

Justyna Gromadzka, Waldemar Wardencki  
Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Analitycznej

## Opracowanie procedury oznaczania lotnych produktów utlenienia olejów roślinnych techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej\*

The development of a new procedure for determination of volatile oxidation products in edible oils with the use of static headspace analysis

Słowa kluczowe: oleje roślinne, analiza fazy nadpowierzchniowej, kapilarna chromatografia gazowa, lotne markery utleniania, promieniowanie UV

W publikacji przedstawiono dobór optymalnych parametrów w celu opracowania nowej metody diagnozowania jakości olejów poprzez oznaczenie lotnych związków będących produktami reakcji utleniania olejów. Próbkę rafinowanych olejów roślinnych przed analizą poddano procesowi przyspieszonego utleniania, stosując naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym (12 W, 254 nm). Jako technikę ekstrakcji lotnej frakcji próbki zastosowano statyczną analizę fazy nadpowierzchniowej (HSA). Dobrano optymalne parametry tej techniki (objętość próbki 8 ml, czas i temperatura termotowania odpowiednio 20 min i 80°C, objętość dozowanej do kolumny fazy nadpowierzchniowej 0,16 cm<sup>3</sup>). Wyznaczono również niektóre parametry walidacyjne. Precyzja i czułość metody wyrażone jako współczynnik zmienności CV (< 20%) i granica wykrywalności LOD (w przedziale 3–50 mg/kg) są zadowalające dla tego typu oznaczeń. Oznaczenie składu próbek dokonano na podstawie czasów retencji substancji wzorcowych stosując kapilarną chromatografię gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (kolumna SPB-20, Supelco, 30 m × 0,25 mm × 1 μm).

Key words: edible vegetable oils, headspace analysis, capillary gas chromatography, volatile oxidation markers, UV irradiation

This paper presents a selection of optimal conditions for a new promising method to diagnose quality of oil by determination of volatile compounds which are products of oil oxidation. The UV irradiation was used for acceleration of oxidation process of refined edible oils. The static headspace analysis (HSA) was used for sample preparation. Optimal parameters of this technique were chosen (sample volume 8 ml, time and temperature of equilibrium 20 min and 80°C) and some validation parameters were determined. Method precision and sensitivity expressed as variation coefficient CV (< 20%) and the limit of detection LOD (between 3 and 50 mg/kg) are satisfactory. Sample composition was determined on the basis of standard compounds retention times using capillary gas chromatography with flame-ionization detector (column: SPB-20, Supelco, 30 m × 0.25 mm × 1 μm).

\* Praca wykonana w ramach grantu 312 056 31 oraz grantu promotorskiego 312 2279 36 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz współfinansowana przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach projektu „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów, I edycja”. Była ona częściowo prezentowana podczas XXIX Konferencji Naukowej „Rośliny Oleiste”, Poznań, 11-12 marca 2008.

## Wprowadzenie

---

Oleje roślinne są tłuszczami powszechnie stosowanymi w diecie człowieka. W procesie technologicznym otrzymywania olejów roślinnych, jak i w czasie ich przechowywania ulegają one różnego rodzaju przemianom, w tym między innymi procesom utleniania (Choe, Min 2006). W wyniku reakcji utleniania lipidów powstają w olejach liczne lotne związki (pierwotne i wtórne produkty utlenienia), jak estry, etery, aldehydy, ketony, laktony, alkohole, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, sprzężone dieny itp. (Drozdowski 2002). Ilościowym markerem świeżości można uznać wzrost zawartości alkoholi sześciowęglowych i ketonów pięciowęglowych (Cavalli i in. 2004). Jako wskaźnik procesów utleniania tłuszczu wykorzystuje się także wzrost zawartości aldehydów, m.in. heksanal i nonanal (Gromadzka, Wardencki 2008), lub wręcz stosunek ilościowy heksanal do nonanal lub 2-*trans*-nonenal w badanej próbce (Gromadzka i in. 2008), dlatego związki te wytypowano jako wzorce na etapie opracowania metody. Badania nad olejami roślinnymi prowadzili także badacze węgierscy Keszler, Heberger i Gude (olej słonecznikowy) (Keszler i in. 1998) oraz grupa prof. Jelenia z Poznania (olej rzepakowy) (Jeleń i in. 2000, 2007). Badali oni lotne produkty utleniania olejów roślinnych z zastosowaniem opracowanej w latach 90. ubiegłego wieku przez prof. Pawliszyną metody mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej do fazy stacjonarnej (Arthur, Pawliszyn 1990). Technikę tę połączyli z analizą chromatograficzną z detekcją przy pomocy spektrometru mas. Wśród zidentyfikowanych produktów utleniania, obok heksanal, nonanal i wielu innych związków lotnych, znalazł się m.in. również *trans*-2-nonenal, zaproponowany przez wspomnianych badaczy jako potencjalny marker procesu utleniania.

Heksanal powstaje zarówno w procesie chemicznego utlenienia kwasu linolowego, jak i w enzymatycznych procesach metabolicznych szlaku lipooksygenazy (Jimenez i in. 2004). Na podstawie badań Vichi (2003) można stwierdzić, iż najlepszym markerem stabilności oksydatywnej olejów zawierających w swoim składzie duże ilości kwasu linolowego i linolenowego (oliwa z oliwek, olej rzepakowy) jest nonanal, który powstaje w procesie autooksydacji. Nie jest on produktem szlaku lipooksygenazy, jak ma to miejsce w przypadku heksanal, a powstaje w procesie utlenienia kwasu oleinowego. Nonanal wykazuje najwyższy stopień przyrostu w trakcie procesu utlenienia, dlatego został uznany za odpowiedni indeks stopnia utlenienia (Vichi i in. 2003). Oznaczenie lotnych substancji w próbkach tłuszczu umożliwia z jednej strony określenie świeżości oleju i stopnia jego utlenienia (Jimenez i in. 2004, Vichi i in. 2003), z drugiej zaś otwiera możliwość stosunkowo łatwej, szybkiej i taniej techniki wykrywania zafałszowań droższych olejów olejami tańszymi. Dlatego zachodzi potrzeba opracowania szybkiej i czulej metody pozwalającej na wykrywanie tych lotnych związków.

Dotychczasowe metody badania stabilności oksydacyjnej próbek tłuszczów opierały się na dwóch rodzajach testów: statycznych i przyspieszonych (Szukalska 2003). Test statyczny to test normalny, w którym badany produkt przechowywany jest w warunkach normalnych, czyli zbliżonych do warunków przechowywania olejów w sklepach i gospodarstwach domowych, i badany okresowo. Określa się w nim zazwyczaj zmiany organoleptyczne (analiza sensoryczna), liczbę nadtlenkową (LOO) i liczbę anizydynową (LAn), przeprowadza badania za pomocą chromatografii gazowej oraz spektrofotometrii. Konsekwencją utleniania jest zmiana składu kwasów tłuszczowych (spadek zawartości kwasów polienowych, wzrost monoenowych i nasyconych), spadek zawartości tokoferoli i związków polifenolowych, wzrost stężenia sprzężonych dienów. Podstawową wadą testów normalnych jest bardzo długi czas ich trwania, sięgający kilku miesięcy.

Testy przyspieszone dają wyniki w krótkim czasie. W testach tych olej poddawany jest przyspieszonemu utlenianiu w wyniku stosowania podwyższonej temperatury, zwiększenia powierzchni kontaktu z tlenem i przez naświetlanie promieniowaniem UV (Szukalska 2003).

Powszechnie stosowane techniki chromatograficzne wymagają odpowiedniego przygotowania próbki przed analizą. Wśród najpopularniejszych metod wymienić można estryfikację kwasów tłuszczowych (FAME) oraz techniki ekstrakcji z fazy gazowej (nadpowierzchniowej): statyczna analiza fazy nadpowierzchniowej (HSA) oraz mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME).

Statyczna analiza fazy nadpowierzchniowej jest metodą względnie tanią, szybką, uniwersalną, czułą i bez konieczności stosowania rozpuszczalników (Snow, Snack 2002). Może być przeprowadzona zarówno w warunkach statycznych, jak i dynamicznych. Może być łączona ze spektrometrem mas lub detektorem FID. Technikę HSA łączono bezpośrednio ze spektrometrem mas pomijając etap rozdzielania przy pomocy kapilarnej chromatografii gazowej. Technikę tę zastosował m.in. Lorenzo do identyfikacji zafałszowań w oliwie z oliwek (Lorenzo i in. 2002). Poprzez oznaczenie całkowitej ilości lotnych produktów degradacji lipidów można scharakteryzować olej zarówno surowy, jak i rafinowany. Metoda ta umożliwia również szybkie rozróżnianie olei roślinnych, określanie ich czystości lub zafałszowania innymi olejami, a także pozwala śledzić zmiany zachodzące w trakcie przechowywania olejów.

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej została wprowadzona jako alternatywa do dynamicznego HSA (Povolo, Contarini 2003). Podobnie jak HSA, jest to metoda łatwa w zastosowaniu, szybka, uniwersalna i bezrozpuszczalnikowa. W technice tej lotne produkty utleniania olejów są najpierw sorbowane z fazy nadpowierzchniowej do stałego sorbentu, a następnie termicznie desorbowane w gorącym dozowniku chromatografu gazowego (Arthur, Pawliszyn 1990; Pawliszyn 1997).

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania techniki statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej z wcześniejszym naświetlaniem próbki promieniowaniem ultrafioletowym w celu przyspieszenia procesu utleniania do szybkiego i dokładnego określenia stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych.

## Materialy i metody

---

### Próbki i odczynniki

Surowcem wyjściowym do badań były oleje rafinowane: rzepakowy (Kujawski, ZT Kruszwica, Polska; Rainbow Inex Partners Oy Helsinki, Finlandia) oraz słonecznikowy (Bartek, ZPT Warszawa, Polska; Rainbow Inex Partners Oy Helsinki, Finlandia) zakupione w lokalnym sklepie spożywczym. Substancje wzorcowe stosowane w celu identyfikacji produktów utleniania badanych próbek olejów oraz na etapie doboru optymalnych parametrów ekstrakcji i analizy chromatograficznej: pentanal 87% GC (Fluka), heksanal 97% GC (Fluka), heptanal 95% GC (Fluka), oktanal 98% GC (Fluka), nonanal 95% GC (Fluka), 2-*trans*-heptenal 96% GC (Fluka), dekan 98% GC (Fluka), dodekan 98% GC (Fluka). Roztwory substancji wzorcowych przygotowywane były w heksanie (Merck) poprzez dodanie do rozpuszczalnika poszczególnych wzorców w celu uzyskania stężenia końcowego każdego z nich na poziomie 250 µg/ml. Tak przygotowane roztwory wzorców dodawano do próbek oleju bezpośrednio przed przystąpieniem do analizy.

### Przygotowanie próbek do analiz

Wszystkie roztwory wzorcowe, wzorce handlowe i próbki olejów przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C, aby uniknąć ich degradacji.

Dla identyfikacji aldehydów (GC/FID) do próbek badanego oleju rzepakowego dodawano odpowiednią ilość przygotowanych roztworów wzorcowych o stężeniu 250 µg/ml heksanu.

Ustalanie optymalnych parametrów analizy prowadzono stosując próbki oleju przygotowane według powyższego opisu. Próbki umieszczano w fiolkach szczelnie zamykanych silikonowo-teflonową membraną i aluminiowym kapslem. Tak przygotowane próbki poddawano termostatawaniu w temperaturze 80°C przez okres 20 minut. Następnie poddawano analizie z zastosowaniem techniki statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej.

### Warunki naświetlania promieniowaniem UV

W celu przyspieszenia procesu utleniania próbki oleju naświetlano promieniowaniem ultrafioletowym, stosując dwie lampy rtęciowe niskociśnieniowe o mocy 2 × 6 W i maksimum emisji przy 254 nm (Cobravid, Warszawa). Próbkę zawierającą 10 ml oleju umieszczano w kuwecie kwarcowej pod lampą i poddawano naświetlaniu przez określony czas (0–24 h). Próbki do badań pobierano co 6 godzin.

## Analiza chromatograficzna

Analizy zostały przeprowadzone z zastosowaniem chromatografu gazowego AutoSystem XL (Perkin Elmer) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Faza nadpowierzchniowa pobierana była z próbek automatycznie za pomocą przystawki do analizy fazy nadpowierzchniowej Headspace Sammler Turbo Matrix HS-16 (Perkin Elmer). Gazem nośnym był hel o szybkości przepływu 1 ml/min, analiza odbywała się z podziałem strumienia w stosunku 1:10, temperatura dozownika i detektora wynosiły odpowiednio 170 i 230°C. Rozdzielenie/separację chromatograficzną badanych związków przeprowadzono stosując kolumnę SPB-20 z fazą stacjonarną 20% difenylo/80% dimetylosiloksan (30 m × 0,25 mm × 1 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) w programowanej temperaturze: 50°C (1 min), następnie przyrost 6°C/min do 100°C i kolejny przyrost 15°C/min do 250°C (2 min).

## Wyniki i dyskusja

---

### Identyfikacja indywidualnych związków wzorcowych

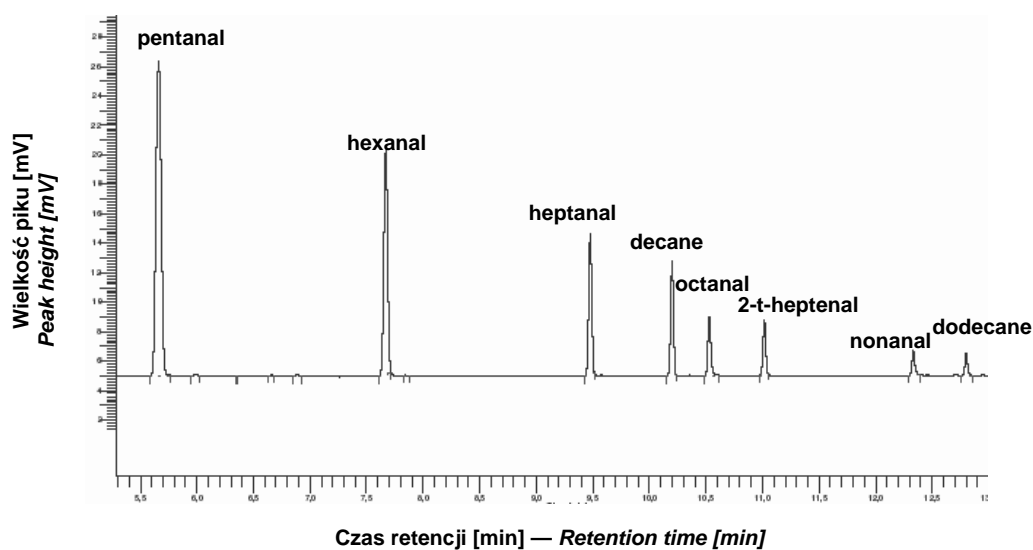
Pojedyncze roztwory wybranych związków wzorcowych zostały poddane analizie z zastosowaniem techniki statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej. Próbki roztworów wzorcowych o objętości 8 ml umieszczano w fiolkach o pojemności 15 ml. W celu osiągnięcia równowagi pomiędzy fazą ciekłą a gazową nad jej powierzchnią, próbki termostатовano przez 30 minut w temperaturze 80°C. Po oznaczeniu czasów retencji poszczególnych badanych związków, w podobny sposób przeprowadzono ekstrakcję, a następnie rozdzielanie składników próbki zawierającej wszystkie substancje wzorcowe w mieszaninie o stężeniu 250 ppm w oleju rzepakowym. Uzyskany chromatogram substancji wzorcowych przedstawia rysunek 1. Z jednej fiołki (próbki) przeprowadzono jedną analizę. Próbek nie poddawano ponownej izolacji/ekstrakcji.

### Dobór optymalnych parametrów ekstrakcji / izolacji analitów

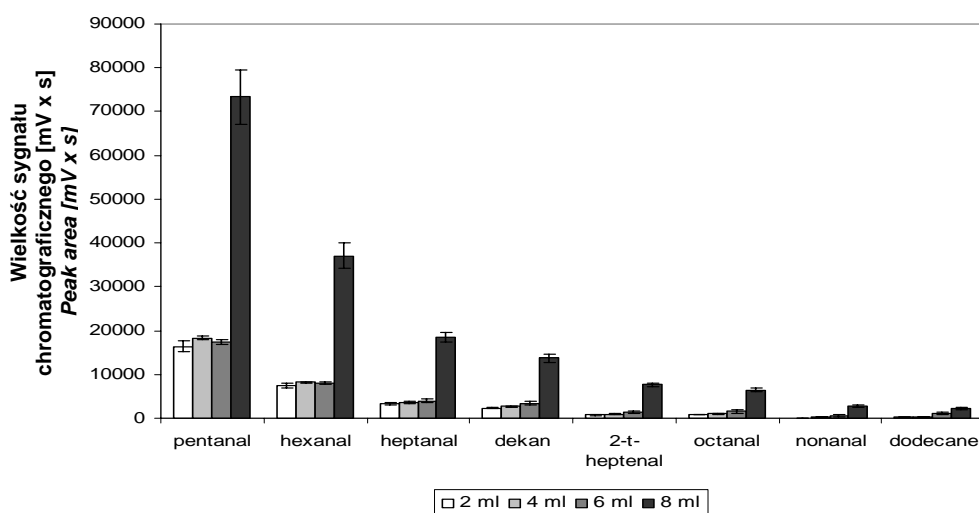
#### *Ustalenie objętości badanej próbki*

W tym celu próbki badanego oleju w ilościach 2, 4, 6 i 8 ml umieszczano w fiolkach o pojemności 15 ml przystosowanych do analizy fazy nadpowierzchniowej. Fiolki szczelnie zamknięte silikonową membraną i aluminiowym kapslem ogrzewano w temperaturze 80°C przez 30 min. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 2.

Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji obserwowano na podstawie zmieniającej się powierzchni pików analizowanych związków. W przypadku małych objętości wpływ był niewielki, zarówno w przypadku związków bardziej lotnych



Rys. 1. Chromatogram wybranych substancji wzorcowych w oleju rzepakowym — *Chromatogram of selected standards in rapeseed oil*

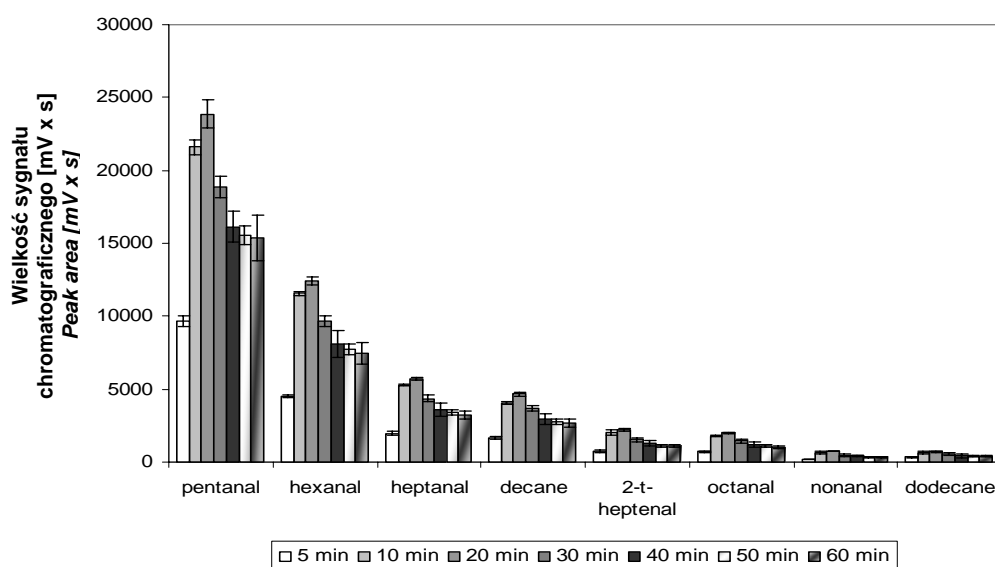


Rys. 2. Wpływ objętości próbki na wielkość sygnału chromatograficznego (olej z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiolce, temp. termostataowania 80°C, czas termostataowania 30 min, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,1 ml, czas wyrównywania ciśnień 2 min) — *Impact of sample volume on extraction efficiency of analytes (oil stock with standards 250 ppm, 30 min of equilibrium at 80 °C, 0.1 ml of headspace introduced into GC column, 2 min of pressurize).*

jak i mniej lotnych, natomiast gdy objętość próbki zwiększano do 8 ml zaobserwowano kilkakrotny wzrost powierzchni piku dla każdego z badanych związków. Dlatego też objętość 8 ml oleju uznano jako odpowiednią dla fiolki o pojemności 15 ml. Jest to również największa objętość dopuszczalna z punktu widzenia metod analizy fazy nadpowierzchniowej. W metodach tych bowiem przyjmuje się, że objętość próbki powinna być zbliżona do połowy objętości fiolki ekstrakcyjnej (Pawliszyn 2003; Snow, Snack 2002), co potwierdziły przeprowadzone badania.

#### Ustalenie czasu termostatowania próbek

Kolejnym etapem w dobieraniu optymalnych parametrów analizy było sprawdzenie wpływu czasu termostatowania na wartość odpowiedzi detektora. W tym celu próbki oleju zawierające dodatek mieszaniny wzorców termostatowano w temperaturze 80°C zwiększając kolejno czas o 10 minut od 5 do 60 minut (rys. 3).



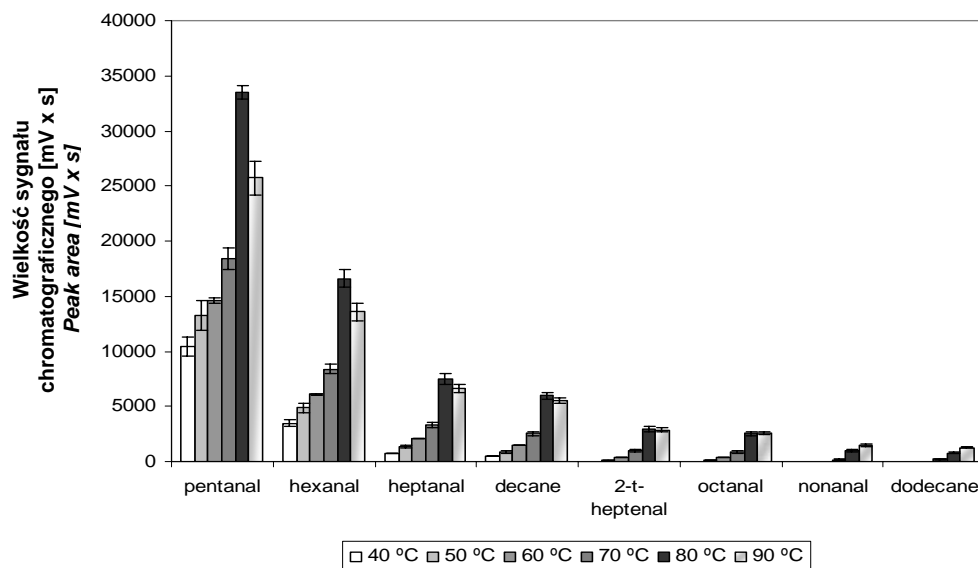
Rys. 3. Wpływ czasu termostatowania na wielkość sygnału chromatograficznego (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiolce, temperatura termostatowania 80°C, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,1 ml, czas wyrównywania ciśnienia 2 min) — *Impact of equilibrium time on extraction efficiency of analytes (8 ml of oil stock with standards 250 ppm, equilibrium at 80°C, 0.1 ml of headspace introduced into GC column, 2 min of pressurize).*

Właściwy dobór czasu termostatowania pozwala zapewnić dobrą powtarzalność wyników. Jest to bowiem czas, w którym dochodzi do ustalenia się równowagi pomiędzy analizowanymi związkami rozpuszczonymi w objętości próbki, a znajdującymi się w fazie gazowej nad powierzchnią próbki. Z uwagi na naj-

większą powierzchnię pików analizowanych związków jako optymalny parametr przyjęto termostatowanie próbek przez 20 minut.

#### *Ustalenie temperatury termostatowania*

Badania wykonano w przedziale temperatur od 40 do 90°C podwyższając temperaturę kolejno o 10°C. Próbki oleju w ilości 8 ml z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm umieszczano w fiolce o pojemności 15 ml. Termostatowanie w badanych temperaturach prowadzono przez 30 minut.



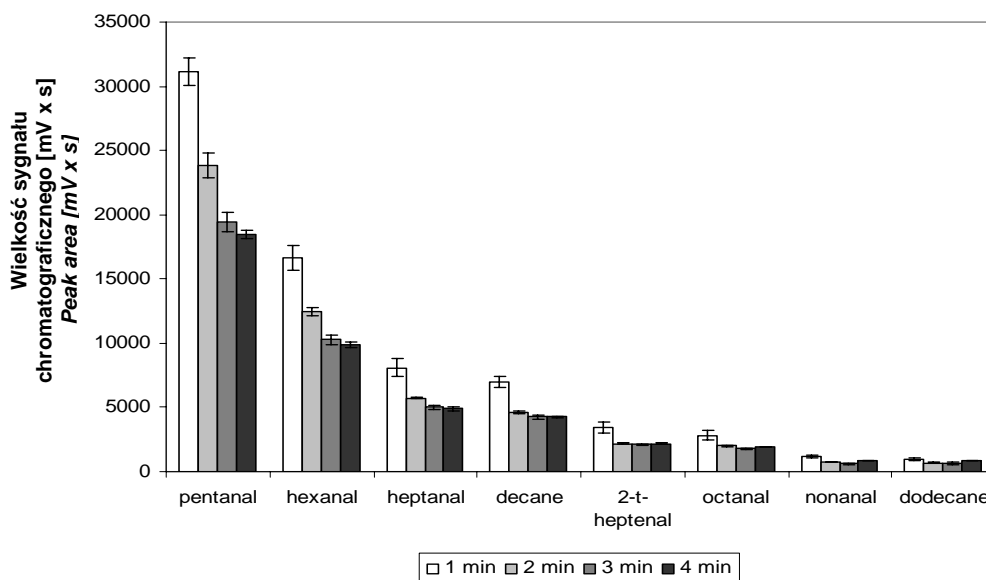
Rys. 4. Wpływ temperatury termostatowania na wielkość sygnału chromatograficznego (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiolce, czas termostatowania 30 min, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,1 ml, czas wyrównywania ciśnienia 2 min) — *Impact of equilibrium temperature on extraction efficiency of analytes (8 ml of oil stock with standards 250 ppm, 30 min of equilibrium, 0.1 ml of headspace introduced into GC column, 2 min of pressurize).*

Jak wynika z rysunku 4, wzrost temperatury termostatowania wpływa na zwiększenie powierzchni pików. Jednak wzrost temperatury znacząco wpływa także na wzrost produktów utleniania w olejach. Dlatego też w temperaturze 90°C obserwowano zmniejszenie powierzchni pików badanych związków, szczególnie w przypadku substancji bardziej lotnych i jednocześnie pojawianie się na chromatogramie dodatkowych pików, wskazujących na powstawanie związków będących produktami przemian termicznych badanych substancji wzorcowych. Jako optymalną wybrano temperaturę 80°C.



*Określenie czasu wyrównywania ciśnień*

Wyrównywanie ciśnienia panującego w fiolce z badaną próbą i w kolumnie chromatograficznej następuje tuż przed wprowadzeniem fazy nadpowierzchniowej do kolumny chromatografu. Dokonuje się tego wprowadzając gaz nośny do fiolki z próbką. Badano czas tego wyrównania w ciągu 1, 2, 3 i 4 minut. Uzyskane wyniki ilustruje rysunek 5.

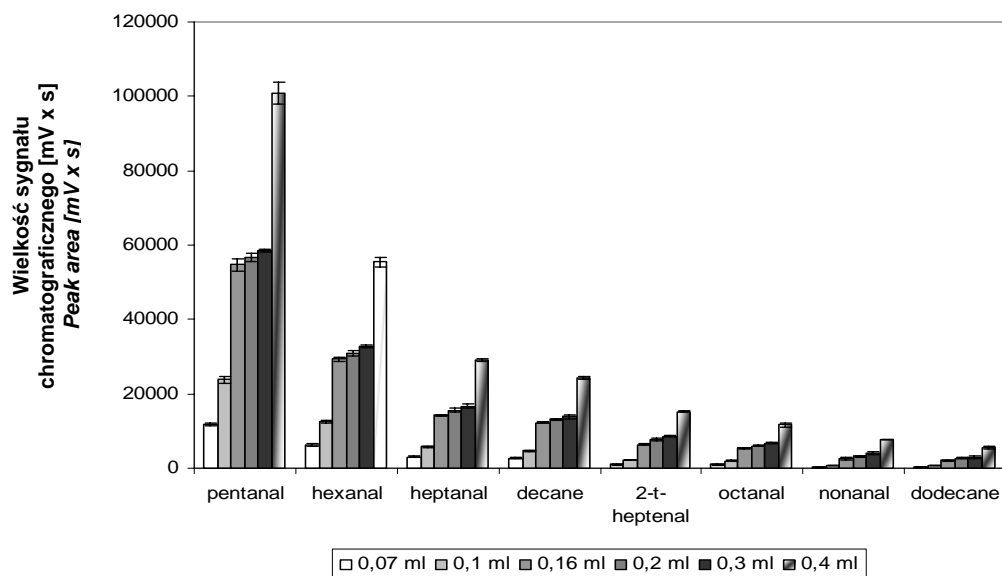


Rys. 5. Wpływ czasu wyrównywania ciśnień na wielkość sygnału chromatograficznego (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiolce, czas termostatowania 30 min, temperatura termostatowania 80°C, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,1 ml) — *Impact of pressurize time on extraction efficiency of analytes (8 ml of oil stock with standards 250 ppm, 30 min of equilibrium at 80 °C, 0.1 ml of headspace introduced into GC column).*

Jak wynika z rysunku 5 już jedna minuta trwania tego etapu pozwala na uzyskanie optymalnej wydajności procesu ekstrakcji.

*Objętość fazy nadpowierzchniowej dozowanej do kolumny chromatograficznej*

Badano zakres objętości od 0,07 do 0,4 ml. Wraz ze wzrostem objętości fazy nadpowierzchniowej dozowanej do kolumny wzrastała powierzchnia pików badanych substancji, jednak zbyt duża objętość powoduje, iż uzyskane na chromatogramie piki stają się niesymetryczne (tzw. „ogonowanie” pików) i rozciągnięte. Dlatego też zdecydowano, że optymalną ilością fazy nadpowierzchniowej podawanej do kolumny jest objętość 0,16 ml.



Rys. 6. Wpływ objętości fazy nadpowierzchniowej na wielkość sygnału chromatograficznego (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiolce, czas termostatowania 30 min, temperatura termostatowania 80°C, czas wyrównywania ciśnień 2 min) *Impact of headspace volume on extraction efficiency of analytes (8 ml of oil stock with standards 250 ppm, 30 min of equilibrium at 80 °C, 2 min of pressurize).*

W wyniku wykonanych badań ustalono optymalne parametry proponowanej metody (tab. 1), które stosowano w dalszym etapie badań oraz przy przeprowadzaniu elementów walidacji metody.

Tabela 1

Optymalne warunki oznaczania związków lotnych w olejach roślinnych – metoda HSA  
*Optimal conditions of HSA of volatile compounds in edible oils*

Parametr ekstrakcji — <i>Extraction parameter</i>	Wartość optymalna — <i>Optimal value</i>
Objętość próbki — <i>Sample volume</i>	8 ml w 15 ml fiolce
Czas termostatowania — <i>Equilibrium time</i>	20 min
Temperatura termostatowania <i>Equilibrium temperature</i>	80°C
Czas wyrównywania ciśnień — <i>Pressurize time</i>	1 min
Objętość fazy nadpowierzchniowej podawanej na kolumnę chromatograficzną — <i>Headspace phase volume</i>	0,16 ml
Podział strumienia — <i>Split ratio</i>	Split 1 : 10

### Liniowość, powtarzalność wyników, granica wykrywalności i oznaczalności

Aby wyznaczyć powtarzalność, a także granicę wykrywalności i oznaczalności przeprowadzono badania roztworów substancji wzorcowych dodawanych do próbek oleju zgodnie z opracowaną procedurą (tab. 1).

Do analizy ilościowej zastosowano metodę kalibracji zewnętrznej, poprzez wyznaczenie krzywych kalibracyjnych. Ze względu na fakt, iż każdy analizowany związek posiada kilka zakresów liniowości w wybranym przedziale stężeń, w których metoda jest liniowa, sporządzono odpowiadające tym zakresom krzywe kalibracyjne. Równania tych krzywych i ich współczynniki regresji zostały zebrane w tabeli 2. Współczynnik regresji określa zależność między badanymi zmiennymi. Im jego wartość jest bliższa jedności, tym korelacja jest silniejsza. Przedstawione w tabeli współczynniki regresji są bliskie jedności, co świadczy o liniowej zależności pomiędzy analizowanymi wartościami.

Tabela 2

Równania krzywych kalibracyjnych i współczynników regresji dla badanych substancji wzorcowych w oleju roślinnym wyekstrahowanych techniką HSA/GC/FID — *Equation of calibration and regression coefficient with regard to some selected standards in edible oil obtained using a HSA/GC/FID technique*

Związek <i>Compound</i>	Zakres liniowości [ppm] <i>Linearity range</i>	Równanie krzywej <i>Equation of calibration</i>	Współczynnik regresji <i>Regression coefficient</i>
pentanal	1–40	$y = 49,514x + 53,712$	0,9981
	40–100	$y = 63,587x - 666,05$	0,9973
	100–250	$y = 85,646x - 2359,8$	0,9940
hexanal	5–30	$y = 27,08x + 53,712$	0,9991
	30–90	$y = 17,736x + 271,24$	0,9972
	90–250	$y = 40,733x - 1581,4$	0,9922
heptanal	10–40	$y = 5,5351x + 18,894$	0,9852
	40–100	$y = 10,318x - 142,74$	0,9865
	100–250	$y = 17,273x - 719,65$	0,9939
decane	10–50	$y = 7,61x + 12,417$	0,9858
	50–100	$y = 6,8826x + 84,624$	0,9846
	100–250	$y = 13,413x - 423,21$	0,9922
octanal	60–100	$y = 2,1549x - 74,637$	0,9434
	100–250	$y = 6,3219x - 477,14$	0,9980
2-t-heptenal	100–250	$y = 4,4981x - 436,40$	0,9925
nonanal	225–375	$y = 1,7511x - 328,33$	0,9478
dodecane	90–187,5	$y = 0,9296x - 41,047$	0,9800
	187,5–375,0	$y = 2,2784x - 292,05$	0,9961

Na podstawie uzyskanych krzywych kalibracyjnych wyznaczono następnie granice wykrywalności i oznaczalności metody dla analizowanych substancji wzorcowych. Granica wykrywalności (LOD) jest najmniejszą ilością lub stężeniem substancji możliwym do wykrycia za pomocą danej metody czy też techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem, natomiast granica oznaczalności (LOQ) to najmniejsza ilość lub stężenie substancji możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą analityczną z założoną dokładnością i precyzją (Konieczka 2003a).

Granica wykrywalności dla wszystkich analizowanych związków została obliczona na podstawie odchylenia standardowego zbioru sygnałów i kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej. Przy wyznaczaniu granicy wykrywalności posłużono się następującą zależnością:

$$LOD = 3,3 \times s/b,$$

gdzie  $b$  — współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

$$s \text{ — odchylenie standardowe obliczone wg wzoru: } s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n-2}},$$

gdzie  $y_i$  — wartości sygnałów dla danych zawartości oznaczanego związku, na podstawie których wyznaczono krzywą kalibracyjną

$Y_i$  — wartości sygnałów dla danych zawartości oznaczanego związku obliczone na podstawie uzyskanej krzywej kalibracyjnej

$n$  — liczba roztworów wzorcowych poddanych oznaczeniu w celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej.

Natomiast jako granicę oznaczalności przyjęto trzykrotną wartość granicy wykrywalności:

$$LOQ = 3 \times LOD$$

Obliczone granice wykrywalności i oznaczalności dla wybranych substancji wzorcowych przedstawiono w tabeli 3, w której umieszczono również wartość powtarzalności metody. Powtarzalność lub inaczej precyzja charakteryzuje rozrzut uzyskanych wyników wokół wartości średniej. Jej miarą jest odchylenie standardowe rozumiane jako współczynnik zmienności  $CV = RSD \times 100\% = (SD/\text{średnia}) \times 100\%$  (Konieczka 2003 b).

Powtarzalność, jak i LOD, jest na zadowalającym poziomie, gdyż przeciętny błąd popełniany podczas analizy fazy nadpowierzchniowej opisany poprzez współczynnik powtarzalności mieści się w przedziale 2,5–37% (Keszler i in. 1998), a granice wykrywalności dla metod wykorzystujących tę technikę przygotowania próbki mieszczą się w zakresie 18–173 mg/kg (Keszler i in. 1998). Uzyskane wyniki umieszczono w tabeli 3.

Tabela 3

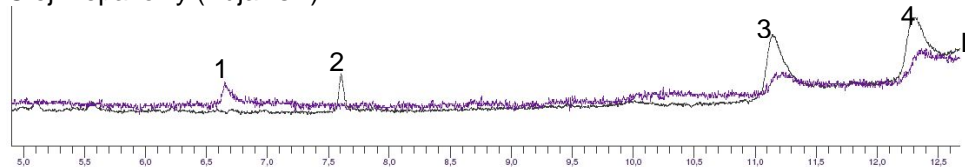
Granica oznaczalności (LOD), wykrywalności (LOQ) oraz powtarzalność (CV) w odniesieniu do wybranych substancji wzorcowych w oleju roślinnym ekstrahowanych techniką HSA/GC/FID — *Repeatability (CV), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for some selected standards in edible oil obtained using HSA/GC/FID technique*

Związek — <i>Compound</i>	LOD [mg/kg]	LOQ [mg/kg]	CV [%]
pentanal	4,41	13,23	2,3
hexanal	3,21	9,62	6,9
heptanal	20,37	61,11	9,3
decane	16,21	48,62	9,4
2-t-heptenal	26,91	80,73	7,1
octanal	21,41	64,23	13,3
nonanal	50,66	151,97	19,7
dodecane	27,02	81,07	8,2

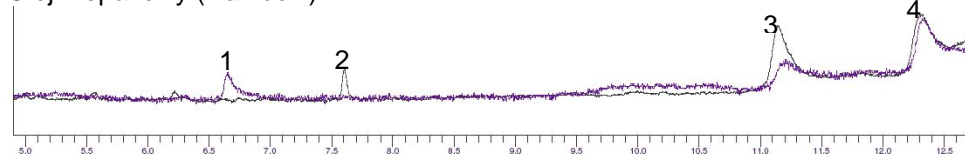
### Analiza próbek olejów roślinnych

Ostatnim etapem prezentowanych badań była analiza próbek olejów roślinnych, które wcześniej zostały poddane naświetleniu promieniowaniem ultrafioletowym w celu przyspieszenia procesu ich utleniania. Reakcję fotoutleniania przeprowadzono stosując reaktor z dwiema niskociśnieniowymi rtęciowymi lampami ultrafioletowymi o mocy każdej z lamp 6 W i maksimum emisji przy długości fali  $\lambda_{\max} = 254$  nm. W tym celu 10 ml próbki oleju umieszczano w kuwecie kwarcowej, a następnie kuwety umieszczano w fotoreaktorze i poddawano naświetlaniu przez 24 godziny. Po naświetlaniu z próbki pobierano 8 ml oleju i umieszczano w 15 ml fiolce. Szczelnie zamkniętą zawartość fiolki termostatowano przez 20 min w 80°C, pobierano fazę nadpowierzchniową, a następnie poddawano analizie chromatograficznej z zastosowaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego zgodnie z opisaną poprzednio procedurą. Analizowane związki zidentyfikowano na podstawie czasów retencji, porównując je z czasami retencji związków w mieszaninie wzorcowej. Na rysunku 7 przedstawiono przykładowe chromatogramy analizowanych olejów roślinnych poddanych naświetlaniu promieniami UV przez 24 h oraz świeżych olejów rafinowanych nie naświetlanych. We wszystkich naświetlanych olejach obserwuje się wyraźny wzrost zawartości pentanal, heksanal, 2-trans-heptenal i nonanal, przy czym wzrost zawartości heksanal jest zdecydowanie bardziej wyraźny, co potwierdza tezę, że związek ten jest dobrym wskaźnikiem jakości olejów roślinnych.

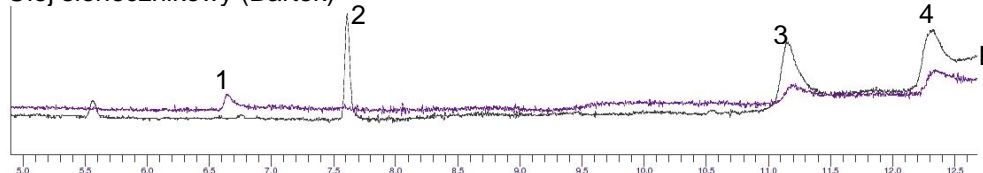
Olej rzepakowy (Kujawski)



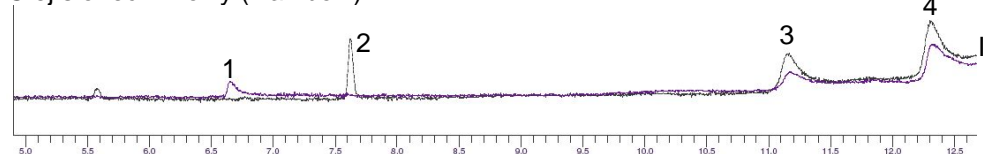
Olej rzepakowy (Rainbow)



Olej słonecznikowy (Bartek)



Olej słonecznikowy (Rainbow)



Objaśnienia — *Explanatory notes*: 1 – pentanal, 2 – hexanal, 3 – 2-*trans*-heptenal, 4 – nonanal

Rys. 7. Chromatogramy olejów rzepakowych i słonecznikowych świeżych rafinowanych (I) i naświetlanych promieniowaniem UV (II) przez 24 h (12 W, 254 nm) uzyskane w wyniku statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej połączonej z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID, kolumna SPB-20 (Supelco, 30 m × 0,25 mm × 1 μm), program temp.: 50°C (1 min), 6°C/min do 100°C, 15°C/min do 250°C (2 min)

*Chromatograms of fresh refined (I) and irradiated (II) (24h, UV 12 W, 254 nm) rapeseed and sunflower oils obtained after static headspace coupled with gas chromatography analysis with FID detector, column SPB-20 (Supelco, 30 m × 0,25 mm × 1 μm), temperature programme: 50 °C (1 min), 6 °C/min to 100 °C, 15 °C/min to 250 °C (2 min).*

## Podsumowanie

---

Opracowana metoda jest szybka, łatwa w wykonaniu i częściowo zautomatyzowana. Praca analityka ogranicza się jedynie do pobrania próbek i umieszczenia ich w automatycznym dozowniku próbek przystawki do analizy fazy nadpowierzchniowej. Metoda nie wymaga stosowania rozpuszczalników (analiza związków lotnych nad powierzchnią próbki), dzięki czemu jest przyjazna dla środowiska i może być zaliczana do technik prośrodowiskowych, spełniających wymagania „zielonej chemii”. Proponowana metoda umożliwi śledzenie procesu utleniania olejów poprzez oznaczanie zawartości heksanal w próbce.

## Literatura

---

- Arthur C., Pawliszyn J. 1990. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62: 2145-2148.
- Cavalli J-F., Fernandez X., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau A-M. 2004. Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. *Food Chem.*, 88: 151-157.
- Choe E., Min D.B. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety.*, 5: 169-186.
- Drozdowski B. 2002. *Lipidy*. W: *Chemia Żywności* (Sikorski Z.E. red.). Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2002.
- Gromadzka J., Wardencki W., Lores M., Lompart M., Fernandez-Alvarez M., Lipińska K. 2008. Investigation of edible oils oxidation stability using photooxidation and SPME/GC method for determination of volatile compounds – preliminary investigation. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 58 (3): 321-324.
- Gromadzka J., Wardencki W. 2008. Dobór optymalnych parametrów metody UV-HS-SPME/GC/FID do oceny stabilności oksydatywnej olejów roślinnych. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 5 (60): 235-247.
- Jeleń H.H., Mildner-Szkudlarz S., Jasińska I., Wąsowicz E. 2007. A headspace-SPME-MS method for monitoring rapeseed oil autoxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84: 509-517.
- Jeleń H.H., Obuchowska M., Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E. 2000. Headspace Solid-Phase Microextraction Use for the Characterization of Volatile Compounds in Vegetable Oils of Different Sensory Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2360-2367.
- Jimenez A., Beltran G., Aguilera M.P. 2004. Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils. *J. Chromatogr., A*, 1028: 321-324.
- Keszler A., Heberger K., Gude M. 1998. Quantitative analysis of aliphatic aldehydes by a headspace SPME sampling and ion-trap GC MS. *Chromatographia*, 48 (1/2): 127-132.
- Konieczka P. 2003a. Sposoby wyznaczania granicy wykrywalności i oznaczalności. *Chem. Inż. Ekol.*, 10 (7): 639-654.
- Konieczka P. 2003b. Walidacja metodyk analitycznych. *Chem. Inż. Ekol.*, 10 (10): 1071-1099.

- Lorenzo I.M., Pavon J.L.P., Laespada M.E.F., Pinto C.G., Cordero B.M. 2002. Detection of adulterants in olive oil by headspace–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 945: 221-230.
- Pawliszyn J. 1997. *Solid phase microextraction: theory and practice*. Wiley-VCH, New York.
- Pawliszyn J. 2003. Sample preparation: Quo vadis? *Anal. Chem.*, 75: 2543-2558.
- Povolo M., Contarini G. 2003. Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis of the volatile fraction of butter. *J. Chromatogr. A*, 985: 117-125.
- Snow N.H., Snack G.C. 2002. Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trends Anal. Chem.*, 21 (9+10): 608-617.
- Szukalska E. 2003. Wybrane zagadnienia utleniania tłuszczów. *Tł. Jad.*, 38: 42-58.
- Vichi S., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S., Pez-Tamames E.L. 2003. Solid-phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: characterization of virgin olive oils from two distinct geographical areas of northern Italy. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6572-6577.