearnost i područje

Linearnost analitičke metode je sposobnost (unutar definiranog radnog područja) dobivanja rezultata koji je direktno proporcionalan koncentraciji (količini) analita u uzorku [27,32]. Izbor prikladnog kalibracijskog modela bitan je za pouzdanu kvantifikaciju. Stoga je potrebno ispitati vezu između koncentracije metabolita u uzorku i odgovarajućeg odziva. Kalibracijske koncentracije trebaju biti podjednako raspodijeljene kroz cijelo područje kalibracije [28,32]. Većina smjernica zahtjeva minimum od pet do osam koncentracijskih razina te za svaku razinu dvije do šest paralela [28,32]. Najčešće se primjenjuje pravilo analize uzoraka koncentracije 25, 50, 75, 100, 150 i 200 % od koncentracije ciljanog analita [28]. Općenito, preporuča se manje koncentracijskih razina s više paralela nego više koncentracijskih razina s manje paralela. Nakon što je ispitan dovoljan broj koncentracijskih razina s dovoljnim brojem paralela, potrebno je pronaći matematički model koji adekvatno opisuje vezu između koncentracije analita u uzorku i odziva [27]. Matematički se metodom

linearne regresije izrazi jednadžba pravca ($y = ax + b$) i izračuna koeficijent korelacije (r). Nagib pravca (a) parametar je koji izravno ukazuje na osjetljivost metode. Odsječak pravca (b) može ukazivati na sustavnu pogrešku. Za koeficijent korelacije uobičajeno se postavlja kriterij $r \geq 0,99$. Za vrlo niske koncentracije prihvaća se i kriterij $r \geq 0,98$ [31].

2.4.3. Točnost

Točnost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, odnosno prihvaćene referentne vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta [31]. Obično se izražava kao postotak razlike izmjerene od prihvaćene referentne vrijednosti [27]. Točnost metode također je indikator primjenjivosti metode na ciljanim uzorcima [28].

2.4.4. Preciznost

Preciznost se može definirati kao slaganje između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima [27,31]. Obično se provodi u uvjetima nepreciznosti, izražena kao apsolutna ili relativna standardna devijacija (RSD) [27].

2.4.4.1. Repetibilnost (ponovljivost)

Repetibilnost izražava preciznost pod istim uvjetima rada u kratkom vremenskom periodu [27]. Nezavisni rezultati dobiveni su istom metodom, identičnom testnom opremom u istom laboratoriju, analize je provodio isti analitičar na istim uređajima unutar više kratkih vremenskih intervala [28].

2.4.4.2. Intermedijarna preciznost

U strogom smislu, intermedijarna preciznost je ukupna preciznost pod različitim uvjetima [27]. Nezavisni rezultati dobiveni su istom metodom pod istim uvjetima rada u istom laboratoriju no metodu je provodilo više analitičara koristeći različitu opremu u dužem vremenskom periodu [28].

2.4.4.3. *Reproducibilnost (obnovljivost)*

Reproducibilnost izražava preciznost između laboratorija, odnosno ispituje se samo kada se metoda koja se validira koristi u više različitih laboratorija [27]. Nezavisni rezultati dobiveni su istom metodom u različitim laboratorijima uz pomoć više različitih analitičara i opreme [28].

2.4.5. Stabilnost

Stabilnost je parametar koji izražava kemijsku stabilnost analita u pojedinoj smjesi pod specifičnim uvjetima u određenim vremenskim intervalima. Preduvjet za pouzdanu kvantifikaciju je stabilan analit tijekom cijelog analitičkog postupka. Pri određivanju stabilnosti ciljanog analita potrebno je ispitati stabilnost pri uvjetima skladištenja, npr. u istom posuđu, pri temperaturama i vremenskom periodu skladištenja koje se očekuje kod ciljanog uzorka [28].

2.4.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije najmanja je količina analita u uzorku koja se može detektirati [27,31], ali ne nužno i kvantificirati [27]. Također, to je i najniža koncentracija analita u uzorku koja se može razlikovati od pozadinskog šuma [27]. Granica kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati. Procjena može biti vizualna, pomoću omjera signal/šum ili statistička. Omjer signal/šum primjenjuje se samo za analitičke postupke s baznom linijom, a prihvatljivi su omjeri 3 : 1 za granicu detekcije i 10 : 1 za granicu kvantifikacije [29].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uređaji i oprema

Uređaji

Plinski kromatograf (6890N, Agilent Technologies)

Kolona (CP-Wax, 52CB, 30 m * 0,25 mm * 0,25 μm)

Liner (0,75 mm, Agilent Technologies)

Maseni spektrometar (5973 inert, Agilent Technologies)

SPME držač vlakna za ručno injektiranje (Sigma-Aldrich)

Vlakna za SPME (Carboxen/DVB/PDMS, 50/30 μm, Stableflex™)

Termo blok (NO. 18971, PIERCE Reacti-Therm)

Oprema

Vijalica (20 mL)

Magnet (15 * 6 mm)

Čepovi za vijalice (CLS-1535B, 20 mm Crimp Cap, 3 mm Nat., PTFE/Whit Silicone)

Pipetmani (100, 1000 i 5000 μL, Eppendorf)

3.1.2. Kemikalije

Akrolein (90 %, stabiliziran s hidrokinonom, Sigma-Aldrich, CAS broj 107-02-8)

3-metil-1-butanal (98 %, AcrosOrganics, CAS broj 590-86-3)

Otopina soli (20 % NaCl, pH 3 (prilagođen 0,05 M limunskom kiselinom))

H₂O HPLC čistoće

3.1.3. Uzorak

Za potrebe ovog rada pripremljen je uzorak rižinog kiselog tijesta. Tijesto je pripremljeno u omjeru brašna i vode 1 : 1,5 te je dodana bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus reuteri*. Fermentacija se odvijala pri temperaturi od 37 °C do pH vrijednosti 4. Uzorak je čuvan u hladnjaku, prije analize je centrifugiran pri 4000 rpm, 10 minuta te je za analizu korišten supernatant.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uvjeti analize

U vijalicu koja sadrži ukupno 3 mL pripremljene otopine za analizu stavljen je magnet te je vijalica zatvorena metalnim čepom sa silikonskom membranom. Vijalica je stavljena u termo blok prethodno zagrijan na temperaturu od 40 °C te je postavljena brzina miješanja magneta na 5. Vrijeme uravnoteženja otopine trajalo je pet minuta, a zatim je čep vijalice probušen pomoću SPME držača te je vlakno spušteno u prostor iznad uzorka. U tom trenutku započela adsorpcija/apsorpcija tvari na vlakno, odnosno ekstrakcija. Po završetku ekstrakcije, vlakno je uvučeno u SPME držač i stavljeno u injektor plinskog kromatografa u kojem su tvari s vlakna desorbirane. Za analizu pomoću plinske kromatografije primijenjeni su sljedeći temperaturni uvjeti kolone: zadržavanje temperature 30 °C kroz 3 minute, porast temperature do 40 °C brzinom 2 °C po minuti, zatim do 230 °C brzinom 30 °C po minuti i zadržavanje temperature 230 °C kroz 5 minuta, kako bi se sve ekstrahirane tvari desorbirale s vlakna. U Tablici 2. navedeni su uvjeti rada plinskog kromatografa i masenog spektrometra. Maseni spektrometar koji služi kao detektor namješten je na SIM (*Selected Ion Monitoring*) način rada te kroz maseni filter prolaze ioni omjera masa i naboja 37, 55 i 56 kao ciljani ioni za detekciju i kvantifikaciju akroleina, te ioni 41, 57 i 58 kao ciljani ioni za detekciju i kvantifikaciju internog standarda 3-metil-1-butanala. Kvantifikacija akroleina je provedena preko odziva iona 37,1 koji je korigiran pomoću odziva iona internog standarda 57,1.

Tablica 2. Uvjeti rada plinskog kromatografa i masenog spektrometra

Parametar	Uvjeti rada
Temperatura injektora	250 °C
Temperatura detektora	250 °C
Temperatura AUX	250 °C
Vrijeme desorpcije	5 min
Vrijeme trajanja analize	15 min 50 s
Protok helija	1 mL min ⁻¹

3.2.2. Optimizacija metode

Optimizacija metode mikroekstrakcije provedena pri temperaturama 40 °C i 50 °C, u trajanju od 10, 15 i 20 minuta. Otopina za analizu pripremljena je dodatkom 0,5 mL uzorka kiselog tijesta, 25 µL otopine akroleina koncentracije 300 mg L⁻¹, 20 µL otopine internog standarda 3-metil-1-butanala koncentracije 0,04 g L⁻¹ te dopunjena otopinom soli do ukupnog volumena od 3 mL. Uzorak kiselog tijesta je dodavan u otopinu za analizu radi simulacije realnih uvjeta analize, odnosno uključivanje utjecaja matriksa. Mjerenja su pri svakom od definiranih uvjeta mikroekstrakcije provedena u dvije paralele. Rezultati optimizacije su grafički prikazani.

3.2.3. Validacija metode

Validacija metode je provedena nakon procesa optimizacije, pri definiranim optimalnim uvjetima mikroekstrakcije. U svrhu validacije metode, ispitani su sljedeći ključni parametri: selektivnost, linearnost i područje, preciznost, točnost, stabilnost te granica detekcije i granica kvantifikacije.

3.2.3.1. *Selektivnost*

Detekcija ciljanih iona akroleina (37,1) i internog standarda (57,1) koji su prošli kroz maseni filter masenog spektrometra vidljiva je na kromatogramu. Identifikacija akroleina i internog standarda pri očekivanim retencijskim vremenima potvrđena je prisutnošću kvalifikacijskih iona za oba spoja.

3.2.3.2. *Linearnost i područje rada*

Linearnost metode ispitivana je korištenjem pet različitih koncentracijskih razina otopine akroleina: 0,025 mg L⁻¹, 0,100 mg L⁻¹, 0,500 mg L⁻¹, 0,750 mg L⁻¹ i 1,000 mg L⁻¹, uz dodatak 20 µL internog standarda 3-metil-1-butanala koncentracije 0,040 g L⁻¹ te dodatka otopine soli do ukupnog volumena otopine od 3 mL. Svaka koncentracijska razina analizirana je tri puta. Odziv (površina pika) akroleina korigiran je odzivom internog standarda. Pomoću korigiranih vrijednosti odziva i koncentracije u otopini je izrađen baždarni dijagram, pri čemu je navedena njegova jednadžba, koeficijenti determinacije i korelacije.

Za određivanje područja metode korišteni su podaci iz određivanja linearnosti metode. Izračunat je omjer odziva i koncentracije analita, iskorištenje te logaritama korištenih koncentracija akroleina.

3.2.3.3. *Preciznost*

Ponovljivost metode ispitivana je analizom pet koncentracijskih razina u tri paralelna mjerenja. Intermedijarna preciznost metode ispitivana je analizom dvije koncentracijske razine otopine akroleina u tri paralele pri istim uvjetima rada u dva različita dana. Dobivene vrijednosti odziva akroleina korigirane su odzivom internog standarda. Za korigirane odzive izračunate su srednje vrijednosti i relativna standardna devijacija.

3.2.3.4. Točnost

Točnost metode ispitana je metodom dodatka standarda u uzorak i praćenjem promjene odziva akroleina. Budući da je došlo do značajnog pada odziva standarda akroleina dodanog u uzorak, može se zaključiti da matriks uzorka značajno utječe na odziv ciljanog analita. Stoga je izrađen novi baždarni dijagram metodom dodatka standarda u uzorak, u svrhu uključivanja utjecaja matriksa. Analizirano je pet koncentracijskih razina u tri paralele. Odziv akroleina korigiran je odzivom internog standarda te oduzimanjem odziva akroleina prisutnog u uzorku. Na temelju korigiranih vrijednosti izrađen je novi baždarni dijagram. Dobivena je jednadžba baždarnog dijagrama, koeficijent determinacije i koeficijent korelacije. Iz dobivenih rezultata izračunat je omjer teorijskog i eksperimentalno dobivenog odziva pri čemu je određeno iskorištenje. Izrađen je grafički prikaz područja linearnosti metode na temelju ovisnosti omjera odziva i koncentracije o logaritmu koncentracije.

3.2.3.5. Stabilnost

Stabilnost otopine akroleina ispitivana je analizom otopine akroleina u tri paralele kroz četiri dana skladištenja pri temperaturi 4 °C. Stabilnost je prikazana grafički i u obliku postotka odziva akroleina u odnosu na prvi dan skladištenja.

3.2.3.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granice detekcije i kvantifikacije određene su metodom omjera signala i šuma. Za izračun granice detekcije je vrijednost visine šuma izražena u obliku koncentracije i pomnožena s 3. Za izračun granice kvantifikacije je vrijednost visine šuma izražena u obliku koncentracije i pomnožena s 10.

3.2.4. Analiza i obrada podataka

Rezultati i podaci navedeni u ovom radu obrađeni su u Microsoft Excelu 2010.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Postoji nekoliko metoda za određivanje akroleina u vodi i hrani, primjerice kapilarna elektroforeza, visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), tekućinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom (engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS/MS), plinska kromatografija i sustav plinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Mnoge od tih metoda temelje se na reakcijama derivatizacijskim spojevima. Nekoliko autora razvilo je metodu određivanja akroleina u pićima i uzorku urina koje se temeljena HS-SPME/GC-MS metodi. U tim metodama akrolein se adsorbira direktno iz plinske faze na vlakno te potom termalno desorbira u injektoru GC uređaja. Navedene metode imaju mnoge prednosti, kao što su brza i automatska ekstrakcija, no problem je polimerizacija akroleina pri visokim temperaturama i kratak rok trajanja SPME vlakna [33].

Do pisanja ovog rada nisu napravljeni znanstveni radovi na temu određivanja akroleina u kiselom tijestu koristeći HS-SPME/GC-MS metodu. Ledauphin i sur. razvili su preciznu i osjetljivu metodu određivanja akroleina u Calvadosu i cideru koristeći plinsku kromatografiju. Prije samog određivanja, provedena je derivatizacija akroleina s 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazinom (MBTH) [34]. Lim i Shin razvili su HS-SPME/GC-MS metodu određivanja akroleina u vodi za piće i tlu s prethodnom derivatizacijom pomoću 2,2,2-trifluoretilhidrazina (2,2,2-TFEH) [33]. U drugom poglavlju navedena je SPME/GC-MS metoda određivanja akroleina u prženim krumpirićima koju su razvili Osório i Cardeal. Ekstrakciji je također prethodila derivatizacija s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) [26].

U ovom radu razvijena je i validirana HS-SPME/GC-MS metoda određivanja akroleina u kiselom tijestu.

Provedena je optimizacija temperature i trajanja mikroekstrakcije akroleina i rezultati su prikazani na Slici 4.

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

Rezultati ispitivanja selektivnosti prikazani su na Slici 5.

Rezultati ispitivanja linearnosti i područja prikazani su u Tablici 3. te na Slikama 6. i 7.

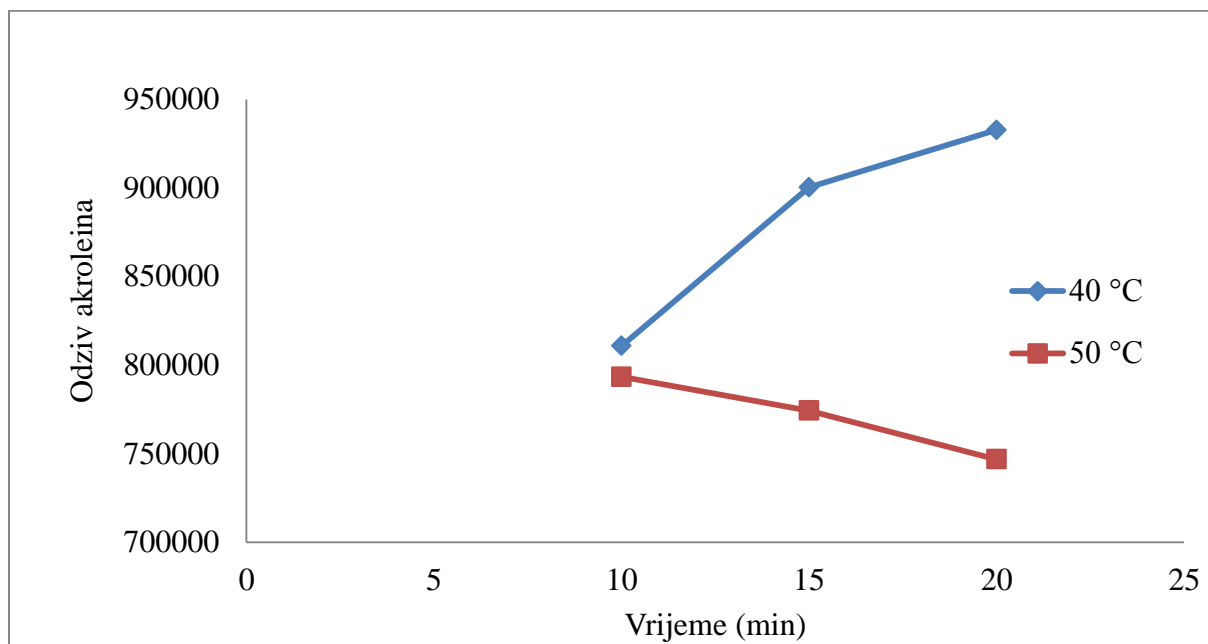
Rezultati ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti nalaze se u Tablicama 4. i 5.

Na Slikama 8. i 9. i Tablici 6. prikazani su rezultati ispitivanja linearnosti metodom dodatka standarda u uzorak.

Stabilnost akroleina prikazana je na Slici 10. i u Tablici 7.

Granica detekcije i granica kvantifikacije su prikazane u Tablici 8.

4.1. OPTIMIZACIJA METODE



Slika 4. Grafički prikaz ovisnosti odziva akroleina o vremenu i temperaturi ekstrakcije

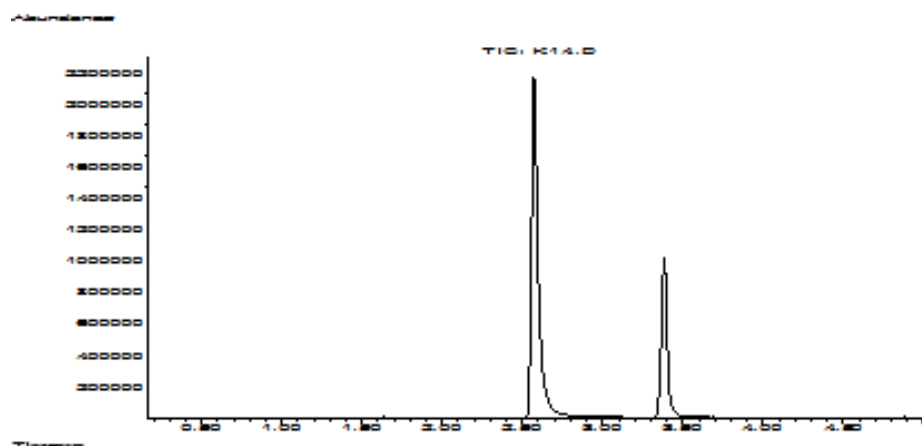
Slika 4. prikazuje rezultate ispitivanja optimizacije te se može zaključiti, prema najvećem odzivu, da je optimalna temperatura ekstrakcije 40 °C pri dok je optimalno provođenje ekstrakcije 20 minuta. Također je vidljivo da pri 40 °C s produljenjem vremena ekstrakcije raste i odziv akroleina, dok pri 50 °C ta vrijednost pada što je vrijeme ekstrakcije dulje.

Osório i Cardeal su prilikom ispitivanja optimizacije promatrali slijedeće parametre: vrijeme ekstrakcije (10 do 40 minuta); temperaturu (30 do 50 °C); udio natrijevog klorida, NaCl (0 do 10 %); vrijeme desorpcije (30 do 120 s). Analiza rezultata je pokazala da interakcija tri parametra, vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije i udjela NaCl je značajna te da su rezultati pouzdaniji pri višim vrijednostima (40 minuta, 50 °C i 10 %). Interakcija vremena ekstrakcije, udjela NaCl i vremena desorpcije pokazala je bolje rezultate pri nižim vrijednostima (30 °C, 5 % i 30 s). Interakcije koje nisu pokazale značajan utjecaj na rezultate su temperatura ekstrakcije s vremenom ekstrakcije i vremenom desorpcije, te vrijeme ekstrakcije s udjelom NaCl-a i vremenom desorpcije. Za optimalne parametre određeni su: vrijeme ekstrakcije 10 minuta, vrijeme desorpcije 120 s, udio NaCl-a 10 % te temperatura ekstrakcije 30 °C [26].

Lim i Shin su osim parametara ekstrakcije (vrijeme i temperatura) ispitivali i parametre derivatizacije, ekstrakciju s četiri različita vlakna te pH vrijednost otopine. Ekstrakciju su ispitivali pri 40, 50, 60, 70 i 80 °C kroz 15, 30, 40, 50 i 60 minuta. Rezultati su pokazali da je optimalna temperatura provođenja ekstrakcije 60 °C, dok je optimalno vrijeme ekstrakcije 50 minuta. Dodatkom natrijevog klorida u otopinu akroleina, odziv je pojačan oko 1,6 puta [33].

4.2. VALIDACIJA METODE

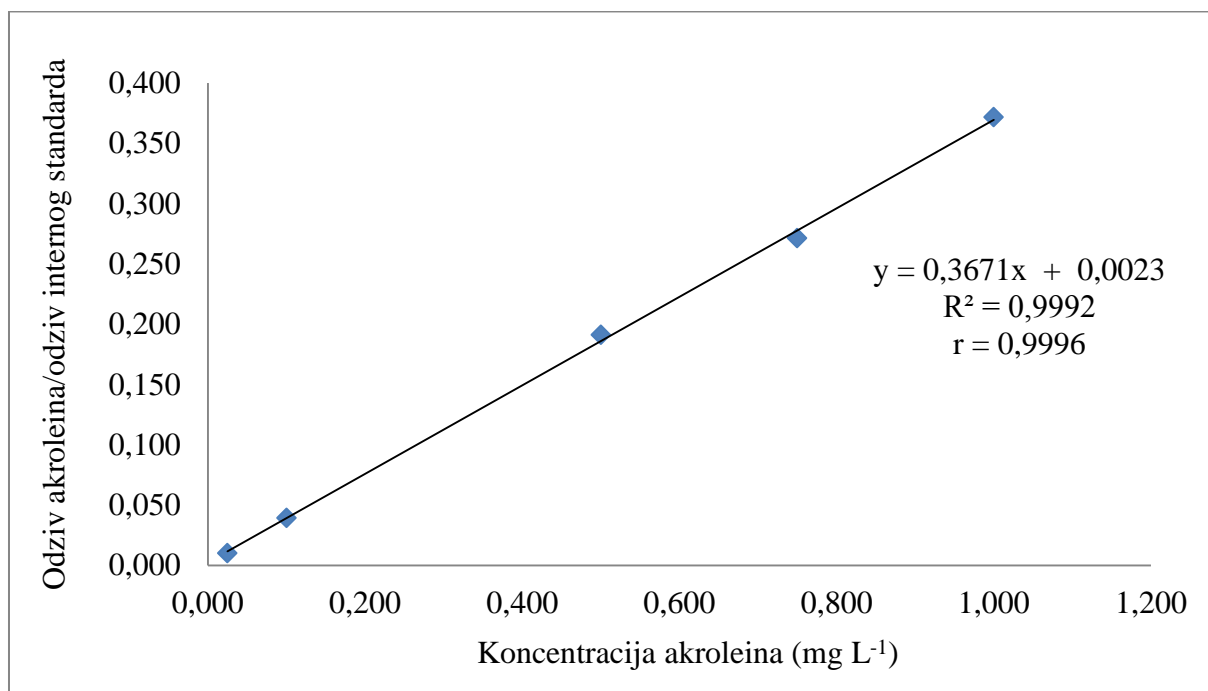
4.2.1. Selektivnost



Slika 5. Kromatogram akroleina i 3-metil-1-butanala

Selektivnost metode dokazana je pomoću kromatograma (Slika 5.) na kojem je vidljivo razdvajanje pika akroleina i internog standarda. Retencijsko vrijeme za akrolein iznosi 2,57 minuta, a za interni standard 3,38 minuta. Na temelju kromatograma akroleina i internog standarda potvrđeno je da nema spojeva sa sličnim retencijskim vremenima koji bi mogli interferirati s ciljanim spojevima.

4.2.2. Linearnost i područje



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti odziva o koncentraciji akroleina

Na Slici 6. prikazana je ovisnost omjera odziva akroleina i internog standarda o koncentraciji akroleina. Jednadžba pravca je $y = 0,3671x + 0,0023$ s koeficijentom korelacije $r = 0,9996$.

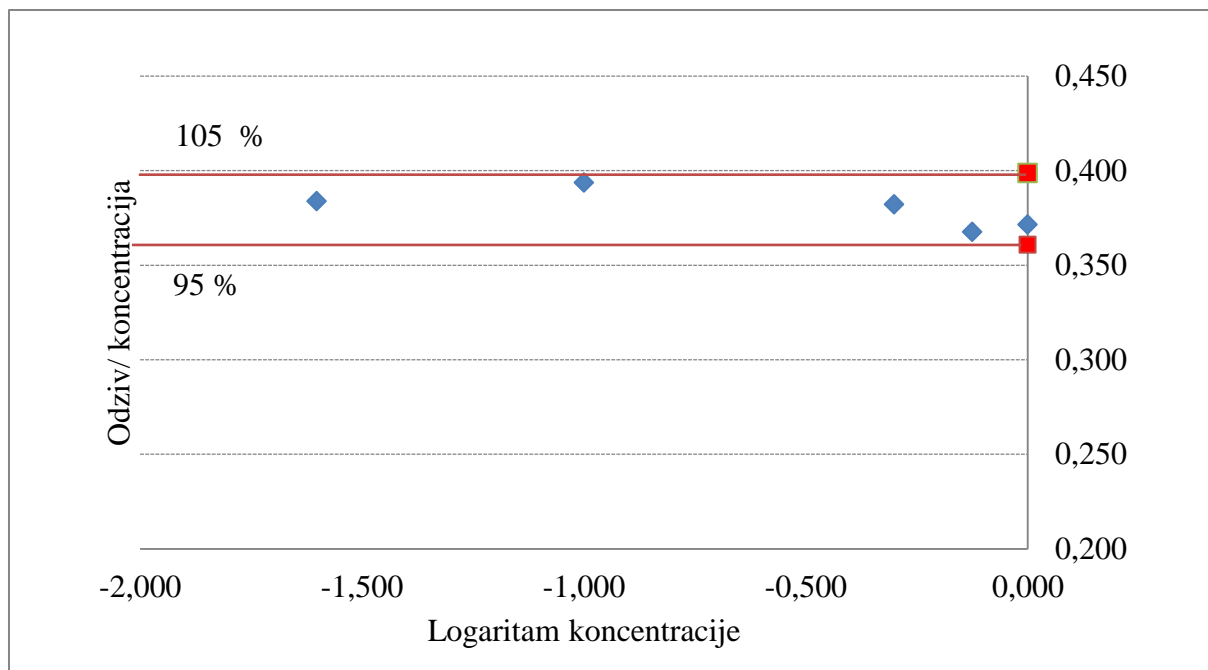
Koeficijent determinacije u radu Osória i Cardeala iznosi 0,9940 što znači da je koeficijent korelacije približno 0,9970 [26]. Lim i Shin za koeficijent korelacije navode 0,9980 [33]. Koeficijent determinacije baždarnog dijagrama akroleina u Calvadosu dobiven u radu Ledauphin i sur. iznosi 0,9989 što znači da je koeficijent korelacije malo veći od 0,9990. Za baždarni dijagram akroleina u cideru koeficijent determinacije iznosi 0,9980 odnosno koeficijent korelacije jest približno 0,9990 [34].

Tablica 3. Rezultati ispitivanja linearnosti

Koncentracija (mg L ⁻¹)	Srednja vrijednost odziva (eksp.)	Odziv (teor.)	Iskorištenje (%)	Odziv / Koncentracija	Logaritam koncentracije
0,025	0,010	0,012	88,00	0,405	-1,602
0,100	0,039	0,039	101,00	0,394	-1,000
0,500	0,191	0,186	102,82	0,382	-0,301
0,750	0,271	0,278	97,72	0,362	-0,125
1,000	0,372	0,369	100,60	0,372	0,000

Područje metode rada u kojem je ispitivana linearnost za akrolein je od 0,025 do 1,000 mg L⁻¹ (Tablica 3.). Iskorištenje je u rasponu od 88,00 % do 102,82 % sa srednjom vrijednosti 98,03 %.

Koncentracije akroleina u radu Lima i Shina bile su u rasponu od 0,100 do 5,000 µg L⁻¹ [33]. Područje rada metode prilikom ispitivanja akroleina u Calvadosu je od 0 do 10,000 mg L⁻¹, dok je taj raspon za cider od 0 do 500,000 µg L⁻¹ [34].



Slika 7. Grafički prikaz područja linearnosti

Na Slici 7. prikazana je ovisnost omjera odziva i koncentracije o logaritmu koncentracije akroleina odnosno područje linearnosti metode unutar kojeg su ispitivane koncentracijske razine.

Dobiveni rezultati dokazuju kako je odnos dodane koncentracije akroleina i odziva linearan u definiranom području metode. Područje metode definirano je u rasponu koncentracija od $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ do $1,000 \text{ mg L}^{-1}$. Kao kriterij prihvatljivosti smatra se koeficijent korelacije viši od 0,9990 što je u ovom slučaju ostvareno.

4.2.3. Preciznost

Tablica 4. Rezultati ispitivanja ponovljivosti

Koncentracija (mg L ⁻¹)	Odziv	Srednja vrijednost odziva	RSD (%)
0,025	0,010	0,010	11,24
	0,009		
	0,011		
0,100	0,037	0,039	6,43
	0,042		
	0,040		
0,500	0,215	0,191	12,16
	0,190		
	0,168		
0,750	0,262	0,271	4,12
	0,268		
	0,284		
1,00	0,392	0,372	4,98
	0,355		
	0,368		
Srednja vrijednost			7,78

U okviru određivanja preciznosti metode, određeni su parametri ponovljivosti i intermedijarne preciznosti.

Relativna standardna devijacija odziva akroleina u definiranom koncentracijskom rasponu kretala se od 4,12 % do 12,16 %, uz srednju vrijednost 7,78 % (Tablica 4.).

Ledauphin i sur. u svom radu su ispitivali ponovljivost metode kroz deset koncentracijskih razina. Relativna standardna devijacija preciznosti metode za Calvados iznosila je 6 % te 10 % za cider [34].

Tablica 5. Rezultati ispitivanja intermedijarne preciznosti

Dan analize	Koncentracija (mg L ⁻¹)	Odziv	Srednja vrijednost odziva	RSD (%)
1.dan	0,100	0,037	0,040	5,25
2.dan		0,042		
		0,040		
		0,040		
		0,041		
		0,043		
1. dan	0,750	0,262	0,261	5,74
2. dan		0,268		
		0,284		
		0,240		
		0,252		
		0,259		

Relativna standardna devijacija odziva za 0,100 mg L⁻¹ iznosila je 5,25 % dok je za 0,750 mg L⁻¹ iznosila 5,74 % (Tablica 5.).

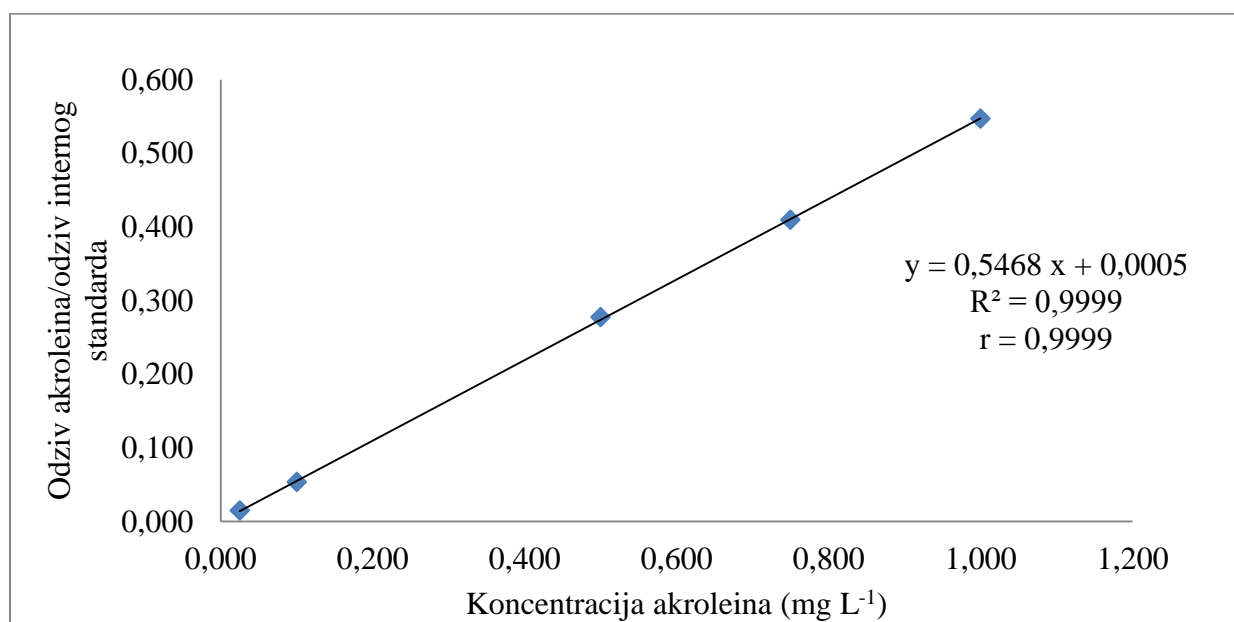
Osório i Cardeal ispitivali su ponovljivost metode analizirajući deset paralela koncentracije 9,080 µg L⁻¹ u istom danu. Relativna standardna devijacija iznosila je 9,70 %. Također su ispitivali intermedijarnu preciznost koristeći tri koncentracijske razine u pet paralela kroz tri dana. Relativna standardna devijacija iznosila je 9,60 % [26].

Lim i Shin ispitivali su ponovljivost i intermedijarnu preciznost (kroz pet dana) metode koristeći pet koncentracijskih razina. Relativna standardna devijacija bila je niža od 10 % za ponovljivost te ispod 7 % za intermedijarnu preciznost [33].

Da bi se metoda mogla smatrati preciznom, prema AOAC gornja granica relativne standardne devijacije za ponovljivost iznosi 21 % za koncentraciju 0,025 mg L⁻¹, 15 % za

koncentracije 0,750, 0,500 i 0,100 mg L⁻¹ te 11 % za koncentraciju 1,000 mg L⁻¹. AOAC nema propisane granične vrijednosti dobivenog iskorištenja prilikom ispitivanja intermedijarne preciznosti, no relativne standardne devijacije dobivene ispitivanjem intermedijarne preciznosti također su niže od 15 % [26]. Na temelju usporedbe definiranih kriterija i dobivenih vrijednosti može se zaključiti da razvijena HS-SPME/GC-MS metoda za određivanje akroleina u kiselom tijestu zadovoljava kriterij prihvatljivosti.

4.2.4. Točnost



Slika 8. Grafički prikaz omjera odziva akroleina i internog standarda o koncentraciji akroleina dodanog u uzorak

Prilikom ispitivanja parametra točnosti zaključeno je da matriks uzorka značajno utječe na odziv internog standarda i standarda akroleina. Stoga je izrađen novi baždarni dijagram metodom dodatka standarda u uzorak. Dodatkom standarda u uzorak, odziv internog standarda bio je manji 4 do 5 puta (ovisno o koncentracijskoj razini) u usporedbi s metodom bez dodatka uzorka. Nekorigirani odziv akroleina dobiven metodom dodatka standarda u uzorak također je bio manji 2 do 3 puta.

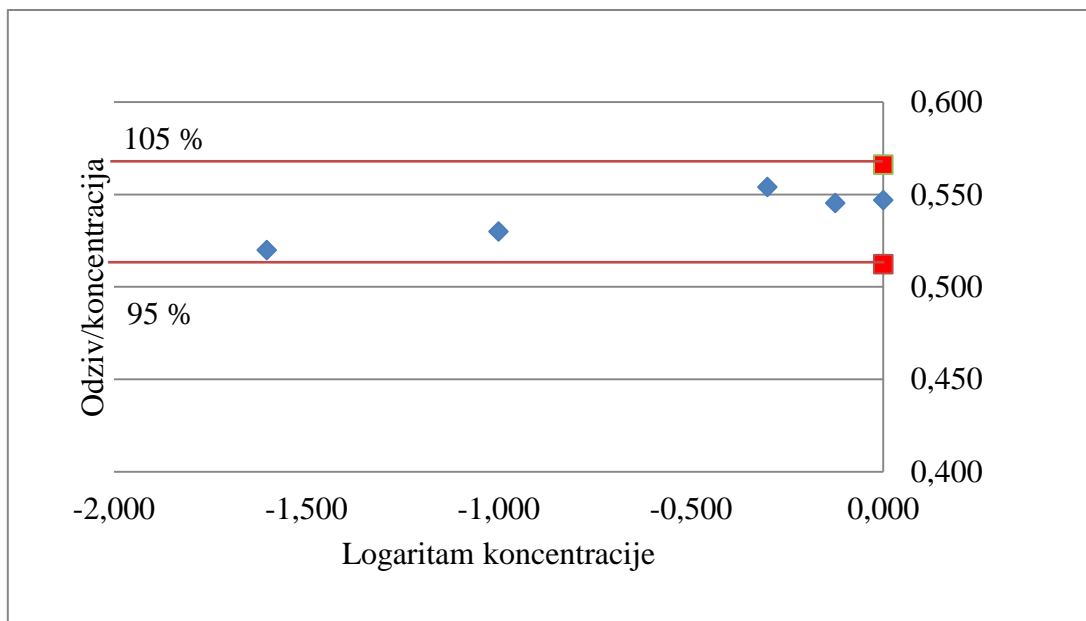
Nagib baždarnog dijagrama dobivenog metodom dodatka standarda je radi prisutne razlike u utjecaju matriksa na odziv standarda akroleina i interni standard veći 1,49 puta od nagiba baždarnog dijagrama dobivenog metodom bez dodatka standarda u uzorak.

Slika 8. grafički prikazuje ovisnost omjera odziva akroleina i internog standarda o dodanoj koncentraciji akroleina u uzorak. Prikazana je jednadžba baždarnog dijagrama, $y = 0,5468x + 0,0005$ s koeficijentom korelacije višim od 0,9990.

Tablica 6. Prikaz rezultata ispitivanja linearnosti metodom dodatka standarda u uzorak

Koncentracija (mg L ⁻¹)	Srednja vrijednost odziva (eksp.)	Odziv (teor.)	Iskorištenje (%)	Odziv/ koncentracija	Logaritam koncentracije
0,025	0,015	0,014	93,33	0,600	-1,602
0,100	0,053	0,055	103,77	0,530	-1,000
0,500	0,277	0,274	98,92	0,554	-0,301
0,750	0,409	0,411	100,49	0,545	-0,125
1,000	0,547	0,547	100,00	0,547	0,000

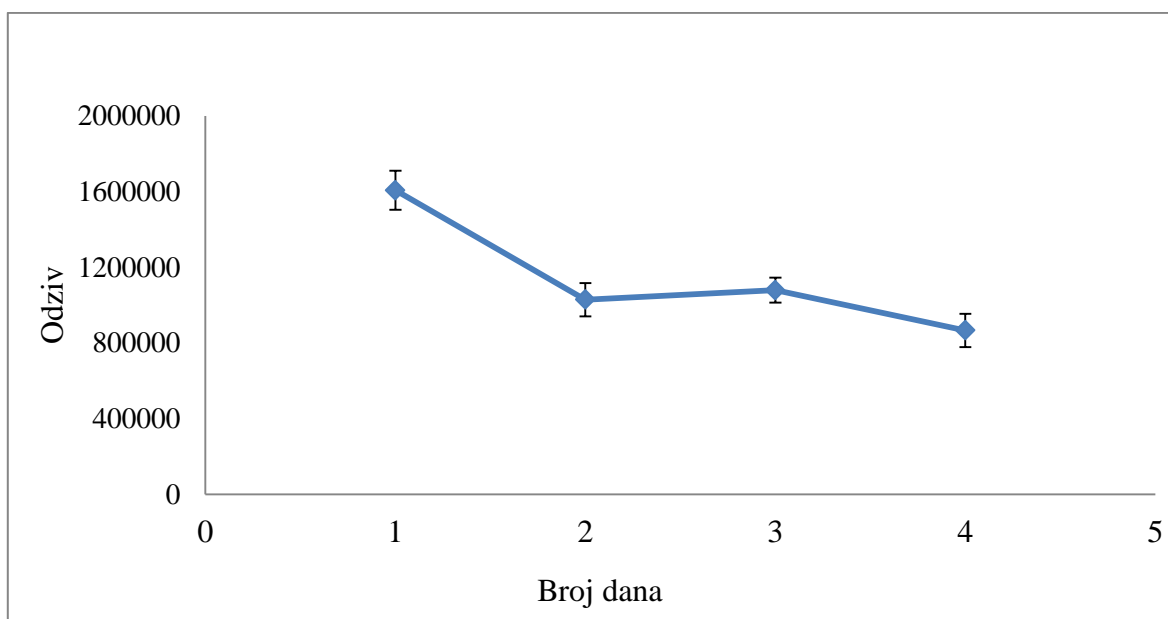
U Tablici 6. su prikazani rezultati ispitivanja linearnosti metodom dodatka standarda u uzorak te dobiveni omjer teorijskog i eksperimentalnog odziva prikazan u obliku iskorištenja. Raspon iskorištenja je od 93.33 % do 103,77 % dok je srednja vrijednost 102,17 %.



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti omjera odziva i koncentracije o logaritmu koncentracije nakon dodatka akroleina u uzorak

Na Slici 9. prikazano je linearno područje metode. Sve ispitivane koncentracijske razine su unutar područja linearnosti.

4.2.5. Stabilnost



Slika 10. Grafički prikaz stabilnosti akroleina kroz četiri dana

Grafički prikaz stabilnosti akroleina (Slika 10.) prikazuje pad stabilnosti akroleina tijekom

četiri dana.

Tablica 7. Ispitivanje stabilnosti akroleina

	Odziv	Stabilnost (%)
1. dan	1606531	100,00
2. dan	1028359	64,01
3. dan	1078982	67,16
4. dan	866017	53,91

Prilikom ispitivanja stabilnosti otopine akroleina korištena je jedna koncentracijska razina u četiri dana. Iz Tablice 7. vidljivo je kako stabilnost pada sa 100,00 % (prvi dan) do 53,91 % (četvrti dan).

Ledauphin i sur. ispitivali su stabilnost akroleina tijekom deset dana. Udio akroleina je sa 100,00 % (prvi dan) pao na 12,00 % (deseti dan) [34].

Iz dobivenih rezultata analize stabilnosti akroleina, može se zaključiti da je spoj veoma nestabilan. Stoga je svaki dan potrebno pripremiti svježu otopinu akroleina te između svake analize pažljivo skladištiti.

4.2.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Tablica 8. Granica detekcije i granica kvantifikacije za akrolein

	Granica detekcije (mg L ⁻¹)	Granica kvantifikacije (mg L ⁻¹)
Akrolein	0,006	0,019

Granica detekcije (engl. *Limit Of Detection*, LOD) i granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) određene su metodom omjera signala i šuma. Napravljen je grafički prikaz ovisnosti visine pika o koncentraciji akroleina te je dobivena jednadžba $y = 412573x - 767,79$, s koeficijentom korelacije višim od 0,9990. U jednadžbu je uvrštena visina šuma te je množenjem dobivene vrijednosti s 3 izračunata koncentracija koja je predstavljala granicu detekcije, dok je množenjem s 10 dobivena koncentracija koja je predstavljala granicu kvantifikacije. Izračunata granica kvantifikacije iznosila je 0,019 mg L⁻¹, a granica detekcije 0,006 mg L⁻¹ (Tablica 8.).

Osório i Cardeal su granicu detekcije i granicu kvantifikacije dobili na temelju jednadžbi: $LOD = X_b + 3S$

$$LOQ = X_b + 10S$$

pri čemu je X_b srednja vrijednost, a S standardna devijacija deset uzastopnih mjerenja slijepe probe. Dobivena granica detekcije iznosila je 0,840 mg L⁻¹, dok je granica kvantifikacije iznosila 1,400 mg L⁻¹ [26].

Granica detekcije i granica kvantifikacije za metodu ispitivanja akroleina iz vode i tla određene su metodom omjera signala i šuma pri čemu je LOD 0,060 µg L⁻¹ te LOQ 0,200 µg L⁻¹ [33].

Ledauphin i sur. su koristili metoda omjera signala i šuma za određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije. Granica kvantifikacije za cider iznosila je 6,000 µg L⁻¹, a za Calvados 600,000 µg L⁻¹ [34].

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu razvijena je i validirana HS-SPME/GC-MS metoda za određivanje akroleina u kiselom tijestu. Na temelju analize i razmatranja dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

1. Razvijena je brza i jednostavna HS-SPME/GC-MS metoda za određivanje akroleina u kiselom tijestu. Optimizacijom metode određena je optimalna temperatura i vrijeme mikroekstrakcije akroleina: 40 °C i 20 minuta.
2. Ključni parametri prilikom validacije metode su selektivnost, linearnost i područje, preciznost, točnost, stabilnost, granica detekcije i granica kvantifikacije.
3. Iz prikaza kromatograma akroleina se može zaključiti da je metoda selektivna pri njegovom određivanju.
4. Provedenim istraživanjem utvrđeno je da matriks uzorka značajno utječe na odziv dodanog standarda akroleina. Stoga su rezultati ispitivanja točnosti iskorišteni za izradu novog baždarnog dijagrama metodom dodatka standarda u uzorak.
5. Vrijednost koeficijenta korelacije baždarnog dijagrama ovisnosti omjera odziva akroleina i internog standarda o koncentraciji dodanog akroleina u uzorak viša je od 0,9990 što dokazuje linearan odnos između koncentracije i omjera odziva.
6. Relativne standardne devijacije dobivene ispitivanjem preciznosti metode na temelju ponovljivosti i intermedijarne preciznosti zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti stoga se može zaključiti da je metoda precizna.
7. Ispitivanjem stabilnosti standarda akroleina dokazano je da je ispitivani spoj nestabilan tijekom četiri dana ispitivanja te da je potrebno svakodnevno pripremati svježu otopina standarda.
8. Metodom omjera signala i šuma određene su vrijednosti granice detekcije (0,006 mg L⁻¹) i granice kvantifikacije (0,019 mg L⁻¹).

9. Svi navedeni parametri validacije zadovoljili su kriterije prihvatljivosti stoga se može zaključiti da je razvijena HS-SPME/GC-MS metoda prikladna za određivanje akroleina u kiselom tijestu.

6. LITERATURA

- [1] Cappelle, S., Guylane, L., Gänzle, M., Gobbetti, M. (2013) History and Social Aspects of Sourdough. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, M., ured.), Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 7-10.
- [2] Huys, G., Daniel, H.M., Vuyst, de L. (2013) Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, M., ured.), Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 105-154.
- [3] Gänzle, M., Gobbetti, M. (2013) Physiology and Biochemistry of Lactic Acid Bacteria. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, M., ured.), Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 183-216.
- [4] Galle, S. (2013) Sourdough: A Tool to Improve Bread Structure. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, M., ured.), Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 217-228.
- [5] Gänzle, M., Vogel, R.F. (2003) Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 31-45.
- [6] Vuyst, de L., Neysens, P. (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 43-56.
- [7] Corsetti, A. (2013) Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Application. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, M., ured.), Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 85-104.
- [8] Gobbetti, M. (1998) The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Tech.* **9**, 267-274.
- [9] Katina K., Poutanen K. (2013) Nutritional Aspects of Cereal Fermentation with Lactic Bacteria and Yeast. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, M., ured.), Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 229-244.

-
- [10] Arendt, E.K., Moroni, A. (2013) Sourdough and Gluten-Free Products. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, M., ured.), Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 245-264.
- [11] Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., Le Blay, G. (2007) Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol.* **7**, 101.
- [12] Chen, G., Yang, D., Xiao, Y., Chen, H. (2011) Influence of Conditions on Reuterin Accumulation by the Resting Cell Biotransformation Process. *Chin. J. Chem. Eng.***19**(6) 1023-1027.
- [13] Stevens, M., Vollenweider, S., Lacroix, C. (2010) The potential of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* as a broad spectrum preservative in food. U: Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation, (Lacroix, C., ured.), Woodhead Publishing, Paris, str. 129-160.
- [14] Rasch, M. (2002) The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 225-231.
- [15] Concise International Chemical Assessment Document 43 (Acrolein) (2002) World Health Organisation, Geneva.
- [16] Abraham, K., Andres, S., Palavinskas, R., Berg, K., Appel, K.E., Lampen, A. (2011) Toxicology and risk assessment of acrolein in food. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 1277-1290.
- [17] Toxicological profile for acrolein (2007) U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Georgia.
- [18] Schaefer, L., Auchtung, T.A., Hermans, K.E., Whitehead, D., Borhan, B., Britton, R.A. (2010) The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* **156**, 1589-1599.
- [19] Sriramulu D.D., Liang M., Hernandez-Romero, D., Raux-Deery E., Lünsdorf H., Parsons J.B., Warren M.J., Prentice M.B. (2008) *Lactobacillus reuteri* DSM 2016 Produces Cobalamin-Dependent Diol Dehydratase in Metabolosomes and Metabolizes 1,2-Propanediol by Disproportionation. *J. Bacteriol.* **190**, 4559-4562.

-
- [20] Rodriguez E., Arques J.L., Rodriguez R., Nunez M., Medina M. (2003) Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 259-263.
- [21] Guth S., Habermeyer M., Baum M., Steinberg P., Lampen A., Eisenbrand G. (2013) Thermally induced process – related contaminants: The example of acrolein and the comparison with acrylamide. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 2269-2282.
- [22] Moghe A., Ghare S., Lamoreau B., Mohammad M., Barve S., McClain C., Joshi-Barve S. (2015) Molecular Mechanisms of Acrolein Toxicity: Relevance to Human Disease. *Toxicol. Sci.* **143**, 242-255.
- [23] Solid Phase Microextraction (1998) Bulletin 923, Supelco, Bellafonte, Sjedinjene Američke Države.
- [24] Snow, N.H., Slack, G.C. (2004) Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography. U: Modern Practice of Gas Chromatography, 4. izd. (Grob, R.L., Barry, E.F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 547-604.
- [25] Masucci, J.A., Caldwell, G.W. (2004) Techniques for Gas Chromatography/Mass Spectrometry. U: U: Modern Practice of Gas Chromatography, 4. izd. (Grob, R.L., Barry, E.F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 339-401.
- [26] Osório, V.M., de Lourdes Cardeal, Z. (2011) Determination of acrolein in french fries by solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1218**, 3332-3336.
- [27] Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2006) Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **165**, 216-224.
- [28] Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality insurance. *Trend. Anal. Chem.* **23**, 480-490.
- [29] Shabir, G.A. (2013) Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry, The Institute of Validation Technology, Burlington, MA, Sjedinjene Američke Države.
- [30] Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2014) Somatek Inc., San Diego, SAD.

-
- [31] Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri* **1**, 61-64.
- [32] Lopez Garcia, P., Buffoni, E., Pereira Gomes, F., Vilchez Quero, J.L. (2011) Analytical Method Validation. U: *Wide Spectra of Quality Control*, (Akyar, I., ured.), Intech, str. 3-20.
- [33] Lim, H.H., Shin H.S. (2012) Simple Determination of Acrolein in Surface and Drinking Water by Headspace SPME GC-MS. *Chromatographia* **75**, 943-948.
- [34] Ledauphin J., Lefrancois A., Marquet N., Beljean-Leymarie M., Barillier D. (2006) Development of an accurate and sensitive gas chromatographic method for the determination of acrolein content in Calvados and cider. *LWT* **39**, 1045-1052.