

JUSTYNA GROMADZKA, WALDEMAR WARDENCKI

DOBÓR OPTYMALNYCH PARAMETRÓW METODY UV-HS-SPME/GC/FID DO OCENY STABILNOŚCI OKSYDATYWNEJ OLEJÓW ROŚLINNYCH

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań był dobór optymalnych parametrów nowej metody diagnozowania jakości olejów na podstawie oznaczenia lotnych związków będących produktami reakcji utleniania tych olejów. Przed analizą próbki rafinowanych olejów roślinnych poddano procesowi przyspieszonego utleniania, stosując naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym (12 W, 254 nm). Jako technikę przygotowania próbki do analizy zastosowano mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME). Dobrano optymalne parametry tej techniki (włókno DVB/CAR/PDMS, objętość próbki 8 ml, czas i temperatura ekstrakcji odpowiednio 15 min i 30 °C). Wyznaczono również niektóre parametry walidacyjne. Precyzja i czułość metody, wyrażone jako współczynnik zmienności CV (< 10 %) i granica wykrywalności LOD (w przedziale 162 – 346 µg/kg), okazały się 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 x 0,25 mm x 1 µm).

Słowa kluczowe: oleje roślinne, naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym, związki lotne, produkty utleniania, analiza fazy nadpowierzchniowej, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)

Wprowadzenie

Tłuszcze roślinne stanowią jeden z ważniejszych składników diety, szczególnie oleje o wysokiej zawartości niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych – NNKT, takich jak kwas linolowy i linolenowy (słonecznikowy, rzepakowy, sojowy, oliwa) [18]. Związki te charakteryzują się wieloma walorami zdrowotnymi: przeciwdziałają chorobom serca i układu krążenia, utrzymują prawidłowy poziom cholesterolu we krwi, wykazują działanie przeciwkrzepliwe, wpływają na cykl metaboliczny komó-

rek, zapewniają optymalny rozwój mózgu i wzroku, zawierają prekursory witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, E, D₃, K) [14].

Ze względu na dużą zawartość kwasów nienasyconych, oleje roślinne, pomimo wchodzących w ich skład naturalnych przeciwutleniaczy [22], są podatne na procesy utleniania tlenem atmosferycznym zarówno w reakcjach autooksydacji, jak i w procesach utleniania fotosensybilizowanego [3, 6]. Proces fotosensybilizowanego utleniania zachodzi szybciej niż autooksydacja, a różnice w reaktywności pomiędzy kwasami: oleinowym, linolowym i linolenowym są w przybliżeniu proporcjonalne do liczby występujących w nich wiązań podwójnych. Produkty tych procesów, a wśród nich lotne metyloketony, aldehydy, alkohole i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe [21], wpływają na jakość oleju. Ilościowym markerem świeżości można uznać wzrost zawartości alkoholi sześciowęglowych i ketonów pięciowęglowych [2]. Jako wskaźnik procesów utleniania tłuszczu wykorzystuje się także wzrost zawartości aldehydów, m.in. heksanalu i nonanal lub wręcz stosunek ilościowy heksanal do nonanal lub 2-*trans*-nonenal w badanej próbce, dlatego związki te wytypowano jako wzorce na etapie opracowania metody [9, 25]. Wiele powstających w trakcie przemian oksydacyjnych związków ma negatywny lub wręcz toksyczny wpływ na organizm człowieka. Dlatego zachodzi potrzeba opracowania szybkiej i czulej metody pozwalającej na wykrywanie tych lotnych związków.

Obiecującym rozwiązaniem może być zastosowanie jednej z technik analizy fazy nadpowierzchniowej. Wspomniane techniki są szybkie, uniwersalne, czule, nie wymagają stosowania rozpuszczalników, dobrze nadają się do przygotowania próbek do analizy chromatograficznej [16]. W zastosowanej w pracy technice mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej SPME, opracowanej przez Arthura i Pawliszyna [1, 19], wykorzystuje się zjawisko sorpcji analitów z fazy napowierzchniowej na włóknie z krzemionki pokrytym warstwą polimeru, a następnie ich desorpcji w gorącym dozowniku chromatografu gazowego. SPME jest łatwą do praktycznego zastosowania techniką analizy próbek olejów roślinnych. Poprzez oznaczenie całkowitej ilości lotnych produktów degradacji lipidów można scharakteryzować zarówno olej surowy, jak i rafinowany. Metoda ta umożliwia również szybkie rozróżnienie olejów roślinnych, określenie ich czystości lub zafałszowania innymi olejami, a także pozwala śledzić zmiany zachodzące w trakcie przechowywania olejów [4, 17].

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z wcześniejszym naświetlaniem próbki promieniowaniem ultrafioletowym w celu przyspieszenia procesu utleniania do szybkiego i dokładnego oceniania jakości i stopnia świeżości olejów spożywczych.

Material i metody badań

Próbki i odczynniki

Surowcem wyjściowym do badań były oleje rafinowane: rzepakowy (Kujawski, Z.T. Kruszwica), słonecznikowy (Bartek, ZPT Warszawa), oraz sojowy (Perla, Casagiove, Italy) zakupione w lokalnym sklepie spożywczym. Substancje wzorcowe stosowane w celu identyfikacji analitów próbek rzeczywistych oraz na etapie doboru optymalnych parametrów reakcji ekstrakcji i analizy chromatograficznej: pentanal 87 % GC (Fluka), heksanal 97 % GC (Fluka), heptanal 95 % GC (Fluka), oktanal 98 % GC (Fluka), nonanal 95 % GC (Fluka), dekanal 95 % GC (Fluka), 2-*trans*-heptenal 96 % GC (Fluka), 2-*trans*-nonenal 97 % (Aldrich), dekan 98 % GC (Fluka), dodekan 98 % GC (Fluka). Roztwory substancji wzorcowych przygotowywano w heksanie (Merck) poprzez dodanie do rozpuszczalnika poszczególnych wzorców w celu uzyskania stężenia końcowego każdego z nich na poziomie 100 mg/kg. Tak przygotowane wzorce dodawano do próbek oleju bezpośrednio przed przystąpieniem do etapu ekstrakcji.

Przygotowanie próbek do analiz

Dobór optymalnych parametrów ekstrakcji i analizy prowadzono stosując roztwory wzorcowe, które przygotowywano poprzez dodatek do oleju odpowiedniej ilości mieszaniny wzorców w heksanie, tak aby uzyskać końcowe stężenie każdej z wzorcowych substancji na poziomie 100 mg/kg. Następnie fiołki z próbką szczelnie zamykano silikonowo-teflonową membraną i plastikową nakrętką. Tak przygotowane próbki poddawano termostatawaniu, a następnie ekstrakcji w temp. 40 °C przez okres odpowiednio 15 i 30 min. W trakcie termostatawania i ekstrakcji próbki mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego. Następnie włókno z zaadsorbowanymi analitami umieszczano w dozowniku chromatografu (250 °C) i desorbowano przez 4 min.

Warunki naświetlania promieniowaniem UV

W celu przyspieszenia procesu utleniania próbki oleju naświetlano promieniowaniem ultrafioletowym, stosując dwie lampy rtęciowe niskociśnieniowe o mocy 2 x 6 W i maksimum emisji przy 254 nm (Cobrabid, Warszawa). Próbkę zawierającą 10 ml oleju umieszczano w kuwecie kwarcowej pod lampą i poddawano naświetlaniu przez określony czas (0-72 h).

Warunki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej HS-SPME

W badaniach ekstrakcji lotnych produktów reakcji utleniania zastosowano włókno pokryte mieszaną fazą diwinylobenzen/carboksen/polidymetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS długość 2 cm, grubość fazy stacjonarnej 50/30 µm, Supelco, Belle-

fonte, PA, USA). Następnie wykorzystując mieszaninę substancji wzorcowych w heksanie dobierano optymalne warunki procesu ekstrakcji. Zbadano wpływ objętości próbki, temperatury termostatowania, czasu termostatowania i ekstrakcji, a także czasu i temperatury desorpcji zaadsorbowanych analitów z włókna do kolumny w dozowniku chromatografu.

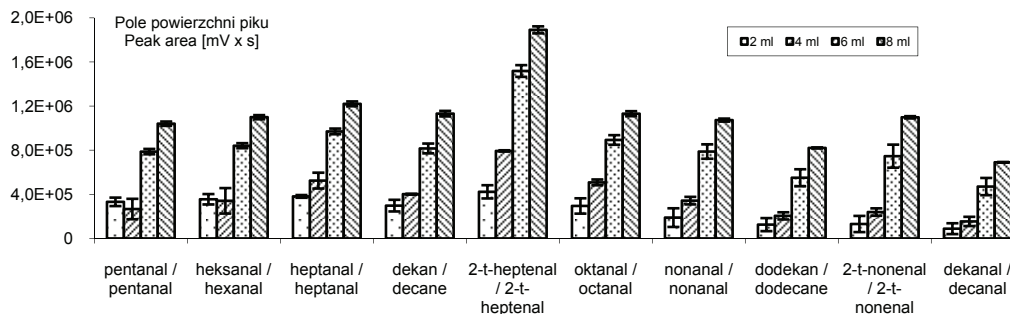
Analiza chromatograficzna

Analizy prowadzono z zastosowaniem chromatografu gazowego AutoSystem XL (Perkin Elmer) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Gazem nośnym był hel o natężeniu przepływu 1 ml/min, temp. dozownika i detektora wynosiły odpowiednio 250 i 230 °C. Separację analitów prowadzono stosując kolumnę SPB-20 z fazą stacjonarną 20 % difenylo/80 % dimetylosiloksan (30 m × 0,25 mm × 1 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Analizę wykonywano 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

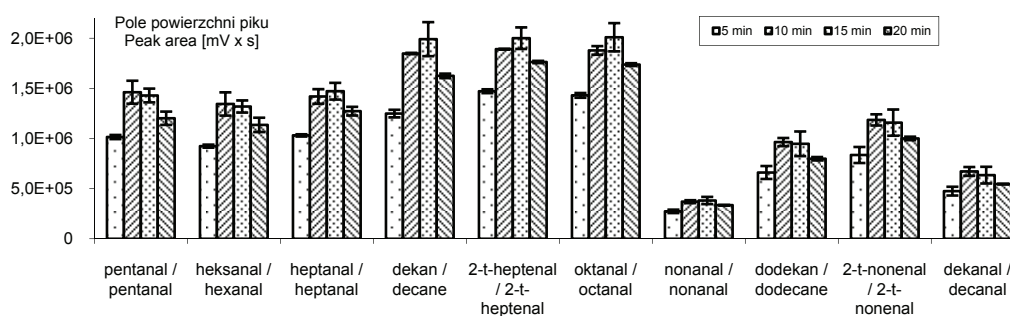
Pierwszym etapem badań było dobranie optymalnych warunków analizy chromatograficznej (ustalenie programu temperaturowego) i procesu mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej. Na podstawie studium literaturowego [2, 5, 8, 9, 12, 25] spośród szerokiej gamy faz stacjonarnych dostępnych na rynku wybrano włókno krzemionkowe pokryte fazą mieszaną diwinylobenzen/carboksen/polidymetylosiloksan. Umożliwia ono ekstrakcję analitów w szerokim zakresie stężeń, wykazuje najwyższą wydajność w stosunku do średnio lotnych substancji, jakimi w większości są produkty reakcji utleniania tłuszczów roślinnych [20].

Następnie dobrano objętość próbki w fiołce. Olej w ilościach 2, 4, 6 i 8 ml umieszczano w 15 ml fiołce szklanej, dodając mieszaniny wzorców, a następnie szczelnie zamykając silikonowo-teflonową membraną i plastikową nakrętką. Jak wynika z rys. 1. wzrost objętości próbki w fiołce powodował wzrost wydajności ekstrakcji analitów, jednak znaczący wzrost zaobserwowano dopiero przy 8 ml oleju i tę objętość próbki uznano za optymalną i stosowano w dalszych etapach badań. W przypadku technik analizy fazy nadpowierzchniowej najlepsze rezultaty ekstrakcji lotnych składników próbki osiąga się gdy faza gazowa stanowi 40 - 60 % objętości próbki, co potwierdziły przeprowadzone badania [20, 23].



Rys. 1. Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji analitów (15 min termostatowania, 20 min ekstrakcji w temp. 30 °C, 4 min desorpcji w temp. 250 °C).

Fig. 1. Impact of the sample volume on the extraction efficiency of analytes (15 min of equilibrium, 20 min of extraction at 30 °C, 4 min of desorption at 250 °C).



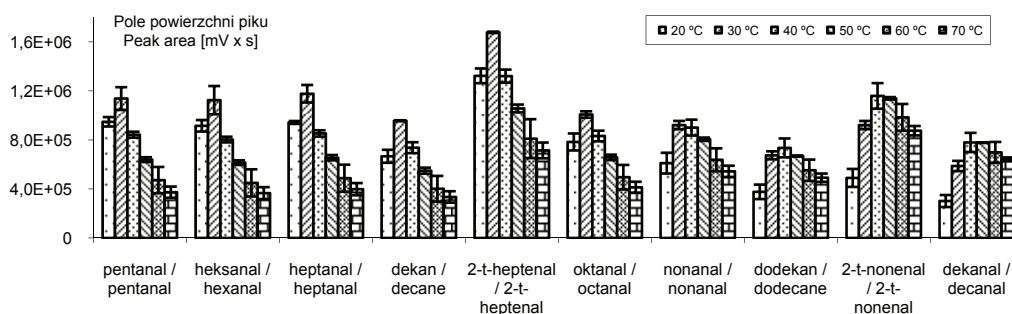
Rys. 2. Wpływ czasu termostatowania na wydajność ekstrakcji analitów (objętość próbki 8 ml, 20 min ekstrakcji w temp. 30 °C, 4 min desorpcji w temp. 250 °C).

Fig. 2. Impact of the equilibrium time on the extraction efficiency of analytes (sample volume: 8 ml, 20 min of extraction at 30 °C, 4 min of desorption at 250 °C).

Na wydajność procesu ekstrakcji znaczący wpływ ma czas termostatowania próbki przed ekstrakcją. W tym okresie dochodzi do ustalenia stanu równowagi pomiędzy lotnymi analitami rozpuszczonymi w ciekłej próbce a związkami znajdującymi się w fazie gazowej nad powierzchnią próbki. Analizując różny czas termostatowania w przedziale 5 – 20 min (rys. 2) stwierdzono, że zadowalająca równowaga pomiędzy analitami w fazie lotnej i gazowej następuje już po 10 min.

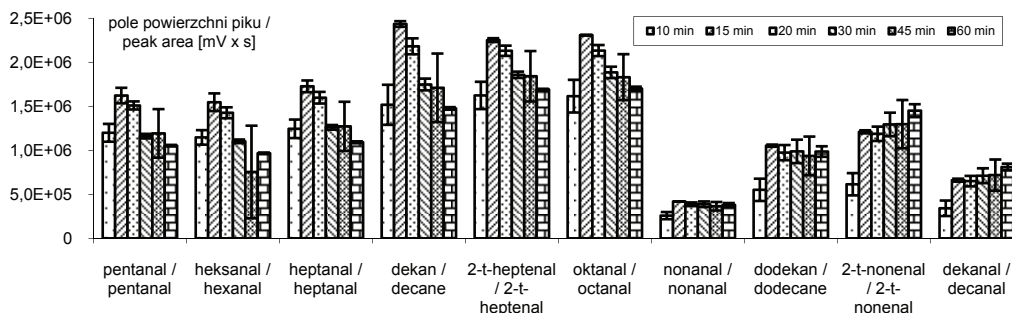
Istotny udział w procesie osiągnięcia równowagi między obiema fazami ma również temperatura. Wraz z jej wzrostem wzrasta wydajność ekstrakcji (więcej związków łatwiej przechodzi do fazy nadpowierzchniowej). Jednak olej jest substancją wrażliwą na działanie podwyższonej temperatury, która jest czynnikiem przyspieszającym proces utleniania lipidów [24]. Ważną kwestią jest więc dobranie optymalnej temperatury termostatowania, w której następnie prowadzi się również etap ekstrakcji analitów

z fazy nadpowierzchniowej do fazy stacjonarnej włókna. Wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji zbadano w szerokim przedziale temperatur od 20 do 70 °C (rys. 3). Przeprowadzone badania wykazały, że zadowalające wyniki ekstrakcji techniką SPME można osiągnąć już w temp. 30 °C, co zapobiega generacji dodatkowych substancji w podwyższonej temperaturze, mogących fałszować wynik oceny stabilności oksydacyjnej i jakości badanego oleju.



Rys. 3. Wpływ temperatury ekstrakcji na wydajność ekstrakcji analitów (objętość próbki 8 ml, 15 min termostatowania, 20 min ekstrakcji w temp. 30 °C, 4 min desorpcji w temp. 250 °C).

Fig. 3. Impact of the extraction temperature on the extraction efficiency of analytes (sample volume: 8 ml, 15 min of equilibrium, 20 min of extraction at 30 °C, 4 min of desorption at 250 °C).



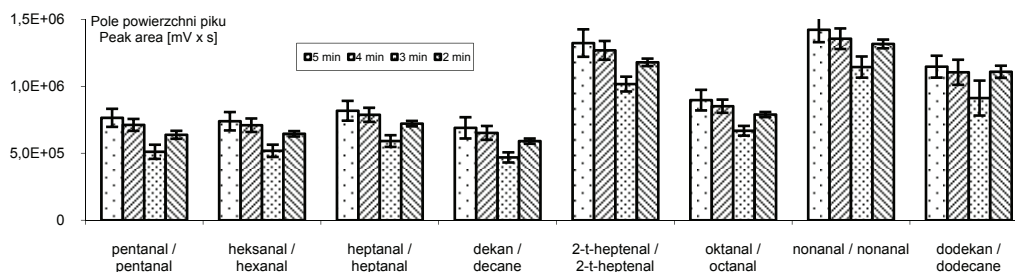
Rys. 4. Wpływ czasu ekstrakcji w 30 °C na wydajność ekstrakcji analitów (objętość próbki 8 ml, 15 min termostatowania w 30 °C, 4 min desorpcji w 250 °C)

Fig. 4. Impact of the extraction time at 30 °C on the extraction efficiency of analytes (sample volume: 8 ml, 15 min of equilibrium at 30 °C, 4 min of desorption at 250 °C).

Należało również dobrać optymalny czas prowadzenia procesu ekstrakcji. W tym celu próbki oleju zawierające mieszaninę substancji wzorcowych poddawano ekstrakcji w ciągu od 10 do 60 min. Pomimo, że technika SPME osiąga maksymalną czułość w stanie równowagi fazowej, jej osiągnięcie nie jest konieczne, ponieważ w warunkach nierównowagowych zachodzi liniowa zależność pomiędzy analitami zaadsorbo-

wanymi na włóknie i ich początkowym stężeniem w matrycy próbki [11]. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że dobre wyniki ekstrakcji osiąga się już po 15 min trwania tego procesu. Skrócenie czasu ekstrakcji z pierwotnie założonych 30 do 15 min (rys. 4.) znacząco skraca cały proces mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej. Jest to szczególnie istotne z analitycznego punktu widzenia, gdyż krótszy czas analizy pojedynczej próbki to jednocześnie większa liczba zanalizowanych próbek w jednostce czasu, co w przypadku serii analiz wykonywanych w laboratoriach kontroli jakości ma istotne znaczenie.

Ostatnim etapem tej części badań było dobranie optymalnych warunków desorpcji analitów z włókna do kolumny w dozowniku chromatografu. Na podstawie danych literaturowych [8, 11], zaleceń producenta włókna i własnych badań [7] jako temperaturę desorpcji przyjęto 250 °C. Czas desorpcji, podobnie jak w przypadku ekstrakcji, również pełni ważną rolę, ponieważ istotne jest, aby anality zaadsorbowane na włóknie zostały ilościowo wprowadzone do kolumny. Im grubsza jest warstwa sorbentu, tym bardziej efektywna jest ekstrakcja, szczególnie w przypadku mniej lotnych składników matrycy próbki, ale tym dłuższy czas desorpcji jest potrzebny do całkowitego przeniesienia analitów do kolumny chromatograficznej. Czas desorpcji badano w przedziale 5 - 2 min (rys. 5). Z przeprowadzonych badań wynika, że zmniejszanie czasu desorpcji powoduje niecałkowite uwolnienie analitów z włókna (obniżenie wydajności ekstrakcji), a tym samym przenoszenie ich do następnych analiz. Do dalszych analiz wybrano 4-minutowy okres desorpcji.



Rys. 5. Wpływ czasu desorpcji w temp. 250 °C na wydajność ekstrakcji analitów (objętość próbki 8 ml, 15 min termostatowania, 20 min ekstrakcji w temp. 30 °C).

Fig. 5. Impact of the desorption time at 250 °C on the extraction efficiency of analytes (sample volume: 8 ml, 15 min of equilibrium, 20 min of extraction at 30 °C).

Ostatecznie ustalone parametry procesu mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej do stacjonarnej włókna (HS-SPME) związków lotnych w olejach roślinnych zestawiono w tab. 1. Podobne parametry procesu ekstrakcji uzyskał Cavalli i współpracownicy, analizując lotne składniki francuskiej i hiszpańskiej oliwy [2].

Tabela 1

Optymalne warunki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (HS-SPME) związków lotnych z olejów roślinnych.

Optimal conditions of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) of volatile compounds from edible oils.

Parametr ekstrakcji / Extraction parameter	Wartość optymalna / Optimal value
Faza stacjonarna włókna / Stationary phase of the fibre	DVB/CAR/PDMS,50/30 μ m, 2 cm
Objętość próbki / Sample volume	8 ml w 15 ml fiolce / 8 ml in a 15 ml vial
Czas termostatowania / Equilibrium time	10 min
Temperatura ekstrakcji / Extraction temperature	30 °C
Czas ekstrakcji / Extraction time	15 min
Temperatura desorpcji / Desorption temperature	250 °C
Czas desorpcji / Desorption time	4 min
Mieszanie próbki / Sample agitation	tak / yes

Kolejnym etapem badań była ocena możliwości detekcyjnych opracowywanej metody. W celu wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności oraz powtarzalności metody (LOD, LOQ, CV) przeprowadzono analizy próbek oleju zawierających mieszaninę substancji wzorcowych. Ekstrakcję prowadzono w zoptymalizowanych warunkach. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 2. Precyzję metody wyrażono w formie współczynnika zmienności i określono na podstawie kolejnych 10 powtórzeń oznaczeń analitów o stężeniu na poziomie 450 μ g/kg, natomiast LOD i LOQ wyznaczono na podstawie krzywych wzorcowych wyznaczonych dla poszczególnych analitów [14, 15].

Powtarzalność lub inaczej precyzję charakteryzuje rozrzut uzyskanych wyników wokół wartości średniej. Jej miarą jest odchylenie standardowe rozumiane jako współczynnik zmienności $CV = RSD \cdot 100 \% = (SD/\text{średnia}) \cdot 100 \%$ [15].

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 [14].

Granice wykrywalności wszystkich analizowanych związków obliczono na podstawie odchylenia standardowego zbioru wyników i kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej. Przy wyznaczaniu granicy wykrywalności posłużono się następującą zależnością:

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

gdzie: b – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej,
 s – odchylenie standardowe obliczone z równania:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n-2}}$$

gdzie: y_i – wartości sygnałów danych zawartości analitu, na podstawie których wyznaczono krzywą kalibracyjną,
 Y_i – wartości sygnałów danych zawartości analitu 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: $LOQ = 3 \cdot LOD$

Tabela 2

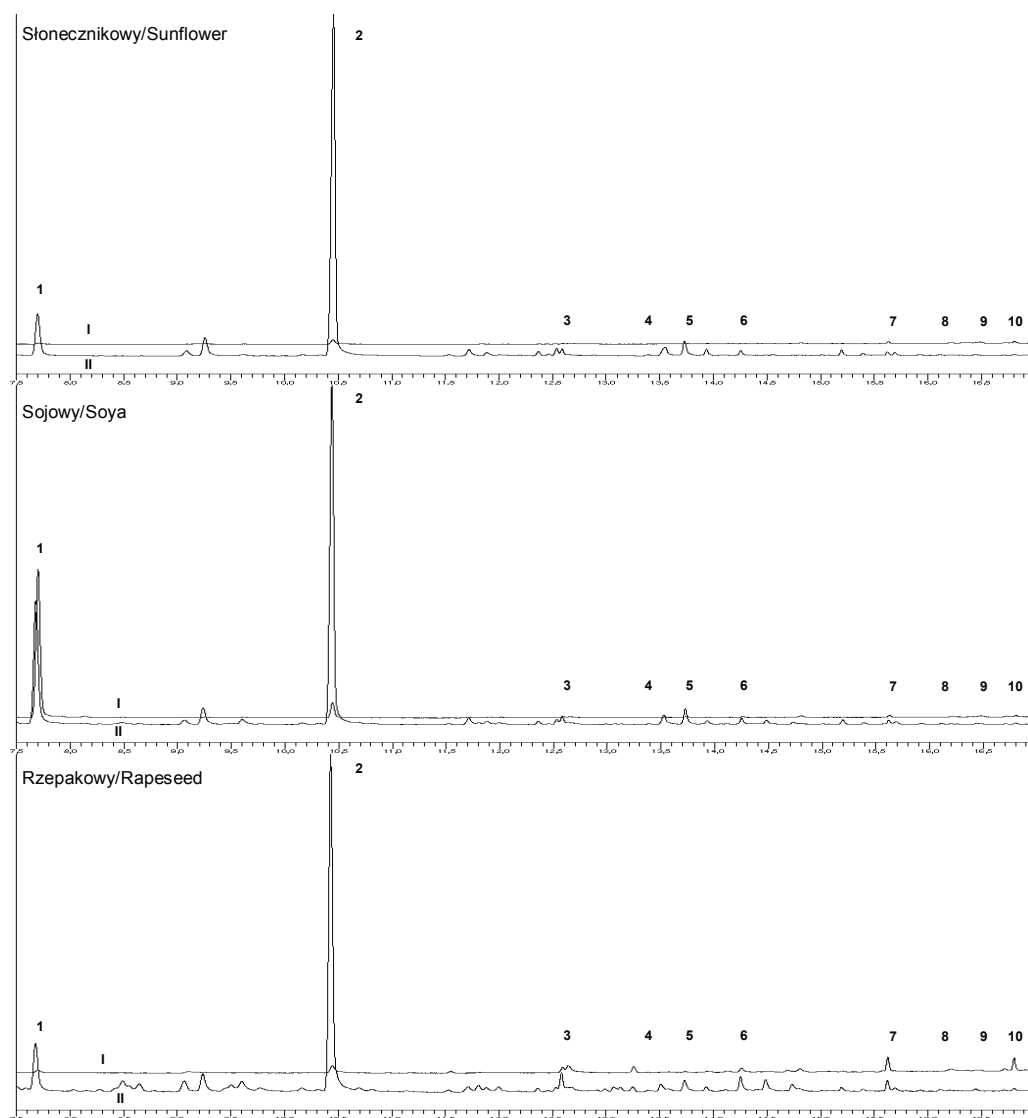
Granica oznaczalności (LOD), wykrywalności (LOQ) oraz powtarzalność (CV) w odniesieniu do wybranych substancji wzorcowych w oleju roślinnym wyekstrahowanych techniką HS-SPME/GC/FID*.

Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and of repeatability (CV) with regard to some selected standards in edible oils obtained using a HS-SPME/GC/FID technique.

Związek / Compound	LOD [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	LOQ [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	CV [%]
Pentanal / Pentanal	216	648	3,87
Heksanal / Hexanal	222	666	4,63
Heptanal / Heptanal	250	750	5,82
Dekanal / Decane	215	645	5,64
2-trans-heptenal / 2-trans-heptenal	208	624	5,53
Oktanal / Octanal	219	657	7,21
Nonanal / Nonanal	238	714	7,90
Dodekan / Dodecane	346	1038	7,92
2-trans-nonenal / 2-trans-nonenal	162	486	8,98
Dekanal / Decanal	293	879	9,29

Objaśnienia: Explanatory notes:

* - włókno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , 2 cm; kolumna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , Supelco, Bellefonte, PA, USA / fibre: DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , 2 cm; column: SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , Supelco.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

1 – pentanal / pentanal, 2 – heksanal / hexanal, 3 – heptanal / heptanal, 4 – dekan / decane, 5 – 2-trans-heptenal / 2-trans-heptenal, 6 – oktanal / octanal, 7 – nonanal / nonanal, 8 – dodekan / dodecane, 9 – 2-trans-nonenal / 2-trans-nonenal, 10 – dekanat / decanal.

Rys. 6. Chromatogramy olejów: słonecznikowego, sojowego oraz rzepakowego, świeżych rafinowanych (I) i naświetlanych promieniowaniem UV (II) przez 72 h (12 W, 254 nm), uzyskane w wyniku mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (włókno DVB/CAR/PDMS, 2 cm, 50/30 μm ; objętość próbki 8 ml, czas i temperatura ekstrakcji odpowiednio 15 min i 30 $^{\circ}\text{C}$) i analizy chromatograficznej z detektorem FID, kolumna SPB-20 (Supelco, 30 m x 0,25 mm x 1 μm), program temp.: 50 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 100 $^{\circ}\text{C}$, 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 250 $^{\circ}\text{C}$ (2 min).

Fig. 6. Chromatograms of fresh refined (I) and irradiated (II) (72h, UV 12 W, 254 nm) sunflower, soya and rapeseed oils obtained after the solid-phase micro-extraction (fibre DVB/CAR/PDMS, 2 cm, 50/30 μm ; sample volume: 8 ml, time and temperature of extraction: 15 min / 30 $^{\circ}\text{C}$) and after the gas chromatography analysis with FID detector, column SPB-20 (Supelco, 30 m x 0,25 mm x 1 μm), temperature program: 50 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 100 $^{\circ}\text{C}$, 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$ (2 min).

Zarówno powtarzalność, jak i LOD opracowanej metody są na zadowalającym poziomie, gdyż przeciętny błąd popełniany podczas analizy fazy nadpowierzchniowej opisany poprzez współczynnik zmienności mieści się w przedziale 2,5 – 37,0 % [12], a granice wykrywalności w przypadku metod wykorzystujących tę technikę przygotowania próbki mieszczą się w zakresie 18 – 173 mg/kg [12]. W przypadku analizowanych związków ich granice wykrywalności są w większości o 3 rzędy niższe niż przeciętnie, a powtarzalność metody mieści się w zakresie 3,87 – 9,29 %, a więc w dolnej średniej granicy.

Ostatnim etapem prezentowanych badań była analiza próbek rzeczywistych, które wcześniej zostały poddane procesowi przyspieszonego utleniania poprzez naświetlenie promieniowaniem ultrafioletowym. W tym celu 10 ml próbkę oleju umieszczano w kuwecie kwarcowej, a następnie kuwety umieszczano w fotoreaktorze i poddawano naświetlaniu promieniami UV przez określony czas (12 – 72 h). Po procesie fotodegradacji z próbki pobierano 8 ml oleju i umieszczano w 15 ml fiolce. Szczelnie zamkniętą zawartość fiolki mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i podawano procesowi mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej, zgodnie z opisaną powyżej procedurą, a następnie analizie chromatograficznej z zastosowaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego. Analizowane związki zidentyfikowano na podstawie czasu retencji, porównując je z czasem retencji związków w mieszaninie wzorcowej. Na rys 6. przedstawiono przykładowe chromatogramy analizowanych olejów roślinnych poddanych naświetlaniu promieniami UV przez 72 h oraz świeżych olejów rafinowanych nienaświetlanych. We wszystkich naświetlanych olejach obserwowano wyraźny wzrost zawartości heksanalu, co potwierdza tezę, że związek ten jest dobrym wskaźnikiem jakości olejów roślinnych.

Wnioski

1. Opracowana szybka metoda pozwala określić stan analizowanych próbek zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym.
2. Dzięki dużej czułości i dokładności procedury możliwe jest obserwowanie procesu utlenienia nawet w jego początkowym stadium. Możliwa zatem staje się szybka ocena stabilności oksydacyjnej badanych próbek oleju.
3. Uzyskano dobre wydajności ekstrakcji próbek rzeczywistych, które w celu przyspieszenia utleniania naświetlano promieniowaniem UV. Powyższa metoda może

być więc stosowana do klasyfikacji i oceny jakości różnych gatunków olejów roślinnych.

Praca wykonana w ramach grantu 312 056 31 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Budżetu Państwa i Budżetu Województwa Pomorskiego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki Priorytetu VIII, działanie 8.2, poddziałanie 8.2.2 "Regionalne Strategie Innowacyjności", projektu systemowego Województwa Pomorskiego "InnoDoktorant" - stypendia dla doktorantów, I edycja. Była ona prezentowana podczas XIII Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Łódź, 28 - 29 maja 2008 r.

Literatura

- [1] Arthur C., Pawliszyn J.: Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 1990, **62**, 2145 - 2148.
- [2] Cavalli J-F., Fernandez X., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau A-M.: Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. *Food Chem.*, 2004, **88**, 151 - 157.
- [3] Choe E., Min D.B.: Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety.*, 2006, **5**, 169 - 186.
- [4] Doleschall F., Kemeny Z., Recseg K., Kovari K.: Monitoring of lipid degradation products by solid-phase microextraction. *J. Microcolumn Separations*, 2001, **13** (6), 215 - 220.
- [5] Doleschall F., Recseg K., Kemeny Z., Kovari K.: Comparison of differently coated SPME fibres applied for monitoring volatile substances in vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2003, **105**, 333 - 338.
- [6] Drozdowski B.: *Lipidy*. W: *Chemia żywności* – pod red. Z.E. Sikorskiego. WNT, Warszawa 2002.
- [7] Gromadzka J., Wardencki W., Lores M., LLompart M., Fernandez-Alvarez M., Lipińska K.: Investigation of edible oils oxidation stability using photooxidation and SPME/GC method for determination of volatile compounds – preliminary investigation. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2008, **58** (3), 321 - 324.
- [8] Jeleń H.H., Obuchowska M., Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E.: Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 2360 - 2367.
- [9] Jimenez A., Beltran G., Aguilera M.P.: Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils. *J. Chromat. A*, 2004, **1028**, 321 - 324.
- [10] Kalua C.M., Bedgood D.R. Jr., Prenzler P.D.: Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil. *Anal. Chim. Acta.*, 2006, **556**, 407 - 414.
- [11] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J.: Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromat. A*, 2000, **880**, 35 - 62.
- [12] Keszler A., Heberger K., Gude M.: Quantitative analysis of aliphatic aldehydes by headspace SPME sampling and ion-trap GC MS. *Chromatographia* 1998, **48** (1/2), 127 - 132.
- [13] Kołodziejczyk A.: *Naturalne związki organiczne*. *Lipidy*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2003 s. 311 - 314.

- [14] Konieczka P.: Sposoby wyznaczania granicy wykrywalności i oznaczalności. *Chem. Inż. Ekol.* 2003, **10** (7), 1071 - 1099.
- [15] Konieczka P.: Walidacja metodyk analitycznych. *Chem. Inż. Ekol.* 2003, **10** (10), 1071 - 1099.
- [16] Michulec M., Wardencki W.: Determination of solvents residues in vegetable oils and pharmaceuticals by headspace analysis and capillary gas chromatography. *Chromatographia*, 2004, **60**, 273 - 277.
- [17] Mildner-Szkudlarz S., Jeleń H.H., Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E.: Application of headspace - solid phase microextraction and multivariate analysis for plant oils differentiation. *Food Chem.*, 2003, **83**, 515 - 522.
- [18] Niewiadomski H.: *Technologia tłuszczów jadalnych*. WNT, Warszawa 1993.
- [19] Pawliszyn J.: *Solid phase microextraction: theory and practice*. Ed. Wiley-VCH, New York 1997.
- [20] Pawliszyn J.: Sample preparation: Quo vadis? *Anal. Chem.* 2003, **75**, 2543 - 2558.
- [21] Povoło M, Contarini G.: Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis of the volatile fraction of butter. *J. Chromat. A*, 2003, **985**, 117 - 125.
- [22] Rudzińska M., Muśnicki Cz., Wąsowicz E.: Fitosterole i ich pochodne utlenione w nasionach rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste*, 2003, **24**, 51 - 66.
- [23] Snow N.H., Snack G.C.: Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* 2002, **21** (9+10), 608 - 617.
- [24] Szukalska E.: Wybrane zagadnienia utleniania tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, 2003, **38**, 42 - 58.
- [25] Vichi S., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S., Pez-Tamames E.L.: 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.*, 2003, **51**, 6572 - 6577.
- [26] Wardencki W., Michulec M., Curyło J.: A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2004, **39**, 703 - 717.

SELECTING OPTIMAL PARAMETERS FOR THE UV-HS-SPME/GC/FID METHOD FOR ASSESSING OXIDATIVE STABILITY OF EDIBLE OILS

S u m m a r y

The objective of the research conducted was to select optimal parameters for a new method used to assess the quality of oils based on the determination of volatile compounds - oxidation products of those oils. Prior to the analysis, the samples of refined edible oils were oxidized during an accelerated oxidation process using UV irradiation (12 W, 254 nm). A technique used to prepare samples for analysis was the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Optimal parameters of this technique were selected (DVB/CAR/PDMS fibre of 2 cm and of 50/30 μm ; 8 ml volume of the sample; time and temperature of extraction: 15 min/30 $^{\circ}\text{C}$, respectively). Additionally, some validation parameters were determined. The precision and sensitivity of this method, expressed as CV variation coefficient ($< 10\%$) and as LOD limit of detection (within the range from 162 to 346 $\mu\text{g}/\text{kg}$) appeared to be satisfactory for the determinations of this type. The composition of the samples analyzed was determined on the basis of standard compounds retention times using capillary gas chromatography with flame-ionization detector (column: SPB-20, Supelco, 30 m x 0,25 mm x 1 μm).

Key words: edible oils, UV irradiation, volatile compounds, oxidation products, headspace analysis, solid-phase microextraction (SPME) 