



Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej



Rozprawa doktorska

**OPRACOWANIE INSTRUMENTALNYCH METOD
OCENY JAKOŚCI I STABILNOŚCI OKSYDATYWNEJ
WYBRANYCH TŁUSZCZÓW ROŚLINNYCH**

mgr inż. Justyna Gromadzka

Promotor: prof.dr hab.inż. Waldemar Wardencki

Gdańsk 2010

Składam serdeczne podziękowania

Panu prof. dr hab. inż. WALDEMAROWI WARDENCKIEMU

za dopingowanie do samodzielnej pracy oraz cenne uwagi w trakcie realizacji niniejszej pracy

Panu prof. dr hab. inż. JACKOWI NAMIEŚNIKOWI

za stworzenie mobilizujących warunków pracy oraz życzliwość, zaufanie i wiarę w moje możliwości

Pragnę podziękować

Panu prof. dr hab. inż. ERWINOWI WĄSOWICZOWI

z Zakładu Koncentratów Spożywczych Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

za nieocenioną pomoc i wsparcie naukowe

Pani dr inż. MARII TYNEK oraz Panu dr inż. ROMANOWI PAWŁOWICZOWI

z Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej

za owocną współpracę, wskazówki i inspiracje w prowadzonych badaniach

Dziękuję także

PRACOWNIKOM I DOKTORANTOM

Katedry Chemii Analitycznej za stworzenie przyjaznej i niezapomnianej atmosfery pracy

Podziękowania składam pracownikom

*firmy **ELSTAR OILS S.A.***

*oraz **ZAKŁADÓW TŁUSZCZOWYCH w KRUSZWICY A BUNGE COMPANY S.A.***

za pomoc w prowadzonych badaniach, cenne uwagi i wskazówki oraz dostarczenie próbek do badań

Podziękowania kieruje także do

MINISTERSTWA NAUKI i SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

oraz FUNDACJI na rzecz NAUKI POLSKIEJ

za przyznanie środków finansowych na wykonanie badań

Szczególnie dziękuję moim Najbliższym

RODZICOM, BABCI, TEŚCIOM oraz MĘŻOWI

za pomoc, cierpliwość, wsparcie duchowe i wiarę we mnie

Justyna Gromadzka

Praca zrealizowana w ramach projektu

**Ocena stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych z
zastosowaniem promieniowania UV i techniki
SPME/GC**

współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej PO IG
oraz Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach
programu Ventures 2009-3/3

Fundusze europejskie - dla rozwoju innowacyjnej
gospodarki

Inwestujemy w Waszą przyszłość



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW.....	4
WSTĘP	5
I CZĘŚĆ TEORETYCZNA	7
1 CHARAKTERYSTYKA OLEJÓW ROŚLINNYCH I ICH PRZEMIAN.....	7
1.1 <i>Procesy utleniania i autooksydacji jako przyczyny jęłczenia olejów</i>	7
1.2 <i>Substancje nietłotne wpływające na właściwości sensoryczne olejów</i>	8
1.3 <i>Zawartość kwasów tłuszczowych</i>	10
2 STANDARDOWE METODY OCENY STABILNOŚCI OKSYDATYWNEJ TŁUSZCZÓW ROŚLINNYCH	15
2.1 <i>Klasyczne metody oznaczania stabilności oksydacyjnej</i>	16
2.2 <i>Wykorzystanie instrumentalnych metod oznaczania stabilności oksydacyjnej po etapie przyspieszonego utleniania olejów</i>	17
2.3 <i>Techniki kalorymetryczne (DSC)</i>	20
3 PROMIENIOWANIE UV JAKO CZYNNIK PRZYSPIESZAJĄCY UTLENIANIE.....	22
3.1 <i>Przyspieszanie procesu utleniania</i>	22
3.2 <i>Autoutlenianie</i>	24
3.3 <i>Utlenianie fotosensybilizowane</i>	27
4 ZWIĄZKI LOTNE JAKO MARKERY PROCESU UTLENIANIA	29
4.1 <i>Markery procesu utleniania olejów roślinnych</i>	30
4.2 <i>Wybrane metody izolacji, oznaczania i identyfikacji związków lotnych</i>	32
4.2.1 <i>Analiza fazy nadpowierzchniowej (HSA)</i>	32
4.2.2 <i>Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)</i>	34
4.2.3 <i>Techniki analityczne stosowane w analizie olejów - chromatografia gazowa i cieczowa</i>	38
II CEL PRACY	42
III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	44
1 MATERIAŁY DO BADAŃ	44
2 ODCZYNNIKI CHEMICZNE	46
3 APARATURA	47
3.1 <i>Szkoło laboratoryjne i akcesoria</i>	48
4 METODYKA BADAŃ	49
4.1 <i>Warunki naświetlania promieniowaniem UV</i>	49
4.2 <i>Warunki działania podwyższoną temperaturą – zmodyfikowany test Schaala</i>	49
4.3 <i>Warunki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME)</i>	50
4.4 <i>Analiza chromatograficzna (GC/FID)</i>	50
4.5 <i>Analiza chromatograficzna (GC/MS)</i>	50
4.6 <i>Warunki statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej (HSA)</i>	51
4.7 <i>Przygotowanie roztworów wzorcowych</i>	51
4.8 <i>Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych</i>	52
4.9 <i>Oznaczenie liczby nadtlenkowej (PV)</i>	52
4.10 <i>Oznaczenie stabilności oksydacyjnej metodą Rancimat</i>	52
4.11 <i>Oznaczenie liczby anizydynowej (A_nV)</i>	53
4.12 <i>Oznaczanie stabilności oksydacyjnej metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC)</i>	53
4.13 <i>Oznaczanie stabilności oksydacyjnej metodą manostatyczną</i>	53
4.14 <i>Test przechowalniczy</i>	53
4.15 <i>Obliczenia statystyczne</i>	53
5 SCHEMAT PRZEPROWADZONYCH BADAŃ	54
6 WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA	55

6.1	<i>Opracowanie procedury oznaczania związków lotnych techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej (HSA)</i>	55
6.1.1	Identyfikacja indywidualnych związków wzorcowych	55
6.1.2	Dobór warunków ekstrakcji	56
6.1.3	Wyznaczenie wybranych parametrów walidacyjnych	62
6.2	<i>Opracowanie procedury oznaczania związków lotnych techniką mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME)</i>	65
6.2.1	Dobór warunków ekstrakcji	66
6.2.2	Wyznaczenie wybranych parametrów walidacyjnych	71
6.2.3	Analiza próbek rzeczywistych	72
6.3	<i>Zestawienie porównawcze metody HSA i SPME</i>	75
6.4	<i>Porównanie opracowanych metod z metodami stosowanymi w analizie stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych</i>	79
6.4.1	Oznaczenie zmian liczby nadtlenkowej w czasie utleniania	79
6.4.2	Oznaczenie stabilności oksydacyjnej przy pomocy metody UV-HS-SPME/GC/FID	83
6.4.3	Oznaczenie stabilności oksydacyjnej przy pomocy metody termicznej -HS-SPME/GC/FID	85
6.4.4	Oznaczenie stabilności oksydacyjnej przy pomocy metody UV-HSA/GC/FID	87
6.4.5	Oznaczenie stabilności oksydacyjnej przy pomocy metody termicznej-HSA/GC/FID	88
6.4.6	Porównanie metody UV-HS-SPME/GC/FID i testu Rancimat	89
6.4.7	Oznaczenie stabilności oksydacyjnej metodą Rancimat	91
6.4.8	Oznaczenie zmian liczby anizydynowej w czasie utleniania	93
6.4.9	Zależność wskaźnika Totox od czasu utleniania	95
6.4.10	Oznaczenie stabilności oksydacyjnej przy pomocy metody manostatycznej oraz testu z wykorzystaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC)	97
6.5	<i>Dobór optymalnych warunków procesu przyspieszonego utleniania oleju – naświetlania promieniowaniem UV</i>	100
6.5.1	Powierzchnia naświetlanego oleju	101
6.5.2	Przebieg procesu fotoutleniania	102
6.5.3	Odległość powierzchni oleju od źródła światła	104
6.5.4	Wpływ mocy świetlówek na przebieg procesu utleniania olejów roślinnych	105
6.5.5	Analiza próbek rzeczywistych	106
6.5.6	Powtarzalność metodyki UV-HS-SPME/GC-FID	108
6.6	<i>Związki lotne zidentyfikowane w oleju słonecznikowym i rzepakowym</i>	109
6.7	<i>Stabilność oksydacyjna olejów rzepakowych i słonecznikowych wyznaczona na podstawie opracowanej procedury analitycznej (UV/HS-SPME/GC/FID)</i>	111
6.8	<i>Korelacja metodyki UV-HS-SPME/GC-FID z testem przechowalniczym</i>	116
6.9	<i>Zastosowanie opracowanej metodyki w analizie próbek olejów roślinnych</i>	120
6.9.1	Rewersja zapachu w oleju palmowym	120
6.9.2	Identyfikacja odmian gatunkowych nasion rzepaku	122
7	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	133
	STRESZCZENIE	136
	ABSTRACT	137
	DOROBEK NAUKOWY	138
	LITERATURA	145
	ZAŁĄCZNIK – PROJEKT NORMY	155

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

Akronimy	Nazwa angielska	Nazwa polska
AOCS	American Oil Chemists' Society	Amerykańskie Towarzystwo Chemików Przemysłu Tuszczowego
AOM	active oxygen method	metoda aktywnego tlenu
AV	acid value	liczba kwasowa
A _n V	anisidine value	liczba <i>p</i> -anizydynowa
CAR	carboxene	karboksen
CV	coefficient of variation	współczynnik zmienności
CLA	conjugated linoleic acids	kwasy tłuszczowe ze sprzężonym wiązaniem podwójnym
Cz. d. a.		czysty do analiz
DI-SPME	direct immersion SPME	mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej przez bezpośrednie zanurzenie włókna w próbce
DSC	differential scanning calorimetry	różnicowa kalorymetria skaningowa
DVB	divinylbenzene	diwinylobenzen
ESI	electron spray ionisation	jonizacja przez elektrorozpraszanie
FAME	fatty acids methyl ester	estry metylowe kwasów tłuszczowych
FI	flow injection	technika analizy wstrzykowo-przepływowej
FFA	free fatty acids	wolne kwasy tłuszczowe
FID	flame ionization detector	detektor płomieniowo-jonizujący
FPD	flame photometric detector	detektor płomieniowo-fotometryczny
GC	gas chromatography	chromatografia gazowa
GC-IT	gas chromatography – ion trap	chromatografia gazowa z pułapką jonową
GC-MS	gas chromatography - mass spectrometer	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
HS	headspace	faza nadpowierzchniowa
HSA	headspace analysis	analiza fazy nadpowierzchniowej
HS-SPME	headspace SPME	mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej
IP	induction period	okres indukcji
IT	induction time	czas indukcji
IV	iodine value	liczba jodowa
LOD	limit of detection	granica wykrywalności
LOQ	limit of quantification	granica oznaczalności
L _p		liczba porządkowa
MASC	modulated scanning calorimetry	modulowana kalorymetria skaningowa
MS	mass spectrometer	spektrometr mas
n.z.		nie zidentyfikowano
NNKT		niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe
OIT	oxidative induction time	czas indukcji oksydacji
OSI	oil stability index	indeks stabilności olejów
PCA	principal components analysis	analiza głównych składowych
PDMS	polydimethylsiloxane	polidimetylosiloksan
PDSC	pressure differential scanning calorimetr	ciśnieniowa różnicowa kalorymetria skaningowa
PLS	partial least squares	metoda częściowych najmniejszych kwadratów
ppm	part per milion	jednostka stężenia [mg kg ⁻¹]
PT	purge and trap	wymywanie z jednoczesnym wychwytywaniem
PV	peroxide value	liczba nadtlenkowa
R	regression	współczynnik regresji
RBF-ANN	radial basis function–artificial neural network	sztuczna sieć neuronowa typu radialnej funkcji bazowej
RSD	relative standard deviation	względne odchylenie standardowe
RT	retention time	czas retencji
SD	standard deviation	odchylenie standardowe
SPME	solid phase microextraction	mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
TAG	triacylglycerols	triacyloglicerole
TAM	high sensitivity isothermal calorimetry	wysokoczuła kalorymetria izotermalna
TOTOX	total oxidation	wskaźnik całkowitego utlenienia
UFA	unsaturated fatty acids	nienasycone kwasy tłuszczowe
UV	ultraviolet	promieniowanie ultrafioletowe

WSTĘP

Ludzie od zarania dziejów poszukiwali sposobów przywracania zdrowia i jego ochrony. W tym celu sięgali między innymi po rośliny i specyfiki z nich produkowane. W celach leczniczych często wykorzystywano olej wyciskany z nasion roślin czy tłuszcze zwierzęce. Olej w czasach starożytnych symbolizował płodność, czystość, dobrobyt, zdrowie, błogosławieństwo i pokój. Znajdował szereg zastosowań zarówno w życiu codziennym jak i sakralnym. Był stałym elementem przy składaniu ofiar i w obrzędach oczyszczania, używano go do poświęceń, namaszczeń, do nadawania godności, stosowano go jako środek leczniczy, higieniczny i jako źródło światła w lampach oliwnych, czy w postaci wrzątku, jako środek obronny przy oblężeniu twierdz.

Tłuszcze występują w wielu artykułach spożywczych, np. w mięsie i wędlinach czy nabiale, jako tzw. tłuszcz niewidoczny, ukryty lub też po wyizolowaniu stając się odrębnym produktem tłuszczowym stanowiącym jeden z głównych i podstawowych składników codziennej diety człowieka.

Tłuszcze dzieli się na stałe, gdy w temperaturze pokojowej produkt ma stałą konsystencję jak smalec, masło czy tłuszcz palmowy oraz na oleje, gdy produkt jest w stanie płynnym (większość olejów roślinnych).

Zarówno tłuszcze jak i oleje, określane często wspólną nazwą lipidów, stanowią złożoną mieszaninę różnych typów cząsteczek chemicznych. Podstawową grupą są trójglicerydy, inaczej triacyloglicerole, zwane też tłuszczem właściwym, będące estrami glicerolu i wyższych kwasów tłuszczowych. Zdecydowana większość (99 %) kwasów tłuszczowych występuje w tłuszczach w formie estrów. Wszystkie inne związki występujące w tłuszczach potocznie są nazywane substancjami towarzyszącymi.

Odpowiedni skład kwasów tłuszczowych w cząsteczce estru decyduje o temperaturze topnienia, czyli o konsystencji tłuszczu. Wysoka zawartość kwasów o wielu wiązaniach podwójnych (polienowych, wielonienasyconych) znacząco obniża temperaturę topnienia produktu sprawiając, że w temperaturze pokojowej występuje w fazie ciekłej – jak olej. Oleje to głównie tłuszcze roślinne. Oleje bogate w kwas oleinowy (C 18:1, jednonienasycony) to oliwa i olej rzepakowy, oleje bogate w kwas linolowy (C 18:2, dwa wiązania podwójne) to olej sojowy i kukurydziany, natomiast olejem bogatym w kwas linolenowy (C 18:3, trzy wiązania podwójne) jest olej lniany. Wyjątkiem wśród olejów roślinnych są olej palmowy i kokosowy, które zawierają w swym składzie duże ilości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych zawierających od 8 do 14 atomów węgla w cząsteczce i niewielkie ilości

kwasów nienasyconych, dlatego w temperaturze pokojowej mają stałą konsystencję. Oprócz wspomnianych wyjątków tłuszcze stałe to głównie tłuszcze pochodzenia zwierzęcego, jak masło (tłuszcz mleczny), smalec, łój czy słonina. Wyjątkiem wśród tłuszczów zwierzęcych są tłuszcze pozyskiwane z organizmów morskich, bogate w kwasy z grupy ω -3, głównie kwas eikozapentaenowy (EPA, C 20:5) i dokozaheksaenowy (DHA, C 22:6) z 5 i 6 wiązaniami podwójnymi, które to nadają wspomnianym tłuszczom konsystencję płynną.

Inną równie popularną klasyfikacją lipidów jest podział na tłuszcze proste (triacylloglicerole i woski), złożone (fosfolipidy, glikolipidy, sulfolipidy) oraz sterole (zoosterole, fitosterole, mykosterole), izoprenoidy (m. in. karoteny, skwalen) i tokoferole.

Z uwagi na swoją złożoną budowę lipidy spełniają w organizmie człowieka wiele różnorodnych funkcji:

- są skoncentrowanym źródłem energii
- umożliwiają gromadzenie energii, będąc główną formą jej zapasu
- ułatwiają odczuwanie smaku i przełykanie pokarmu
- hamują skurcze żołądka i wydzielanie kwaśnego soku żołądkowego
- stanowią budulec błon komórkowych i białej masy mózgu
- jako tłuszcz podskórny chronią przed nadmierną utratą ciepła
- jako tłuszcz okołonarządowy stabilizują narządy wewnętrzne, pełniąc równocześnie funkcje ochronne i amortyzujące
- dostarczają niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), z których powstają hormony tkankowe regulujące procesy komórkowe
- decydują o sprawności układu krążenia
- wpływają na stan skóry i włosów
- są źródłem witamin A, D i E, a także ułatwiają ich przyswajanie z innych produktów [Gawęcki i Czarnocińska 1997].

Z uwagi na powyższe funkcje bardzo istotne jest dostarczenie organizmowi codziennej porcji odpowiednio dobranych lipidów. Jednocześnie równie istotna jest jakość tych lipidów i ich świeżość. Oleje z uwagi na dużą zawartość kwasów nienasyconych są bardzo podatne na procesy utleniania, dlatego zachodzi konieczność kontrolowania i określania stabilności oksydacyjnej oraz terminu przydatności do spożycia produktów tłuszczowych dostępnych na rynku spożywczym. Pomimo iż istnieje wiele metod oceny stabilności oksydacyjnej tłuszczów, są to jednak metody niedoskonałe, często ściśle zależne od umiejętności, staranności i dokładności analityka. Dlatego zachodzi potrzeba opracowania nowych metod pozwalających lepiej ocenić odporność na utlenianie badanych produktów, uwzględniając warunki ich przechowywania w magazynach, sklepach, a później w gospodarstwach domowych.

I CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1 Charakterystyka olejów roślinnych i ich przemian

W ostatnich latach coraz więcej uwagi zwraca się na tłuszcze spożywane przez człowieka, które są, obok białek i węglowodanów, jednym z trzech podstawowych składników diety. Najbardziej popularne są oleje roślinne zawierające duże ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych, przede wszystkim tych niezbędnych dla organizmu człowieka (NNKT). W rejonie śródziemnomorskim największym zainteresowaniem cieszy się oliwa z oliwek i olej słonecznikowy, natomiast w chłodniejszych rejonach Europy popularny stał się olej rzepakowy i sojowy. Wśród głównych walorów zdrowotnych NNKT należy wymienić przeciwdziałanie chorobom serca i układu krążenia, utrzymywanie prawidłowego poziomu cholesterolu we krwi, działanie przeciwkrzepliwe, wpływ na cykl metaboliczny komórek oraz na prawidłowy rozwój mózgu i wzroku [Belitz i in. 2009].

1.1 Procesy utleniania i autooksydacji jako przyczyny jęłczenia olejów

Oleje roślinne zawierają wiele nienasyconych związków (nienasycone kwasy tłuszczowe, sterole, skwalen itd.), które ulegają utlenieniu pod wpływem różnych czynników, takich jak: podwyższona temperatura, zwiększona wilgotność, naświetlanie za pomocą promieniowania ultrafioletowego, aktywność mikroorganizmów, czy też naturalnych enzymów. Procesowi temu zapobiegają substancje naturalnie zawarte w tkankach roślin, czyli antyoksydanty (tokoferole, związki fenolowe, karotenoidy), jednak na etapie zbioru owoców i nasion, ich przechowywania, przetwarzania, a następnie przechowywania gotowego produktu (oleju) dochodzi do osłabienia działania naturalnych przeciwutleniaczy, czego efektem jest postępujące utlenienie składników tłuszczu [Akoh i Min 2008].

Z uwagi na wysoką zawartość kwasów nienasyconych oleje roślinne są narażone na przemiany lipidów związane z utlenieniem tlenem atmosferycznym. Szybkość reakcji utleniania rośnie wraz ze stopniem nienasycecia kwasów. Kwas linolowy utlenia się 10-40-krotnie szybciej niż oleinowy, natomiast linolenowy 2-4-krotnie szybciej niż linolowy (Tab. 1). Szybkość utleniania wzrasta także wraz z podwyższeniem temperatury, np. w procesach smaźalniczych.

Tab. 1. Względna szybkość reakcji utleniania kwasów tłuszczowych pod wpływem tlenu tripletowego i singletowego [Akoh i Min 2008]

	<i>Kwas oleinowy</i>	<i>Kwas linolowy</i>	<i>Kwas linolenowy</i>
tlen tripletowy	1	27	77
tlen singletowy	3×10^4	4×10^4	7×10^4

Głównym procesem zachodzącym podczas utleniania tłuszczów jest reakcja autooksydacji (samoutlenienia). Jest to łańcuchowa reakcja rodnikowa złożona z trzech etapów. Reakcja zapoczątkowywana jest (inicjacja) w momencie homolitycznego oderwania wodoru pod wpływem inicjatora i wytworzenia węglowego rodnika alkilowego. Na etapie propagacji reakcji następuje łączenie się rodników z tlenem cząsteczkowym i wytworzenie rodnika nadtlenkowego. Wytworzone cząsteczki są bardzo reaktywne i szybko reagują z nienasyconymi lipidami tworząc wodoronadtlenki i kolejne rodniki alkilowe. Są to pierwotne produkty reakcji utlenienia. Zakończenie reakcji (terminacja) następuje z chwilą połączenia się rodników i wytworzenia nierodnikowych produktów. Świeżość i stabilność oksydacyjną tłuszczów często oznacza się na podstawie ich okresu indukcji, czyli okresu, w którym tworzenie się nadtlenków jest niewykrywalne lub bardzo małe, aż do chwili ich gwałtownego wzrostu w objętości badanej próbki [Drozdowski 2002].

W dalszym etapie procesu utleniania pierwszorzędowe produkty (nadtlenki i wodoronadtlenki) zostają przekształcone w związki lotne (wtórne produkty utleniania) oznaczane przy pomocy liczby p -anizydynowej (A_nV) [Guillen i Cabo 1999; Maszewska i Krygier 2005]. Na tym etapie reakcji obserwuje się także spadek wartości liczby nadtlenkowej [Smith i in. 2007]. Powstające produkty lotne (krótkołańcuchowe węglowodory, aldehydy, ketony, estry, laktony, alkohole i etery) nadają żywności charakterystyczny zapach i smak zjełczenia [Matthaus i in. 2010; Yu i in. 2007]. Jednak ważniejszym od pogorszenia właściwości sensorycznej jest obniżenie wartości żywieniowej takich produktów [Smith i in. 2007]. Zmniejsza się w nich zawartość cennych niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), karotenów i witaminy A. W wyniku utleniania tokoferoli maleje także aktywność biologiczna witaminy E [Warner i Moser 2009]. Produktami daleko posuniętego utleniania są m.in. toksyczne rodniki, odpowiedzialne za różne patologiczne procesy, takie jak: zmiany nowotworowe, miażdżycę, niszczenie aktywnych biologicznie białek, mutagenne działanie na kwasy nukleofilowe, czy negatywne zmiany komórkowe związane z procesem starzenia [Pellegrini i in. 2001].

1.2 Substancje nielotne wpływające na właściwości sensoryczne olejów

Występujące naturalnie tłuszcze i oleje, a w szczególności oleje roślinne zawierają naturalne substancje chroniące tłuszcze przed utlenieniem [Koski i in. 2002]. Są to substancje nielotne lub słabo lotne, wpływające jednak na kształtowanie przemian w tłuszczach i powstawanie substancji bardziej lotnych, przez co kształtują właściwości sensoryczne tłuszczów [Contini i Esti 2006; Hayian i in. 2007; Ravi i in. 2005]. Substancje, które

spowalniają lub wstrzymują reakcje utleniania nazywane są przeciwutleniaczami lub antyoksydantami. Jest to duża grupa związków chemicznych różniących się mechanizmami działania. Można je sklasyfikować w zależności od mechanizmu działania w dwóch kategoriach, jako przeciwutleniacze pierwotne i wtórne. Przeciwutleniacze pierwotne hamują proces utleniania poprzez przerwanie łańcuchowej reakcji rodnikowej przez konwersję rodników do bardziej stabilnych związków [Szukalska 2003]. Charakterystyczną cechą przeciwutleniaczy jest to, że są one efektywne w bardzo małych stężeniach rzędu 0,001-0,1 %. Przekroczenie ich optymalnego stężenia może powodować obniżenie aktywności lub wręcz wzmożenie działania prooksydacyjnego [Yang i in. 2002]. Wśród naturalnych substancji przeciwutleniających występujących w olejach roślinnych należy wymienić związki z grupy tokoferoli [Deiana i in. 2002; Leclercq i in. 2007; Nogala-Kałucka i in. 2005], a także niektóre sterole roślinne [Gutierrez i Fernandez 2002; Rudzińska i in. 2009; Zhang i in. 2006b], a wśród nich brassikasterol występujący w rzepaku [Małecka 1995; Rudzińska i in. 2003]. Działanie przeciwutleniające przypisuje się również związkom polifenolowym (kwercytna) oraz kwasom fenolowym występującym w nasionach rzepaku czy w owocach oliwki [Hrncirik i Fritsche 2005; Medina i in. 1999b; Siger i in. 2004; Siger i in. 2005].

Właściwości przeciwutleniające posiadają także ekstrakty niektórych roślin, warzyw i ziół często dodawane do gotowych produktów tłuszczowych [Bouaziz i in. 2008; Huang i Frankel 1997]. Najpopularniejszymi ziołami wykazującymi działanie antyoksydacyjne są rozmaryn, majeranek, tymianek, szalwia i oregano [Romero i in. 2007; Wroniak i Łubian 2008]. Ponadto w celu poprawy stabilności oksydatywnej olejów można do nich dodawać hydrolizaty białkowe (z odtłuszczonej śruty sojowej) oraz mieszaninę tokoferoli uzyskanych z destylatów po dezodoryzacji oleju sojowego [Korczak i in., 1999].

Oprócz przeciwutleniaczy pierwotnych wyróżnia się także przeciwutleniacze wtórne, które opóźniają utlenianie lipidów w wyniku innych procesów niż przerwanie łańcuchowej reakcji autooksydacji. Główny mechanizm ich działania polega na zdolności wiązania niektórych jonów metali (związki chelatujące, np. EDTA), tlenu, absorpcji promieniowania UV oraz regeneracji pierwotnych przeciwutleniaczy (np. kwas askorbinowy), tworzeniu ochronnej powierzchni granicznej pomiędzy olejem a powietrzem (np. fosfolipidy), powodując również rozkład nadtlenków do produktów nierodnikowych lub dezaktywację („gaszenie”) tlenu singletowego (np. β -karoten) [Cecchi i in. 2010; Szukalska 2003]. Są to związki organiczne lub nieorganiczne o charakterze kwaśnym, np. kwas askorbinowy, cytrynowy

i fosforowy dodawane najczęściej do tłuszczu smaźalniczego [Guo i in. 2006; Zhang i in. 2010]. Do grupy naturalnych przeciwutleniaczy wtórnych należą m.in. hydrolizaty białkowe. Ich właściwości przeciwutleniające związane są prawdopodobnie z obecnością aminokwasów, peptydów i produktów reakcji Maillarda, będących ich podstawowymi składnikami [Korczak i in. 1999].

1.3 Zawartość kwasów tłuszczowych

Jednym z głównych wyznaczników jakości i świeżości olejów roślinnych jest zawartość oraz profil kwasów tłuszczowych. Ponieważ długołańcuchowe kwasy organiczne są związkami mało lotnymi, w celach analitycznych przeprowadza się je w ich bardziej lotne pochodne – estry kwasów tłuszczowych. Reakcja estryfikacji jest bardzo często wykorzystywana w analizie tłuszczów. Metodami opartymi na wykorzystaniu chromatografii gazowej powszechnie analizuje się kwasy tłuszczowe w postaci ich estrów metylowych. Otrzymuje się je w procesie opisanym w normie (PN-EN ISO 5509) przez bezpośrednią estryfikację kwasów tłuszczowych metanolem w obecności HCl, H₂SO₄ lub BF₃, SOCl₂ albo estryfikację diazometanem. Mechanizm reakcji estryfikacji katalizowanej kwasami jest odwróceniem reakcji hydrolizy wiązania estrowego [Drozdowski 2002]. Przed reakcją estryfikacji próbki tłuszczu należy najpierw zmydlić w reakcji kwasów tłuszczowych z NaOH w metanolu (30 min, 60 °C), a następnie przeprowadzić reakcję estryfikacji metanolem w obecności np. trifluorku boru lub chlorku tionylu. Następnie otrzymane estry metylowe ekstrahuje się do fazy heksanowej i suszy w atmosferze azotu. Tak przygotowaną próbkę dozuje się do chromatografu gazowego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/FID) [PN-EN ISO 5508; PN-EN ISO 5509].

Na podstawie składu i znajomości profili kwasów tłuszczowych w badanej próbce można zidentyfikować rodzaj oleju (słonecznikowy, rzepakowy, sojowy itd.), a także określić stopień jego utlenienia na podstawie zawartości izomerów *trans*, czy ubytku kwasów nienasyconych i pojawienia się kwasów krótkołańcuchowych [Al-Alawi i in. 2006; Tynek i in. 2001]. Jedną z metod stosowanych do wykrywania zafałszowań jest oznaczanie składu kwasów tłuszczowych z wykorzystaniem technik chromatograficznego oznaczania ich estrów metylowych [Chiou i in. 1995]. Jednak takie podejście związane jest z ryzykiem błędnej interpretacji z uwagi na podobieństwo składu kwasów tłuszczowych w niektórych olejach roślinnych. Ponadto, na profil kwasów tłuszczowych wpływa klimat, region uprawy roślin i środowisko wzrostu, co dodatkowo utrudnia ocenę autentyczności oleju [Shaw i in. 1997; Stevenson i in. 2007; Wenzl i in. 2002].

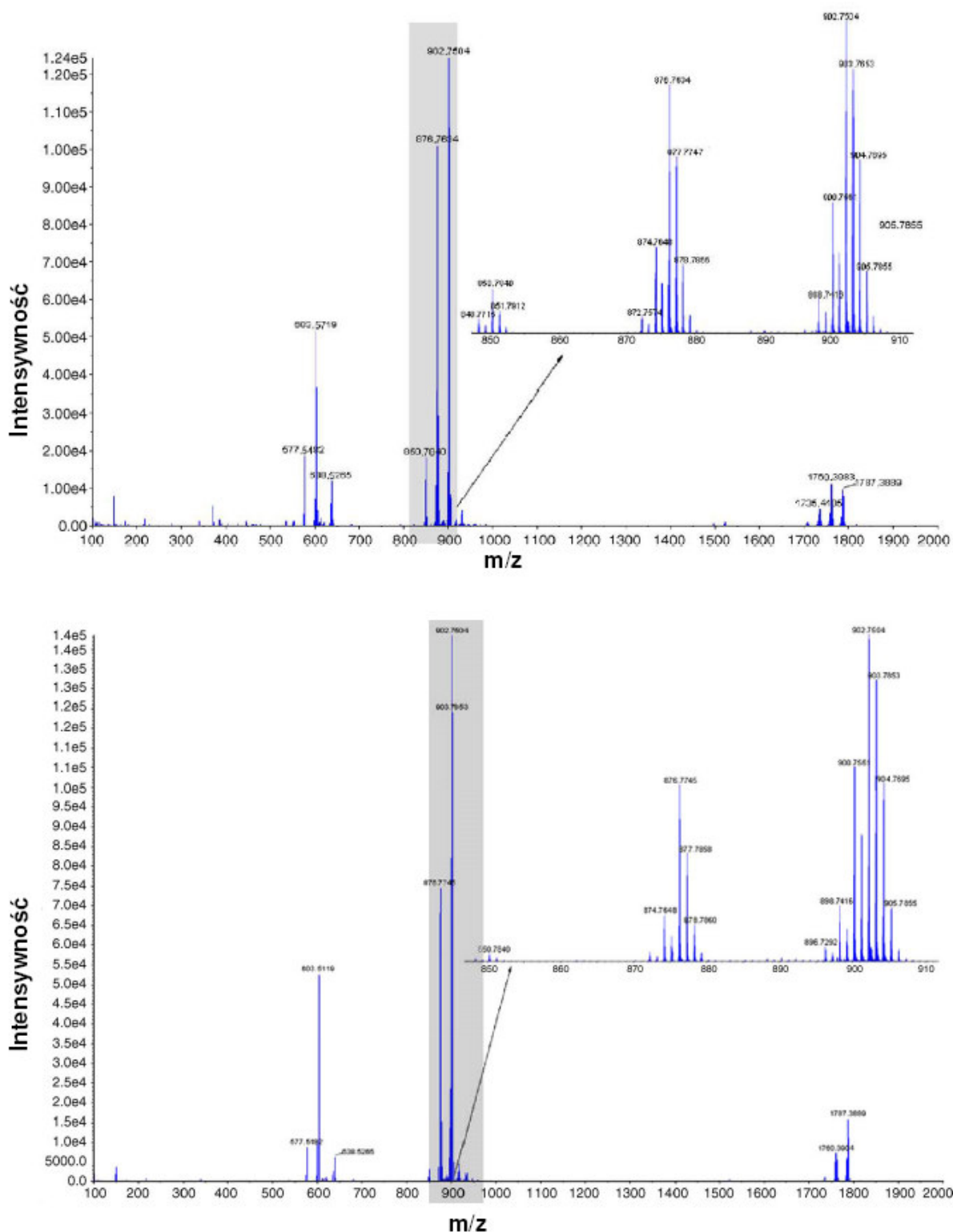
Znajomość składu kwasów tłuszczowych może również dostarczyć informacji o ewentualnych zafałszowaniach oleju przez dodatek innych tańszych olejów. Zawartość kwasu linolowego jest dobrym wskaźnikiem czystości w przypadku zafałszowania oleju słonecznikowego tańszym olejem sojowym lub rzepakowym. Podobnie jak zawartość izomerów *trans* kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego powyżej maksymalnego dopuszczalnego poziomu dla oliwy z oliwek, może być wskaźnikiem zafałszowań przez uwodornione oleje z ziaren, przestryfikowaną oliwą lub nieodpowiednio traktowaną oliwą podczas procesu wydobycia [Aparicio i Aparicio-Ruiz 2000]. Dowodem na obecność dodatku oleju rzepakowego może być wykrycie w profilu kwasów badanego oleju kwasu erukowego, charakterystycznego dla rzepaku.

Podobnie zawartość steroli może być wykorzystana w analizie czystości i zafałszowań olejów. Już 5% dodatku oleju rzepakowego do oleju słonecznikowego pozwala wykryć w zafałszowanym oleju charakterystyczny dla rzepaku brassikasterol. Jest on również wskaźnikiem w sytuacjach, gdy istnieje podejrzenie, że olej rzepakowy został zafałszowany przez oleje sojowy [Aparicio i Aparicio-Ruiz 2000].

Zastosowanie wysokorozdzielczej chromatografii gazowej umożliwiło wykrywanie zafałszowań w olejach roślinnych ze znacznie większą czułością, niż technikami tradycyjnymi. Problem ten jest szczególnie istotny w przypadku droższych i lepszych gatunkowo olejów (oliwa z oliwek, olej z pestek dyni), do których dodatek nawet niewielkiej ilości tańszych i pospolitszych olejów znacznie zwiększa dochód ze sprzedaży. Dlatego autentyczność i czystość olejów musi być kontrolowana [Wenzl i in. 2002].

Autentyczność oliwy z oliwek oznaczano również na podstawie analizy zawartości i stężenia węglowodorów. Dodatek oleju rzepakowego i słonecznikowego w oliwie można wykryć poprzez oznaczenie *n*-nonakozanu i *n*-hentriakontanu [Webster i in. 2000].

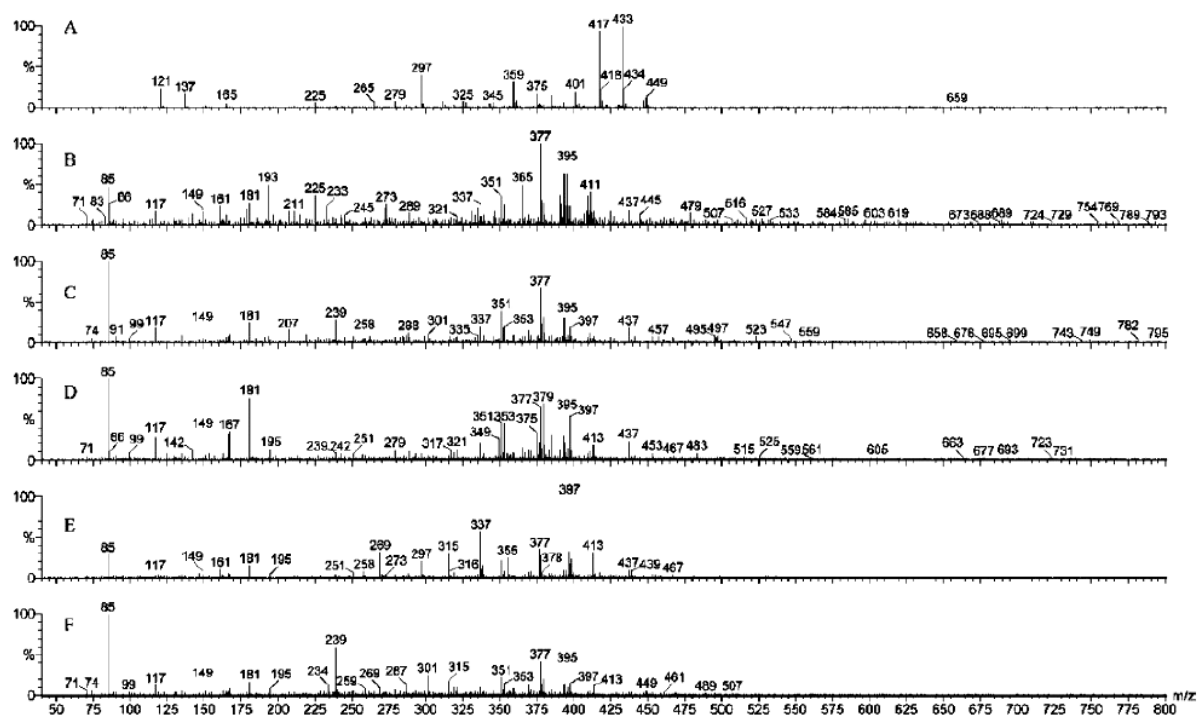
Najtrudniej jest oznaczyć dodatek oleju z orzechów laskowych z uwagi na jego wysokie chemiczne podobieństwo do oliwy z oliwek [Beaten i in. 2005]. Najlepszym narzędziem analitycznym do uzyskania tzw. „odcisku palca” (fingerprinting) złożonych próbek, takich jak oliwa z oliwek, wydaje się być tandemowa spektrometria mas, dzięki której unika się etapu rozdzielania chromatograficznego, co znacznie skraca czas przygotowania próbek i analizy [Gomez-Ariza i in. 2006] (Rys. 1).



Rys. 1. Widmo mas wykonane w pełnym zakresie skanowania ESI-MS (a) oliwa z oliwek, (b) olej z orzechów laskowych. Zakres m/z 800 – 900 jest powiększony [Gomez-Ariza i in. 2006].

Metoda spektrometrii mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie (direct infusion electrospray ionization mass spectrometry - ESI-MS) jako analiza typu “odcisk palca” została zastosowana przez Catharino do oceny autentyczności oliwy, oleju sojowego, kukurydzianego, rzepakowego, słonecznikowego i bawełnianego. Technika pozwala również

określić pochodzenie i region geograficzny uprawy surowców olejowych [Haddada i in. 2007]. Ponadto szybko i selektywnie zapewnia możliwość klasyfikacji, kontrolę jakości, ocenę świeżości i wykrywanie zafałszowań w próbkach olejów roślinnych. Dodatkowo etap przygotowania próbek jest tu zminimalizowany do uzyskania ekstraktów wodno-metanolowych, umożliwiających jednocześnie wykrywanie kwasów tłuszczowych i polarnych składników fenolowych - dwóch najważniejszych grup związków w olejach roślinnych [Catharino i in. 2005] (Rys. 2).



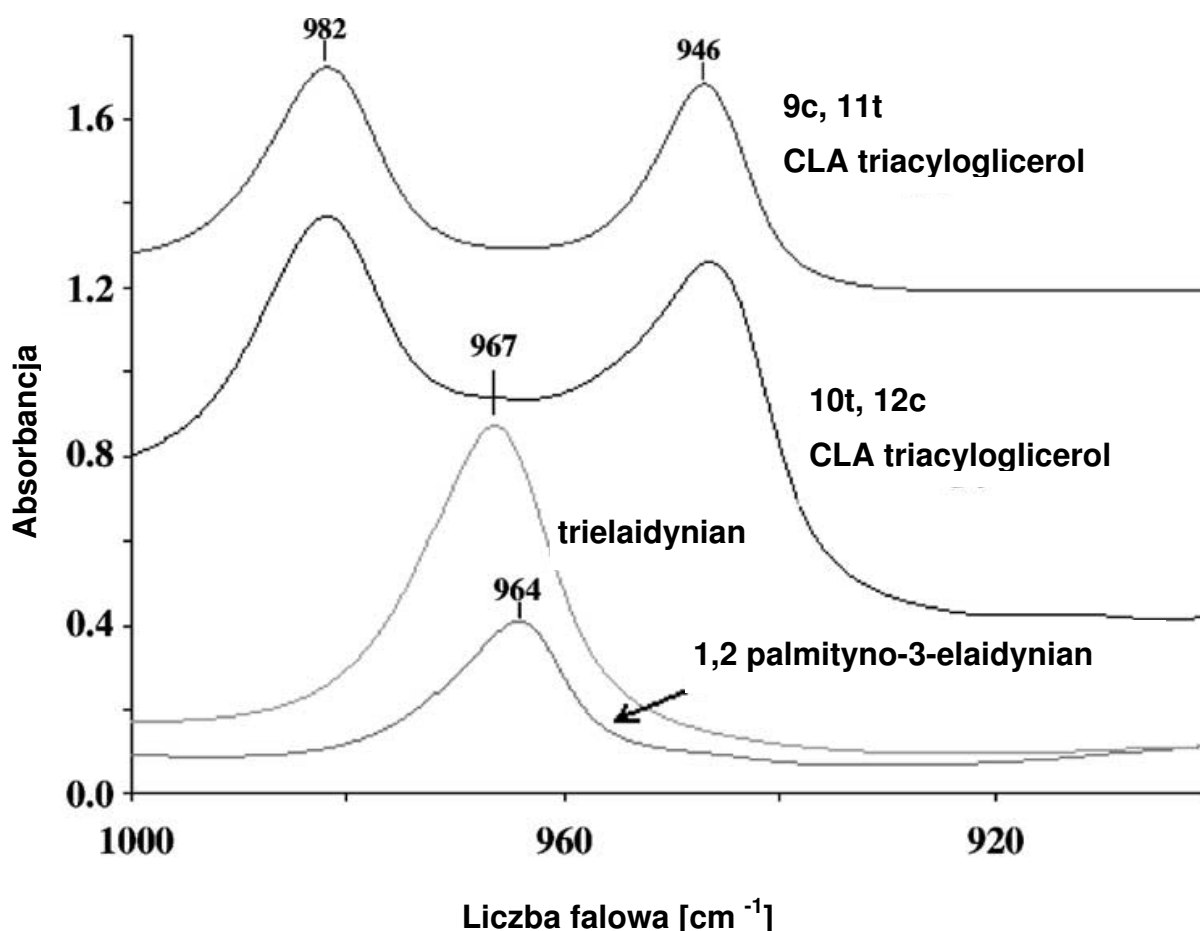
Rys. 2. Widmo typu „odcisk palca” wykonane z wykorzystaniem techniki ESI-MS z dodatnią jonizacją ekstraktów metanolowo-wodnych następujących olejów: (A) oliwa z oliwek, (B), sojowy, (C) kukurydziany, (D) rzepakowy odmiana Canova, (e) słonecznikowy, (F) bawełniany [Catharino i in. 2005].

Również czystość oleju dyniowego można określić na podstawie zawartości fitosteroli (stigmasterol, campesterol, β -sitosterol), których w przeciwieństwie do innych olejów roślinnych, olej dyniowy zawiera niewiele [Wenzl i in. 2002]. Olej z pestek dyni najczęściej jest fałszowany poprzez dodatek oleju słonecznikowego lub rzepakowego, które są praktycznie niewykrywalne przez konsumenta z uwagi na ciemno zielony kolor i intensywny zapach pochodzący od pirazyn, charakterystyczny dla oleju dyniowego [Wenzl i in. 2002]

Innym podejściem do oceny autentyczności lub zafałszowań olejów roślinnych jest proponowana przez Zhang ocena właściwości fizykochemicznych, takich jak: liczba kwasowa, nadtlenkowa i zmydlania, a także barwa, gęstość, współczynnik załamania światła, wilgotność i lotność [Zhang i in. 2006], a następnie przetworzenie otrzymanych danych przy

pomocy technik chemometrycznych, takich jak analiza głównych składowych (PCA), metoda częściowych najmniejszych kwadratów (PLS) czy sztuczna sieć neuronowa typu radialnej funkcji bazowej (RBF-ANN) [Vigli i in. 2003]. Stosując wspomniane techniki można nie tylko wykryć zafałszowania oleju, ale dodatkowo ocenić jego świeżość i jakość [Lankmayr i in. 2004; Poulli i in. 2005; Zhang i in. 2006]. Techniki chemometryczne zostały również zastosowane do oceny autentyczności oliwy z oliwek na podstawie analizy frakcji lipidowej przy pomocy chromatografii gazowej (pola powierzchni pików poszczególnych analitów) z detektorem mas [Blanch i in. 1998; Caruso i in. 2000]. Zaprojektowany model chemometryczny umożliwił stworzenie trójstopniowej metody identyfikacji oliwy: aby ocenić czy próbka została zafałszowana, aby zidentyfikować jakim olejem została zafałszowana (słonecznikowy, kukurydziany, arachidowy, kokosowy) i w jakim stopniu została zafałszowana (ile dodano innego oleju) [Capote i in. 2007].

Przy pomocy tej metody, oprócz składu kwasów tłuszczowych w badanej próbce, wyznacza się również stopień ich uwodornienia. Uwodornienie olejów roślinnych jest jedną z najwcześniej wprowadzonych i najbardziej powszechnych metod modyfikacji tłuszczów, stosowaną w celu zmiany temperatury topnienia i charakterystyki krzepnięcia [Naglic i Smidovnik 1997; Daniels i in. 2006]. Głównym powodem prowadzenia procesu częściowego uwodornienia jest uzyskanie nowych właściwości organoleptycznych i większej stabilności oksydacyjnej otrzymywanych tłuszczów, w których większość stanowią jednonienasycone kwasy tłuszczowe. Jednak w wyniku procesu uwodorniania, powstają pewne niekorzystne produkty w postaci izomerów *trans* kwasów tłuszczowych [Johnson i in. 2002; Moreno i in. 1999]. Stosując odpowiednie wypełnienia kolumn kapilarnych można oznaczyć również powstające izomery zarówno geometryczne jak i pozycyjne [Naglic i Smidovnik 1997]. Zarówno izomery *trans* jak i kwasy linolowe ze sprzężonym wiązaniem podwójnym (CLA) można oznaczać stosując chromatografię gazową połączoną ze spektroskopią w podczerwieni i chemometrycznym opracowaniem uzyskanych wyników [Armenta i in. 2007; Garcia-Martinez i in. 2009; Wang i in. 2006]. Widma w podczerwieni otrzymuje się skanując próbkę w zakresie $1000 - 850 \text{ cm}^{-1}$, gdyż w tym zakresie występują drgania wiązania CH pochodzącego od izomerów *trans* kwasów tłuszczowych oraz drgania deformacyjne wiązania CH w kwasach linolowych ze sprzężonym wiązaniem podwójnym [Christy i in. 2003; Muik i in. 2007; van de Voort i in. 2008; Yang i in. 2005] (Rys. 3).



Rys. 3. Widmo w podczerwieni wybranych izomerów *trans* kwasów tłuszczowych dla liczby falowej w zakresie 1000 – 850 cm^{-1} [Christy i in. 2003]

2 Standardowe metody oceny stabilności oksydacyjnej tłuszczów roślinnych

Klasyczne metody oznaczania procesu utleniania tłuszczów odnoszą się tylko do jednej klasy związków spośród skomplikowanej mieszaniny, która powstaje w czasie utleniania [Bester i in. 2008]. Dlatego ich zastosowanie zapewnia możliwość uzyskania bardzo ograniczonych informacji dotyczących procesu utleniania, jednak są to metody znormalizowane i często stosowane jako referencyjne [Lampi i in. 1998]. Najczęściej do określania stopnia utlenienia stosuje się liczbę nadtlenkową (PV), która pozwala oszacować zawartość pierwotnych produktów utlenienia w badanej próbce. Razem z oznaczeniem wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) można ocenić stopień zjełczenia tłuszczu [Lee i in., 2007a].

Dotychczas stopień utlenienia (degradacji) badanego oleju, wg. Polskich Norm, oznaczano przy pomocy klasycznych metod miareczkowych. Zgodnie z nimi określa się tzw. liczby charakterystyczne, które opisują właściwości oleju i jego stabilność oksydacyjną [Farhoosh i Pazhouhanmehr 2009; Hendl i in. 2001; Liescheski 1996]. Główne z nich to: liczba kwasowa (AV) (PN-EN ISO 660), jodowa (IV) (PN-EN ISO 3961), nadtlenkowa (PV) (PN-

EN ISO 3960), anizydowa (A_nV) (PN-EN ISO 6885) oraz wskaźnik TOTOX (suma pierwotnych i wtórnych produktów utlenienia) obliczana na podstawie wartości liczb PV i A_nV na poszczególnych etapach utleniania tłuszczów. Aby oznaczyć stabilność tłuszczów, oprócz testów statycznych, polegających na oznaczaniu zmian w oleju przechowywanym w ciemnym chłodnym miejscu bez dostępu tlenu (tzw. testy półkowe), stosuje się także testy przyspieszone, wykorzystujące zależność szybkości przemian oksydacyjnych od dostępu tlenu, temperatury czy promieniowania UV. O stabilności oleju można wnioskować także na podstawie zmiany barwy oznaczanej spektrofotometrycznie, barwników chlorofilowych, karotenów, sprzężonych dienów, czy też spadku zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych [Tynek i in. 2001].

2.1 Klasyczne metody oznaczania stabilności oksydacyjnej

Jedną z klasycznych metod oznaczania stabilności oksydacyjnej tłuszczów i olejów jest metoda pomiaru wodoronadtlenków w badanej próbce poprzez oznaczenie wartości liczby nadtlenkowej (PV) [Kardash-Strochkova i in. 2001; Tong i in. 2006]. Metoda ta umożliwia pomiar pierwotnych (I-rzędowych) produktów utlenienia. Zawartość wodoronadtlenków we wszystkich rodzajach tłuszczów i olejów jest oznaczana metodą jodometryczną, opartą na redukcji grupy wodoronadtlenkowej (ROOH) przez jony jodu. Ilość wydzielonego w reakcji jodu (I_2) jest proporcjonalna do stężenia nadtlenków w badanej próbce. Wydzielony jod jest odmiareczkowany mianowanym roztworem tiosiarczynu sodu ($Na_2S_2O_3$) w obecności skrobi jako wskaźnika.

Głównymi wadami tej metody są: możliwość absorpcji jodu przez nienasycone kwasy tłuszczowe oraz uwolnienie jodu z jodku potasu przez tlen obecny w roztworze. Na wyniki oznaczeń może również wpływać struktura i reaktywność nadtlenków oraz temperatura i czas reakcji. Tak więc jest to metoda ściśle zależna od umiejętności analityków i powtarzalności procedury. Problemy z oznaczeniami za pomocą wspomnianej metody pojawiają się dla próbek o niskich wartościach liczby PV. W takich sytuacjach trudno jest wychwycić wizualnie punkt końcowy miareczkowania [Shahidi i Wanasundara 2008].

Wtórne bądź drugorzędowe produkty utlenienia oznacza się przez pomiar liczby anizydynowej (A_nV). Wartość liczby *para* – anizydynowej jest zdefiniowana jako stokrotna wartość gęstości optycznej zmierzonej dla fali o długości $\lambda = 350$ nm w kuwecie o drodze optycznej równej 1 cm dla roztworu zawierającego 1 g oleju w 100 ml roztworu.

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości aldehydów (głównie 2-alkenali i 2,4-alkanodienali) w tłuszczach zwierzęcych i olejach roślinnych. Istotą metody jest reakcja aldehydów z *p*-anizydyną w środowisku kwaśnym. W wyniku reakcji powstają produkty o żółtej barwie oznaczane spektrofotometrycznie. List zauważył znaczącą korelację pomiędzy wartością A_nV a zmianą zapachu w oleju sałatkowym przygotowanym na bazie oleju sojowego [List i in. 1974].

W warunkach praktyki przemysłowej często wartość liczby anizydynowej podaje się razem z wartością liczby nadtlenkowej w formie wskaźnika całkowitego utlenienia próbki czyli TOTOX (total oxidation). Oblicza się go na podstawie zależności opisanej wzorem: $TOTOX = 2 PV + p-A_nV$. Pomimo praktycznego zastosowania w przemyśle wskaźnik ten nie znajduje uzasadnienia naukowego, gdyż łączy wartości o różnych jednostkach [Shahidi i Wanasundara 2008].

Metody opierające się na technikach miareczkowych są ściśle empiryczne, a ich dokładność zależy od różnorodnych czynników takich jak: ściśle kontrolowany czas reakcji, intensywność mieszania, ochrona składników reakcji przed światłem czy tlenem atmosferycznym [Nouros i in. 1999]. Kolejną wadą tej metody jest czas trwania analizy (w ciągu godziny można oznaczyć tylko 6-8 próbek), konieczność zachowania ścisłego reżimu czasowego na poszczególnych etapach analizy, a także duża ilość zużywanych rozpuszczalników organicznych (kwas octowy i chloroform – w wielu krajach zakazano jego stosowania).

2.2 Wykorzystanie instrumentalnych metod oznaczania stabilności oksydatywnej po etapie przyspieszonego utleniania olejów

W testach przyspieszonych stosuje się aparat Rancimat i aparat Oxidograph do oznaczenia stabilności oksydatywnej w podwyższonej temperaturze 110 - 120 °C, lub test Schaala, na podstawie którego możliwe jest oznaczenie zawartości nadtlenków, czyli pierwotnych produktów utleniania w badanych próbkach [van Aardt i in. 2004; Albi i in. 1997; Bendini i in. 2009; Chiavaro i in. 2009]. Innymi, mniej popularnymi metodami stosowanymi w oznaczeniach stabilności oksydatywnej tłuszczów są metoda manostatyczna oraz metoda wykorzystująca różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) [Guiffida i in. 2007].

Podstawowym i najbardziej popularnym sposobem przyspieszenia utleniania tłuszczów i olejów roślinnych jest działanie na próbkę podwyższoną temperaturą [Choe i Min 2007; Farhoosh i in. 2009]. Najprostszym testem wykorzystującym tę zależność jest termostatowy

test Schaala (Schaal Oven Test), w którym próbki oleju umieszcza się w otwartym naczyniu w termostacie w temperaturze 37-75 °C i okresowo oznacza się wartość liczby nadtlenkowej i anizydynowej, na podstawie których dokonuje się oceny stabilności oksydatywnej badanej próbki [Hidalgo i in. 2002; Spielmeier i in. 2009; Szukalska 2003; Wroniak i in. 2006].

Wśród metod wykorzystujących mechanizm przyspieszonego utleniania należy wymienić metodę aktywnego tlenu (AOM) zwaną również testem Swifta. Metoda jest oparta na stwierdzeniu, że starzenie i jełczenie oleju jest głównie przyspieszane przez natlenianie próbki utrzymywanej w podwyższonej temperaturze. W metodzie AOM ogrzany do temperatury 100 °C olej jest natleniany w różnych przedziałach czasowych, a następnie w pobranych próbkach oznacza się wartość liczby nadtlenkowej. Okres indukcji jest wyznaczany na podstawie wykresu ilustrującego zależność wartości liczby nadtlenkowej od czasu utleniania. Pomimo, że metoda jest zalecana przez Amerykańskie Towarzystwo Chemików Przemysłu Tłuszczowego (AOCS) i jest stosowana od wielu lat, posiada szereg wad. Wśród głównych należy wymienić fakt, iż punkt końcowy oznaczeń określany jest na podstawie wartości nadtlenków, które są niestabilne i ulegają dalszym przekształceniom do bardziej stabilnych produktów drugorzędowych. Dodatkowo, w trakcie gwałtownego utleniania silny wpływ na reakcję, a więc również na wynik końcowy oznaczeń, mają nawet drobne zmiany (wahania) w dopływie tlenu do naczynia reakcyjnego [Shahidi i Wanasundara 2008].

Automatyczną wersją metody jest stosowanie aparatu do pomiaru stabilności olejów (Oil Stability Instrument), umożliwiające wyznaczenie indeksu stabilności oleju (OSI), stosowany głównie w Ameryce Północnej i Australii oraz popularnego w Europie aparatu Rancimat [Anwar i in., 2003]. Oba aparaty, podobnie jak metoda AOM, opierają się na technice przyspieszonego utleniania, jednak w przeciwieństwie do opisaney wyżej metody mierzą zmiany w przewodności wody wywołane przez rozpuszczające się w niej w trakcie procesu utleniania jony lotnych kwasów organicznych, głównie kwasu mrówkowego [Płatek 1995]. Pomiar odbywa się automatycznie i w sposób ciągły, podczas gdy dla metody AOM w odpowiednich odstępach czasowych z naczynka reakcyjnego należy pobierać próbki oleju i oznaczać w nich manualnie wartość liczby nadtlenkowej. Dodatkowo, w przeciwieństwie do nadtlenków, kwasy organiczne są stabilnymi produktami utleniania. W metodach tych reakcja utleniania początkowo przebiega wolno, gdyż w trakcie etapu inicjacji kwas mrówkowy jest wydzielany w niewielkich ilościach. Analiza opiera się na konduktometrycznym oznaczeniu produktów powstających w procesie oksydacji

tłuszczów [Mendez i in. 1996]. Próbki olejów utlenia się w podwyższonej temperaturze strumieniem powietrza [Mateos i in. 2006]. Lotne produkty są następnie wprowadzane do naczynia pomiarowego zawierającego zdemineralizowaną wodę, zaopatrzonego w elektrody do pomiaru przewodnictwa właściwego. W trakcie utleniania powstają lotne produkty, które wprowadzone do wody ulegają dysocjacji jonowej powodując wzrost przewodnictwa elektrolitycznego wody [Farhoosh 2007]. Za koniec okresu indukcyjnego przyjmuje się moment, gdy przewodnictwo właściwe wody rośnie gwałtownie w czasie, wskutek dysocjacji m. in. lotnych kwasów karboksylowych [Hęś i in. 2001]. Jako punkt końcowy oznaczeń wybrano moment gwałtownego wzrostu przewodności.

W aparacie Rancimat jednocześnie można oznaczać stabilność oksydacyjną w 8 próbkach, podczas gdy w metodzie OSI w tym samym czasie można analizować 24 próbki czyli 3-krotnie więcej. Ponadto wartości uzyskane na podstawie analiz z zastosowaniem aparatu OSI są dobrze skorelowane ze zmianami sensorycznymi oleju i wyznaczonym tzw. sensorycznym okresem indukcji [Broadbent i Pike 2003; Coppin i Pike 2001].

Przykładem kolejnej modyfikacji opisanych aparatów jest urządzenie Oxidograph, w którym próbka oleju lub tłuszczu poddana jest działaniu powietrza lub tlenu w podwyższonej temperaturze i przy intensywnym mieszaniu. Jednak, w przeciwieństwie do aparatu Rancimat czy metody OSI, w trakcie utleniania mierzy się tu spadek ciśnienia gazu (O_2 lub powietrza), który jest zużywany w trakcie utleniania próbki [Lauridsen i Schultz 1993]. Za miarę stabilności próbki przyjmuje się koniec okresu indukcyjnego, wyznaczonego graficznie na podstawie wykresu zależności spadku ciśnienia tlenu w funkcji czasu utleniania.

Inną modyfikacją jest metoda manostatyczna opracowana w latach 90-tych ubiegłego wieku przez zespół profesora Drozdowskiego w Katedrze Technologii i Chemii Tłuszczów Politechniki Gdańskiej. W metodzie tej próbka oleju jest utrzymywana w podwyższonej temperaturze i intensywnie natleniana, podobnie jak poprzednio, jednak miarą postępu reakcji w tym wypadku jest objętość pochłoniętego przez próbkę w trakcie reakcji utleniania tlenu, mierzona za pomocą urządzenia manostatycznego [Szukalska 2003].

Współczesną modyfikacją metody OSI jest procedura, w której wykorzystuje się reaktor OXITEST skonstruowany w Uniwersytecie w Bolonii we Włoszech przez zespół Comandini. W reaktorze próbka (także stała bez konieczności rozpuszczania w rozpuszczalnikach organicznych) poddawana jest utlenianiu w podwyższonej temperaturze w zakresie do $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ pod wpływem zwiększonego ciśnienia tlenu nawet do 8 barów. Aparat automatycznie

monitoruje spadek ciśnienia w komorze reakcyjnej. W swoich badaniach naukowcy uzyskali wyniki porównywalne z wynikami dla metody OSI [Comandini i in. 2009].

Kolejną alternatywą oznaczania stabilności oksydatywnej olejów jest zautomatyzowana technika wstrzykowo-przepływowej analizy (flow injection FI), która zapewnia powtarzalny czas każdego etapu analizy i odizolowane środowisko, umożliwiające wyeliminowanie światła i tlenu (czynników wpływających na proces utleniania) [Nouros i in. 1999; Thomaidis i Georgiou 2000]. W oznaczeniu tym monitoruje się ilość pochłanianego przez próbkę tlenu w ustalonej temperaturze. Logarytm wartości zużytego w procesie utleniania tlenu jest odwrotnie proporcjonalny do temperatury bezwzględnej, dzięki czemu możliwe jest ekstrapolowanie zależnych od temperatury danych, aby określić stabilność analizowanej próbki w innych temperaturach [Tian i Dasgupta, 1999]. Do analiz reakcji przebiegających wolno, tak jak w przypadku reakcji utleniania, stosuje się inkubację w wielu kanałach (multiple incubation channels), gdzie następuje jednoczesna inkubacja 2 do 10 próbek. Technikę tę nazwano równoległym wstrzykiwaniem przepływowym (parallel flow injection PA-FI) i zastosowano do oznaczenia liczby nadtlenkowej (PV) i jodowej (IV) w oliwie z oliwek. Detekcja odbywa się poprzez zastosowanie w układzie analityczno-pomiarowym spektrofotometru albo detektora z przepływem trijodu (triiodide flow through detektor), który mierzy ilość uwolnionego z naczynka reakcyjnego trijodu [Saad i in. 2006]. Proponowana technika umożliwia wyznaczenie wartości PV lub IV dla 60 próbek w ciągu godziny przy 10 minutowym czasie inkubacji, jest więc dziesięciokrotnie szybsza niż klasyczne oznaczenie liczby nadlenkowej czy jodowej. Dodatkowo metoda jest dokładna (błąd na poziomie 0,1 – 1,7 % w porównaniu z oficjalną metodą AOAC) i precyzyjna (RSD poniżej 1,1 %). Jest też przyjazna środowisku poprzez obniżenie zużycia rozpuszczalników organicznych i wyeliminowanie chlorowcopochodnych [Thomaidis i Georgiou 1999; Thomaidis i Georgiou 2000].

2.3 Techniki kalorymetryczne (DSC)

Reakcja utleniania tłuszczu jest procesem egzotermicznym, w związku z czym stabilność oleju można oznaczyć, stosując różnicową kalorymetrię skaningową (DSC). Próbkę tłuszczu umieszczoną w kapsule w termostacie kalorymetru skaningowego poddaje się działaniu stałej temperatury w zakresie 80-140 °C oraz tlenu wobec pustej kapsuły stanowiącej próbkę odniesienia. Zmiany termiczne zachodzące wskutek utleniania w badanej próbce rejestrowane są przez analizator termiczny i przedstawiane w formie krzywej kinetycznej utleniania,

na podstawie której graficznie wyznacza się długość okresu indukcji [Szukalska 2003; Tan i in. 1999; Tan i in. 2002].

Pierwsze zastosowania techniki DSC w ocenie stabilności oksydacyjnej olejów pojawiły się już w latach 70-tych ubiegłego wieku, gdy Cross i Hassel wykorzystali tryb pracy aparatu DSC w stałej temperaturze w analizie olejów [Cross 1970]. Hassel porównał uzyskane wyniki z metodą AOM i stwierdził, iż dla tej samej próbki oleju okres indukcji w metodzie AOM wyniósł 14 dni a dla DSC 4 godziny, czym dowiódł użyteczności i skuteczności techniki DSC w ocenie stabilności tłuszczów [Hassel 1976].

Względnie nowa metoda ciśnieniowej różnicowej kalorymetrii skaningowej (PDSC) znalazła zastosowanie w analizie tłuszczu i olejów, a w szczególności olejów o wysokiej stabilności oksydacyjnej, których analizy w tradycyjny sposób są długotrwałe i uciążliwe. Ciepło właściwe olejów roślinnych wyznaczane przy pomocy technik kalorymetrycznych zależy od składu i kompozycji kwasów tłuszczowych. Znajomość ciepła właściwego danego oleju jest bardzo przydatna w czasie długiego przechowywania olejów, aby ocenić w jakim stopniu dane próbki uległy przemianom [Santos i in. 2005]. Technika tą można oznaczyć oksydacyjny czas indukcji (OIT) olejów, poddając je działaniu wysokiej temperatury lub ciśnieniu w atmosferze czystego tlenu. Technika OIT wykazuje dobrą korelację z indeksem stabilności olejów (OSI). Analiza regresyjna danych umożliwiła wyprowadzenie zależności uwzględniającej temperaturę i wartość liczbową parametru OIT w postaci równania dla każdej odmiany oleju [Kodali 2005]. Analiza taka jest możliwa, gdyż proces utleniania jest reakcją egzotermiczną, a pomiar uwolnionego w reakcji ciepła umożliwia stosowanie do tych badań różnicowej kalorymetrii skaningowej [Simon i Kolman 2001]. Przeprowadzenie procesu przyspieszonego utleniania w nie-izotermicznych warunkach jest istotne z uwagi na podobieństwo takiego procesu do warunków domowych, gdzie olej jest poddawany działaniu różnych temperatur. Analiza wzrostu temperatury oksydacji ze wzrostem stopnia ogrzewania w warunkach nie-izotermicznej DSC pozwala wyznaczyć parametry kinetyczne procesu utleniania olejów [Simon i Kolman 2001].

Krzywe topnienia i zamarzania uzyskiwane przy pomocy techniki DSC mogą służyć do oceny jakości, geograficznego pochodzenia i warunków przechowywania badanych olejów [Angiuli i in. 2006; Tan i Che Man 1999], gdyż są one bardzo wrażliwe na obecność innych mniej licznych związków w matrycy próbki, często świadczących o procesach starzenia czy nielegalnych dodatkach. Obie krzywe mogą też znaleźć zastosowanie w wykrywaniu zafałszowań oliwy tańszymi olejami, a także do oceny jakości samej oliwy (czy nie była

zmieszana z oliwą rafinowaną, filtrowaną lub odwanianą) [Ferrari i in. 2007]. Proponowana przez Ferrari metoda kalorymetrycznego oznaczania zafałszowań oliwy jest prosta, szybka, niedroga i umożliwia przeprowadzenie testów w warunkach komercyjnych. [Ferrari i in. 2007].

Jakość i pochodzenie oliwy z oliwek można też oznaczać wykorzystując inne techniki kalorymetryczne, takie jak wysoko czuła izotermalna kalorymetria (TAM) czy modulowana kalorymetria skaningowa (MASC) [Angiuli i in. 2006]. Modulowana kalorymetria dostarcza informacji o odwracalności procesów i o polimorficznej strukturze kryształów. Każda ze wspomnianych technik kalorymetrycznych znajduje zastosowanie w analizie olejów roślinnych. DSC pozwala na rozróżnienie w krótkim czasie oliwy z oliwek od innych olejów roślinnych. Analiza w trybie TAM jest czasochłonna, ale umożliwia oznaczenie takich parametrów jak czas indukcji (IT) oraz entalpię zamrażania (enthalpy of freezing, H), które są niezwykle czułe na defekty i źródło pochodzenia oliwy. Natomiast kalorymetria z temperaturą modulowaną i pracą w trybie adiabatycznym, w porównaniu z pozostałymi dwiema technikami kalorymetrycznymi, rozszerza możliwości badawcze do szczegółowych badań procesu krystalizacji [Angiuli i in. 2006].

Wśród zalet technik kalorymetrycznych, oprócz krótkiego czasu analizy, należy wymienić również stosowanie niewielkich ilości próbek potrzebnych do analiz i prosty etap ich przygotowania, a także brak toksycznych rozpuszczalników i innych związków chemicznych [Tan i Che Man 1999].

Pomimo, iż opisane instrumentalne metody wykorzystują różne zjawiska w celu wyznaczenia długości okresu indukcji w badanych tłuszczach i olejach, to wielu naukowców podkreśla iż występuje między nimi dobra liniowa korelacja [Szukalska 2003].

3 Promieniowanie UV jako czynnik przyspieszający utlenianie

3.1 Przyspieszanie procesu utleniania

Badania nad wpływem promieniowania świetlnego na proces utleniania tłuszczów prowadzono już w latach 60-tych i 70-tych ubiegłego wieku [Moser i in. 1965]. W tym czasie powstała metoda przyspieszonego utleniania tłuszczów, tzw. test Rutkowskiego, polegający na naświetlaniu cienkiego filmu oleju umieszczonego na bibule promieniowaniem ultrafioletowym.

Jego badania w latach 80-tych, w dobie rozwoju chromatografii gazowej kontynuował Gordon, który w celu przyspieszenia utleniania działał na próbki oleju promieniowaniem

ultrafioletowym, a następnie poddawał analizie lotne produkty utleniania stosując statyczną analizę fazy nadpowierzchniowej połączonej z chromatografią gazową [Gordon i Mursi 1994]. Jako wyznacznik stabilności przyjął sumę lotnych produktów zidentyfikowanych przy pomocy detektora chromatograficznego. Wyniki swoich badań porównywał z wynikami stabilności oksydatywnej uzyskanymi na podstawie pomiarów liczby nadtlenkowej [Gordon i in. 1994].

W tym samym czasie Frankel badał wpływ promieniowania fluorescencyjnego (o mocy 7 535 lux) na szybkość utleniania tłuszczów. Po procesie utleniania lotne produkty poddawał, podobnie jak Gordon, statycznej analizie fazy nadpowierzchniowej połączonej z chromatografią gazową. Mierzył całkowitą ilość związków lotnych, prezentując wyniki w formie wykresu w funkcji czasu utleniania, a okres indukcji oznaczał graficznie [Frankel 1993; Medina i in. 1999a; Warner i in. 1989]. Dla porównania próbek olejów badał również z wykorzystaniem termostatowego testu Schaala (utleniania pod wpływem temperatury). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdził jednak brak korelacji pomiędzy utlenianiem pod wpływem światła i temperatury. Po zidentyfikowaniu części produktów lotnych wytypował heksanal jako charakterystyczny produkt utleniania i powtórnie przeprowadził badania porównawcze oznaczając okres indukcji na podstawie wykresów zależności poziomu stężenia heksanal w badanych próbkach w funkcji czasu naświetlania [Frankel i in. 1994; Yi i in. 1997]. Uzyskał on wyniki zbieżne z wartościami okresów indukcji wyznaczonymi na podstawie testu Schaala [Frankel i in. 1997].

Podobne badania, które potwierdziły zasadność wyboru heksanal jako markera procesu utleniania prowadził Min, działając na próbki oleju promieniowaniem świetlnym o mocy 4 000 lux [Jia i in. 2007; Lee i Min 1990]. Zawartość heksanal oraz sumaryczną ilość produktów lotnych, podobnie jak jego poprzednicy, w utlenionych próbkach oznaczał chromatograficznie [Bartee i in. 2007; Kim i in. 2007a; Kim i in. 2007b; Smith i in. 2007]. Min prowadził również szerokie badania nad mechanizmami procesu utleniania, o których będzie mowa w dalszej części tego rozdziału.

Miraliakbari i Shahidi, prowadząc badania nad rozkładem tokoferoli i formowaniem się sprzężonych dienów w trakcie procesu utleniania w celu przyspieszenia procesu, również naświetlali próbki olejów promieniowaniem o mocy 2650 lux obserwując jego skutki w postaci przyrostu sprzężonych dienów i spadku zawartości tokoferoli [Miraliakbari i Shahidi 2008]. Stabilność badanych olejów porównywali także z metodą stosowaną

wcześniej przez Gordona, oznaczając sumaryczną ilość lotnych produktów utlenienia [Gordon i in. 1994].

3.2 *Autoutlenianie*

Autoutlenianie jest reakcją rodnikową, której ulegają zarówno wolne kwasy tłuszczowe jak i acyloglicerole pod wpływem:

- ciepła/ temperatury
- katalizy metalicznej
- promieniowania ultrafioletowego
- światła widzialnego

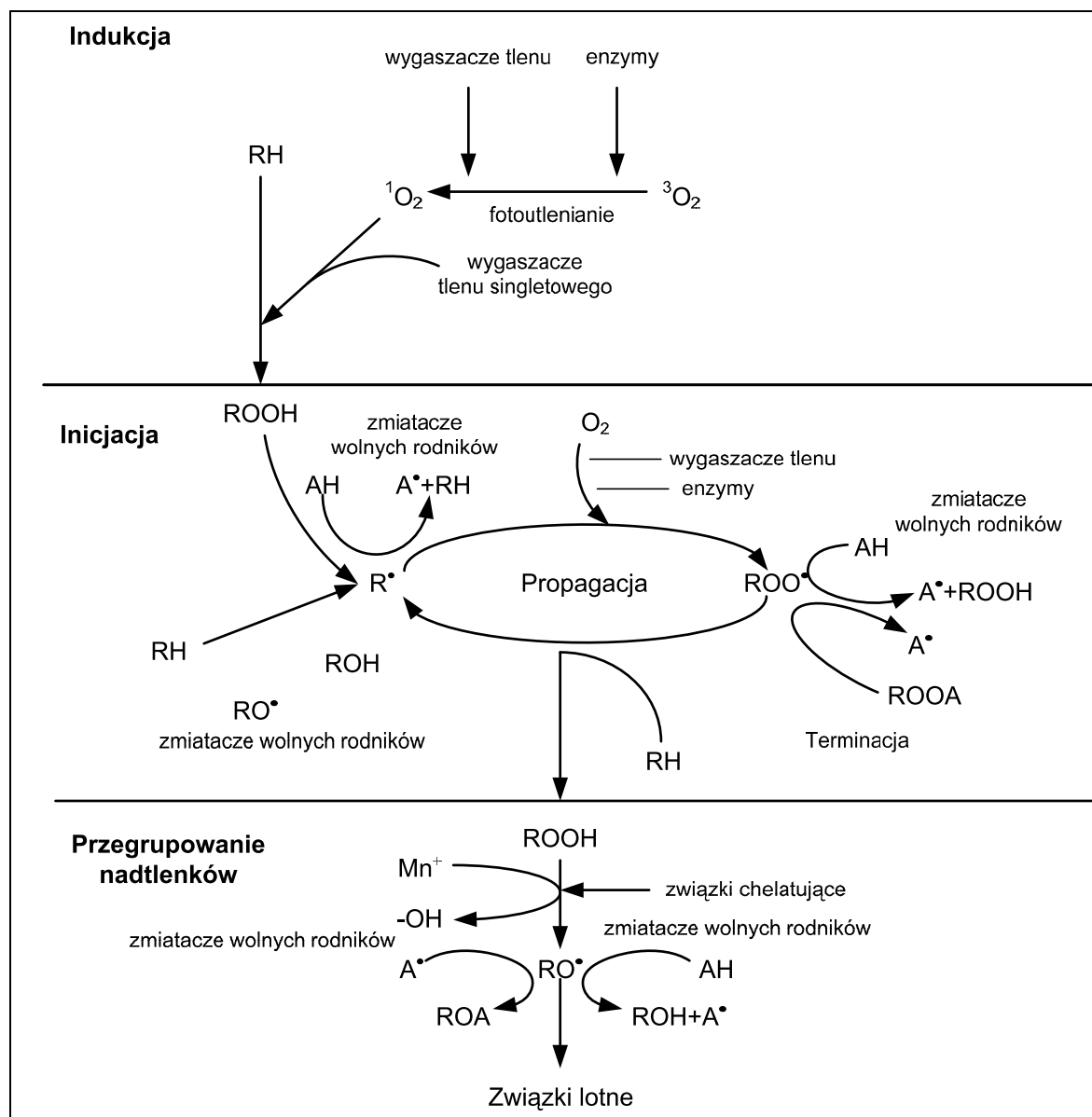
W wyniku reakcji powstają sprzężone dieny. Mechanizm reakcji opiera się na połączeniu rodnika alkilowego z tripletowym tlenem atmosferycznym $^3\text{O}_2$ zawierającym dwa niesparowane elektrony na orbitalu antywiążącym π . W wyniku tej reakcji powstają nadtlenki rodnikowe, które są bardzo reaktywne i niestabilne. Ich rola polega na odrywaniu atomu wodoru z obojętnych cząsteczek i tworzeniu wodoronadtlenków (Tab. 2) i kolejnych rodników (Rys. 4). Wodoronadtlenki w temperaturze pokojowej są względnie stabilne, ale w obecności metali czy pod wpływem podwyższonej temperatury są przekształcane w rodniki alkoksylowe tworząc aldehydy, ketony, kwasy, estry, alkohole i krótkołańcuchowe węglowodory (Tab. 3) [Choe i Min 2006].

Tab. 2. Wodoronadtlenki powstające z trzech głównych kwasów tłuszczowych w trakcie procesu utleniania tlenem singletowym i tripletowym [Akoh i Min 2008]

	<i>Kwas oleinowy</i>	<i>Kwas linolowy</i>	<i>Kwas linolenowy</i>
tlen singletowy	9-OOH		
	10-OOH		
	sprężone wodoronadtlenki	9-OOH	9-OOH
		13-OOH	12-OOH
			13-OOH
			16-OOH
	niesprężone wodoronadtlenki	10-OOH	10-OOH
		12-OOH	15-OOH
tlen tripletowy	8-OOH		
	9-OOH		
	10-OOH		
	11-OOH		
	sprężone wodoronadtlenki	9-OOH	9-OOH
		13-OOH	12-OOH
			13-OOH
			16-OOH

Tab. 3. Wykaz związków lotnych powstających w wyniku reakcji utlenienia kwasów tłuszczowych [Choe i Min 2006].

	<i>Kwas oleinowy</i>	<i>Kwas linolowy</i>	<i>Kwas linolenowy</i>
aldehydy	oktanal	pentanal	propanal
	nonanal	heksanal	butanal
	dek-2-enal	okt-2-enal	but-2-enal
	dekanal	non-2-enal	pent-2-enal
		deka-2,4-dienal	heks-2-enal
			nona-3,6-dienal
			dekatrienal
estry	heptanian metylu	heptanian metylu	heptanian metylu
	oktanian metylu	oktanian metylu	oktanian metylu
	8-oksononanian metylu	8-oksooktanian metylu	nonanian metylu
	9-oksononanian metylu	9-oksononanian metylu	9-oksononanian metylu
	10-oksodekarian metylu	10-oksodekarian metylu	10-oksodekarian metylu
	10-oksodec-8-enian metylu		
11-okosoundec-9-enian metylu			
alkohole	heptanol	pentanol	
		okten-3-ol	
węglowodory	heptan	pentan	etan
	oktan		pentan



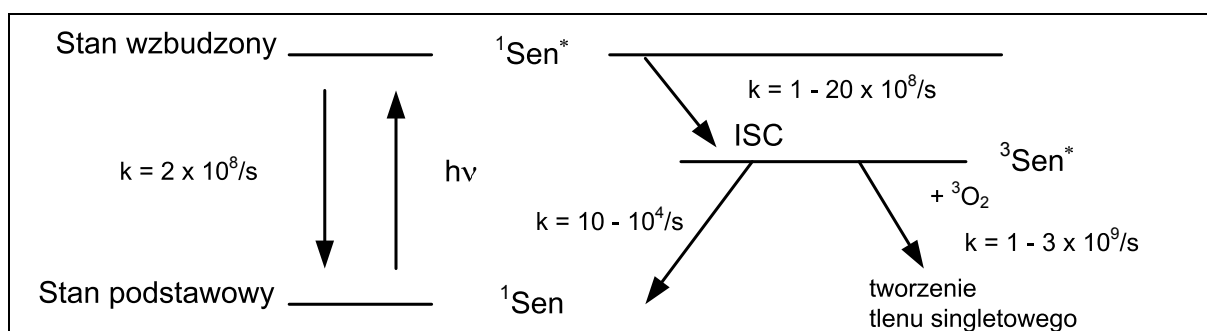
Rys. 4. Schemat procesu utleniania tłuszczu i interakcji z przeciwutleniaczami [Akoh i Min 2008]

3.3 Utlenianie fotosensybilizowane

Jeszcze innym procesem zachodzącym w olejach jest reakcja utleniania alkenu tlenem w obecności światła i odpowiedniego uczulacza, którym może być chlorofil, erytrozyna lub promieniowanie ultrafioletowe [Lee i in. 2010]. Pierwszym etapem tej reakcji jest przekształcenie tlenu atmosferycznego w jego bardziej reaktywną formę – tlen singletowy (Rys. 5). Aktywny tlen atakuje jeden z atomów węgla połączony w łańcuchu alkenowym podwójnym wiązaniem. Reakcja przebiega bez wytwarzania rodników, natomiast następuje migracja podwójnego wiązania i zmiana konfiguracji z *cis* na *trans*. Proces jest niezależny od ciśnienia tlenu i może zostać przerwany (inhibitowany) przez tzw. „wygaszacze” tlenu singletowego, np. β -karotenu lub tokoferoli [Drozdowski 2002; Sabliov i in. 2009; Szłyk i in. 2005].

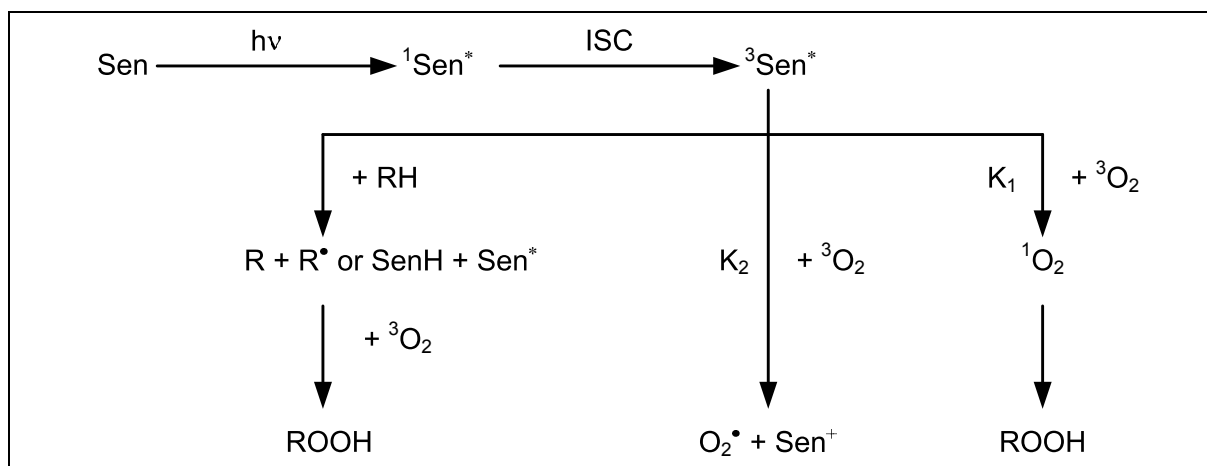
Fotosensybilizowane utlenianie jest reakcją dużo szybszą niż autooksydacja, a różnice w reaktywności kwasów wielonienasyconych są proporcjonalne do liczby występujących w nich wiązań podwójnych [Drozdowski 2002].

Utlenianie fotosensybilizowane jest aktywowane pod wpływem światła w obecności sensybilizatora (chlorofil, promieniowanie UV, erytrozyna) [Cecchi i in. 2010]. W wyniku reakcji, w przeciwieństwie do autoutleniania, powstają zarówno sprzężone jak i izolowane dieny [Garcia-Martinez i in 2009; Poulli i in. 2009].



Rys. 5. Schemat procesu wzbudzenia uczulacza i tworzenia tlenu singletowego; Sen – uczulacz (sensybilizator) [Choe, Min, 2006].

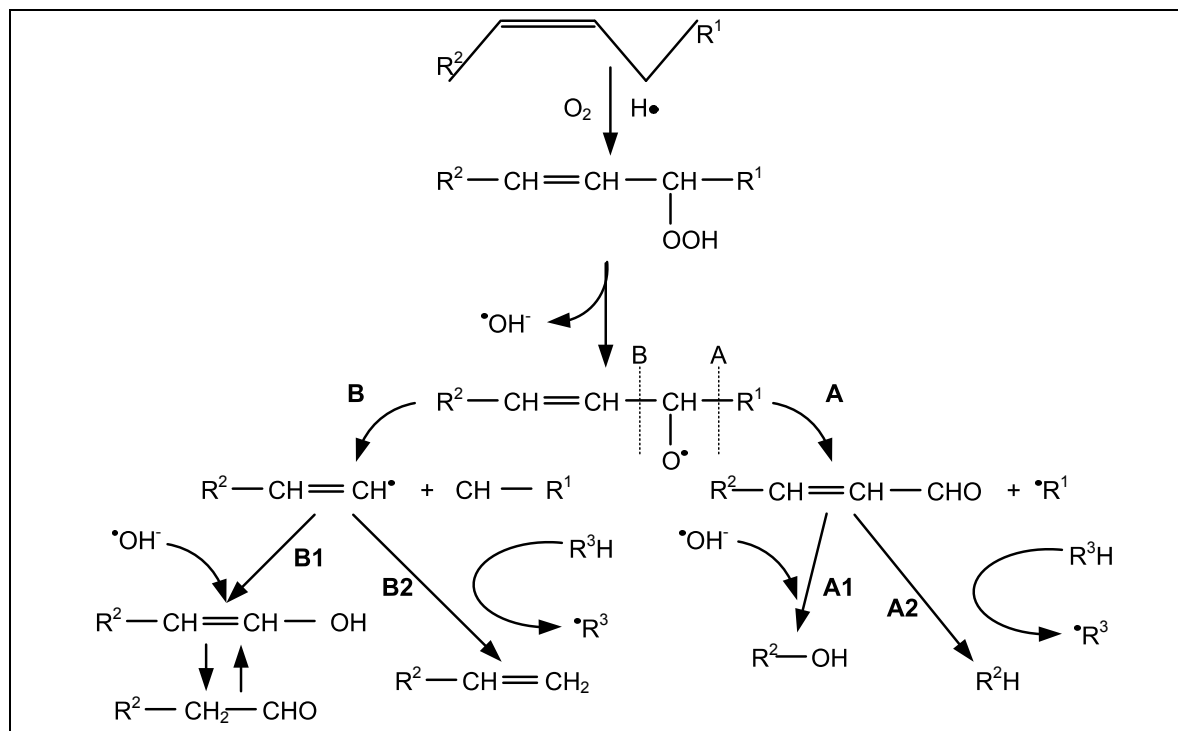
Mechanizm fotoutleniania można podzielić na dwa etapy. W pierwszym sensybilizator absorbuje energię świetlną i zostaje wprowadzony w stan wzbudzenia. Drugi etap jest różny w zależności od typu reakcji (Rys. 6).



Rys. 6. Schemat tworzenia tlenu tripletowego i reakcji przebiegających w trakcie fotoutleniania typu I i II [Choe i Min 2006].

W fotoutlenianiu typu I wzbudzony uczulacz reaguje z obojętną cząsteczką, odrywając od niej atom wodoru i tworząc rodnik. Dalej reakcja przebiega według mechanizmu autoutleniania.

Natomiast, w przypadku fotoutleniania typu II wzbudzony uczulacz reaguje z tlenem tripletowym $^3\text{O}_2$ (atmosferycznym) i na skutek transferu elektronu powstaje anion supernatlenkowy, który dalej przekształcany jest do nadtlenu wodoru. W reakcji nadtlenu wodoru z supernadtlenkiem w obecności metali przejściowych (m. in. miedź, żelazo) powstaje tlen singletowy $^1\text{O}_2$. Tlen singletowy reaguje bezpośrednio ze związkami o większej gęstości elektronowej, takimi jak kwasy nienasycone, które zawierają wiązania podwójne i tworzy wodoronadtlenki. Dalej reakcja przebiega zgodnie z mechanizmem procesu autoutleniania (Rys. 7) [Choe i Min 2006].



Rys. 7. Schemat przebiegu reakcji rozkładu wodoronadtlenków do związków lotnych [Choe i Min 2006].

4 Związki lotne jako markery procesu utleniania

Za zapach i smak charakterystyczny dla zjełczałego tłuszczu odpowiedzialne są w dużej mierze lotne produkty degradacji tłuszczów, a wśród nich metyloketony, aldehydy, alkohole i krótkołańcuchowe wolne kwasy tłuszczowe [Katragadda i in. 2010]. Są to produkty powstałe wskutek procesów lipolizy i utleniania [Povolo i Contarini 2003].

Alternatywnym podejściem do monitorowania postępu procesu utleniania w tłuszczach i olejach jest oznaczenie sumarycznych lub pojedynczych związków lotnych, głównie karbonylowych, powstających na etapie degradacji wodoronadtlenków [Oro i in. 2009]. Oznaczanie indywidualnych związków markerowych staje się w ciągu ostatniego dwudziestolecia coraz bardziej popularnym podejściem wśród chemików zajmujących się tłuszczami. Zawartość heksanal, dla którego występuje liniowa zależność w porównaniu z analizą sensoryczną, jest wykorzystywana w procesie monitorowania reakcji utleniania przebiegających w różnych gatunkach mięsa [Angelo i in. 1987; o'Keefe i in. 1995; Shahidi i Pegg 1994]. Dla tłuszczów zawierających duże ilości kwasów nienasyconych z grupy omega 3 lepszym markerem okazał się być propanal, którego zawartość w badanych próbkach, głównie tłuszczach rybich i z organizmów morskich, wzrasta proporcjonalnie do tempa utleniania [Shahidi i Spurvey 1996; Wanasundara i Shahidi 1995].

4.1 Markery procesu utleniania olejów roślinnych

Za ilościowy marker świeżości olejów roślinnych można przyjąć wzrost zawartości alkoholi sześciowęglowych i ketonów pięciowęglowych [Cavalli i in. 2004]. Jako wskaźnik procesów utleniania tłuszczu wykorzystuje się także wzrost zawartości heksanal w badanej próbce lub stosunek heksanal do nonanal [Jimenez i in. 2004]. Heksanal powstaje zarówno w procesie chemicznego utleniania kwasu linolowego jak i w enzymatycznych procesach metabolicznych szlaku lipooksygenazy. Jest to naturalnie zachodzący proces utleniania pod wpływem enzymów, podczas którego następuje degradacja (hydroliza) kwasu linolowego i linolenowego. Końcowymi produktami tego procesu są lotne aldehydy i alkohole sześciowęglowe, takie jak: heksanal, heks-2-enol czy heks-2-enal. W wyniku tego procesu nie powstaje nonanal, który właśnie dlatego może być wskaźnikiem stopnia chemicznego utlenienia oleju [Cavalli i in. 2004; Jimenez i in. 2006].

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych przez Vichi można stwierdzić, iż najlepszym markerem stabilności oksydacyjnej 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 autooksydacji kwasu oleinowego. Nonanal wykazuje najwyższy stopień przyrostu w trakcie procesu utleniania, dlatego został uznany za odpowiedni wskaźnik stopnia utlenienia [Vichi i in.2003].

Jako trzeci marker procesu utleniania uznać można propanal. Związek ten powstaje jako jeden z pierwszych produktów w szlaku utleniania kwasu linolenowego i jego pochodnych, charakterystycznego głównie dla oleju lnianego, rzepakowego i sojowego oraz dla tłuszczów rybich [Shahidi i Wanasundara 2008].

Oznaczanie lotnych substancji w próbkach tłuszczu umożliwia z jednej strony określenie świeżości oleju i stopnia jego utlenienia, z drugiej zaś otwiera możliwość stosunkowo łatwej, szybkiej i taniej techniki wykrywania zafałszowań droższych olejów olejami tańszymi lub wykrycie zafałszowań masła wskutek dodatku tłuszczów roślinnych [Lorenzo i in. 2002a; Lorenzo i in. 2002b; Page i Lacroix 2000].

Zasadność wyboru heksanal jako markera procesu utleniania potwierdził także Cavalli prowadząc badania nad oznaczaniem stabilności oliwy z oliwek różnego pochodzenia [Cavalli i in., 2004]. Jednak jak wykazały dalsze badania heksanal powstaje nie tylko w procesie utleniania, ale również w naturalnych procesach enzymatycznych (szlak lipooksygenazy) zachodzących ze szczególną intensywnością w tłoczonej nierafinowanej

oliwie z oliwek. Dlatego też Vichi zaproponował nonanal jako dodatkowy wskaźnik procesu utleniania [Vichi i in., 2003]. Z kolei Jimenez, prowadzący również badania nad hiszpańską oliwą z oliwek, opierając się na wcześniejszych doniesieniach [Harwood i Aparicio 2000] zaproponował, aby w przypadku oceny stabilności oliwy z oliwek kierować się wzrostem obu wspomnianych markerów opierając się na stosunku stężeń heksanal do nonanal [Jimenez i in., 2004]. Heksanal powstaje w trakcie procesu utleniania kwasu linolowego i linolenowego, natomiast nonanal powstaje jako produkt utleniania kwasu oleinowego.

Badania nad innymi olejami roślinnymi prowadzili także badacze węgierscy Keszler, Heberger i Gude (olej słonecznikowy) [Keszler i in. 1998; Keszler i Heberger 1998] oraz grupa prof. Jelenia z Poznania (olej rzepakowy) [Jeleń i in. 2000; Jeleń i in. 2007]. Badali oni lotne produkty utleniania olejów roślinnych z zastosowaniem na etapie przygotowania próbek do analiz (izolacja analitów) opracowanej w latach 90-tych ubiegłego wieku przez prof. Pawliszyna metody mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej do fazy stacjonarnej [Arthur i Pawliszyn 1990]. Technikę tę połączyli z analizą chromatograficzną z detekcją przy pomocy spektrometru mas. Wśród zidentyfikowanych produktów utleniania obok heksanal i nonanal znalazł się m. in. również *trans*-non-2-enal, zaproponowany przez wspomnianych badaczy, jako potencjalny marker procesu utleniania. Metody analizy frakcji lotnej produktów utleniania są szybkie i odpowiednie do rutynowych analiz wielu próbek. Nie wymagają one również stosowania rozpuszczalników organicznych ani pracochłonnego etapu przygotowywania próbek do analizy [Richards i in. 2005].

Opierając się na badaniach Choe i Mina dotyczących mechanizmów utleniania kwasów tłuszczowych wiadomo, że zarówno heksanal jak i *trans*-non-2-enal powstają w procesie utleniania kwasu linolowego. Na etapie tworzenia rodników alkoksylowych ze wspomnianego kwasu powstaje rodnik kwasu 9-linolowego i kwasu 13-linolowego [Choe i Min 2006]. Z tego pierwszego, na skutek dalszych przemian powstają heptanal, nona-2,4-dienal, *trans*-hept-2-enal oraz *trans*-non-2-enal, natomiast z rodnika kwasu 13-linolenowego powstaje pentanal, kwas pentanowy, heksanal i kwas heksanowy [Keszler i in. 2000].

Opierając się na powyższych doniesieniach w niniejszej pracy jako marker procesu utleniania olejów roślinnych przyjęto stosunek stężeń heksanal do *trans*-non-2-enalu, a w przypadku statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej stosunek stężeń heksanal do nonanal.

4.2 Wybrane metody izolacji, oznaczania i identyfikacji związków lotnych

Niektóre techniki analityczne stosowane w analizie olejów roślinnych wymagają dodatkowo specjalnego etapu przygotowania próbek [Camel 2002]. Jest to szczególnie ważny etap, gdyż poszczególne operacje związane z przygotowaniem próbki nie mogą prowadzić do zmian w jej składzie (procesy utleniania, rozpadu, wprowadzanie zanieczyszczeń, zmiana proporcji poszczególnych składników). Muszą również zapewnić jak najlepszy odzysk analizowanych składników z matrycy próbki i nie wprowadzać substancji interferujących. Techniki te powinny również umożliwić uzyskanie reprezentatywnej próbki do dalszych analiz [Wilkes i in. 2000].

W przypadku technik chromatograficznych ze względu na fakt, iż inne związki analizuje się z zastosowaniem chromatografii gazowej (substancje lotne, średnio lotne), a inne w przypadku chromatografii cieczowej, dlatego też stosuje się różne techniki na etapie przygotowania próbek [Pawliszyn 2003; Romanik i in. 2007; Sikorska i in. 2004; Sikorska i in. 2005]. W przypadku analizy związków lotnych przeprowadzanej techniką chromatografii gazowej często nie jest w ogóle potrzebny etap przygotowania próbki, a związki lotne wprowadza się bezpośrednio do kolumny chromatograficznej przy pomocy strzykawki lub odpowiedniego dozownika. Jednak w przypadku bardziej skomplikowanej matrycy wymagane są odpowiednie zabiegi umożliwiające analizę konkretnych grup związków.

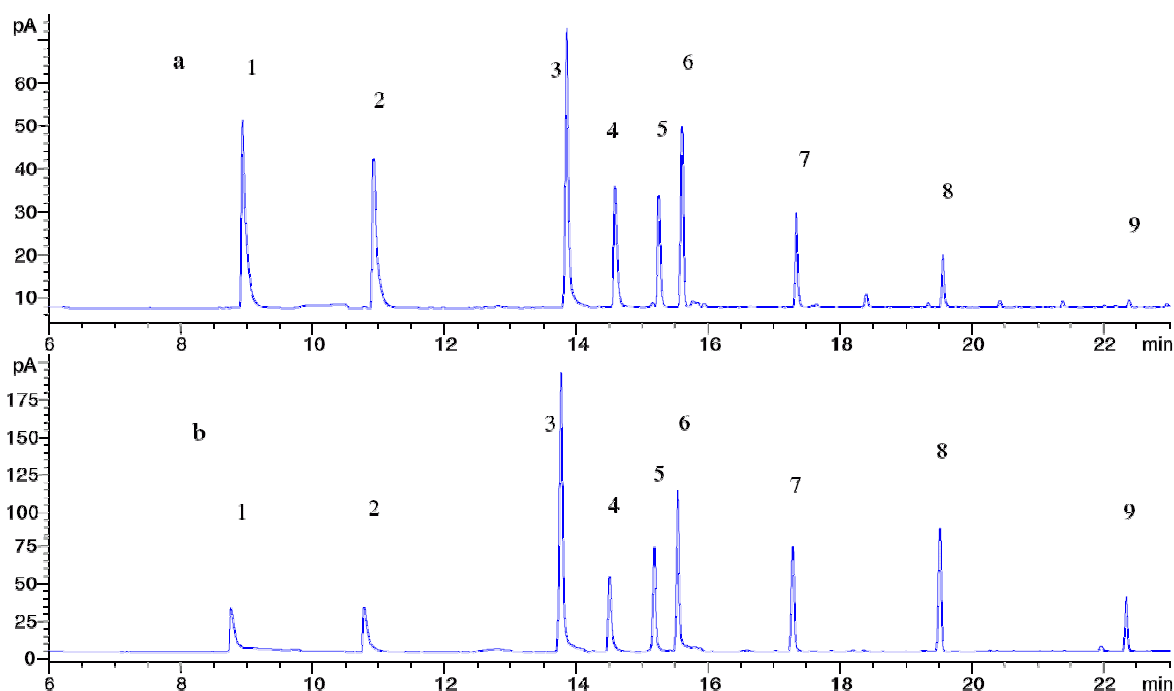
4.2.1 Analiza fazy nadpowierzchniowej (HSA)

Analiza fazy nadpowierzchniowej (HSA) jest metodą szybką, uniwersalną, czułą, bez konieczności stosowania rozpuszczalników i ekonomiczną. Bardzo dobrze nadaje się do przygotowania próbek do analizy chromatograficznej [Michulec i Wardencki 2004]. Może być przeprowadzona zarówno w warunkach statycznych (*static headspace*) jak i dynamicznych (*dynamic headspace*). Statyczna analiza fazy nadpowierzchniowej oparta jest na analizowaniu fazy gazowej będącej w fazie równowagi z próbką. Dynamiczna analiza fazy nadpowierzchniowej, często nazywana również techniką wypłukiwania z jednoczesnym wychwytywaniem analitów (PT) polega na wzbogaceniu lotnych składników w „zimnej” pułapce lub na złożu/medium zatrzymującym anality w odpowiedniej pułapce poprzez ciągłe zbieranie analitów przy pomocy przepływającego nad matrycą gazu obojętnego [von Loon i in. 2005; Plutowska i Wardencki 2007]. Jako pułapek najczęściej używa się poddanych kondycjonowaniu następujących złóż: Carbotrap-300, Tenax-TA lub Charcoal [Kanavouras i in. 2005; Zunin i in. 2004]. Przystawkę z sorbentem najczęściej łączy się z chromatografem

gazowym połączonym ze spektrometrem mas (MS) lub detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) [Povolo i Contarini 2003].

Jest to metoda, którą z powodzeniem można wykorzystać w analizie lotnych składników olejów jadalnych celem określenia stopnia ich oksydatywnej stabilności jak i czystości lub ewentualnego zafałszowania przez inne tłuszcze [Kolb 1999]. Metoda ta zapewnia możliwość skutecznego wykrywania pozostałości rozpuszczalników organicznych wykorzystywanych niekiedy w procesie ekstrakcji lipidów z ziarna [Michulec i Wardencki 2004].

Do identyfikacji zafałszowań w oliwie z oliwek Lorenzo zastosował metodę HS-MS, która umożliwia rozróżnianie skomplikowanych mieszanin lotnych składników. Proponowany układ jest szybszy niż tradycyjne układy chromatografii gazowej. Dodatkowo nie wymaga on wcześniejszego przygotowania próbki ani stosowania rozpuszczalników organicznych [Lorenzo i in. 2002a; Lorenzo i in. 2002b]. Podobnie do monitorowania autooksydacji oleju rzepakowego Jeleń zastosował technikę HS-SPME połączoną również bezpośrednio ze spektrometrem mas bez konieczności rozdzielania lotnych składników przy pomocy chromatografu gazowego [Jeleń i in. 2007]. W oznaczaniu lotnych składników olejów jednak najbardziej popularne jest klasyczne połączenie techniki SPME z chromatografią gazową. Na rysunku 8 przedstawiono porównanie wyników uzyskanych stosując metodę analizy fazy nadpowierzchniowej i mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME). Obie metody charakteryzują się podobną czułością, na rysunku obserwujemy bowiem taką samą liczbę rozdzielonych pików. Jednak w przypadku metody SPME obserwujemy dłuższe, węższe i lepiej rozdzielone piki co dowodzi, że technika ta charakteryzuje się wyższą selektywnością, sprawnością i rozdzielczością w porównaniu z HSA.



Rys. 8. Porównanie metody statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej (static headspace, HSA) (a) i mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) (b), na przykładzie analizy lotnych związków w oleju roślinnym [Doleschall i in. 2001]. Wyniki uzyskano stosując chromatografię gazową ze spektrometrem mas; kolumna HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m). Warunki HSA: próbka podgrzana do 80 °C przez 45 min, dozowano 100 μ l fazy nadpowierzchniowej; warunki SPME: włókno PDMS 100 μ m, ekstrakcja w fazie nadpowierzchniowej, ekstrakcja przez 45 min w 80 °C, desorpcja 5 min w 250 °C. Piki: 1- heksanal, 2- 2-*trans*-heksenal, 3- α -pinen, 4- 2-*trans*-heptenal, 5- pentyl furan, 6- 1-okten-3-ol, 7- 2-*trans*-oktenal, 8- 2-*trans*-nonenal, 9- 2,4-dekadienal.

4.2.2 Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)

Mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej wprowadzono jako alternatywę do dynamicznej analizy fazy nadpowierzchniowej. Ta szybka metoda nie wymagająca rozpuszczalników została opracowana przez Arthura i Pawliszyna [Arthur i Pawliszyn 1990; Pawliszyn 1997]. Zasada tej techniki opiera się na procesie sorpcji analitu na włóknie z krzemionki (fused silica) pokrytym warstwą polimeru, a następnie ich desorpcji w gorącym dozowniku chromatografu gazowego. Istnieją dwa sposoby ekstrakcji analitu w technice SPME: ekstrakcja z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) i ekstrakcja przez bezpośrednie zanurzenie włókna w próbce analitu (DI-SPME) [Stashenko i Martinez 2004]. W HS-SPME włókno jest wystawione na bezpośrednie działanie fazy nadpowierzchniowej nad gazową, ciekłą lub stałą próbką. W przypadku oznaczania lotnych składników ze skomplikowanej matrycy, przy pomocy chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas najodpowiedniejszym trybem ekstrakcji jest ekstrakcja z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME). Włókno jest umieszczane w fazie gazowej nad ciekłą lub stałą próbką i nie ma bezpośredniego kontaktu z próbką, dzięki czemu włókno wykazuje dłuższy okres życia.

Dodatkowo znacznie skrócony jest czas ekstrakcji, a ryzyko zanieczyszczenia przez inne składniki próbki jest znikome w porównaniu z techniką wymywania z jednoczesnym wychwytywaniem (PT) [Kalua i in. 2006].

W przypadku ekstrakcji analitu w trybie bezpośrednim (DI-SPME), włókno jest bezpośrednio umieszczane w próbce, co prowadzi do znaczącego skrócenia jego czasu życia. Tryb DI-SPME zapewnia natomiast lepszą czułość niż tryb HS-SPME w przypadku analitów o mniejszej lotności. Jednak tryb HS-SPME wykazuje mniejsze tło niż DI-SPME i jest bardziej odpowiedni dla ekstrakcji bardziej lotnych analitów w większości gazowych, ciekłych i stałych próbek [Kataoka i in. 2000].

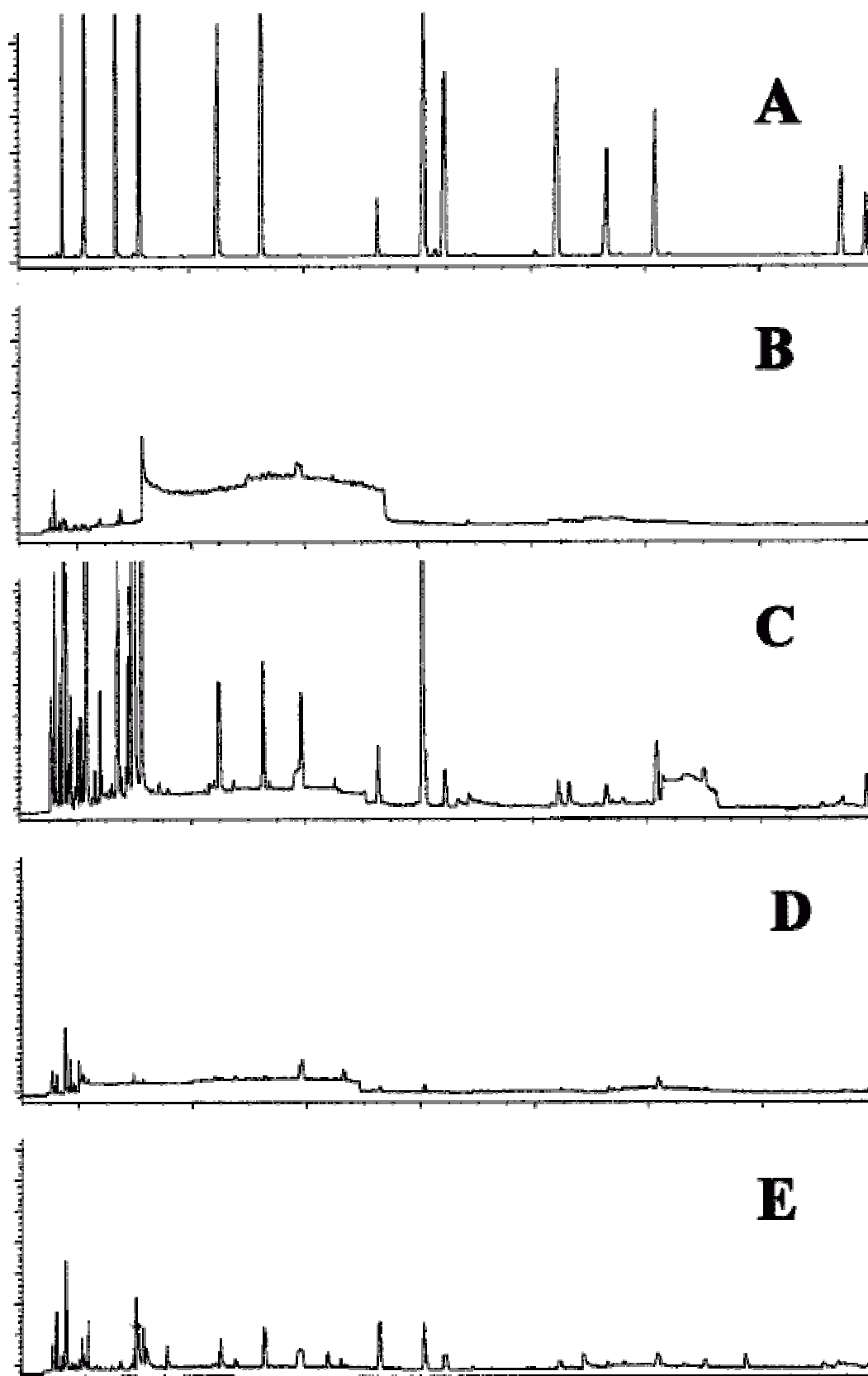
Jednakże technika SPME oprócz wielu zalet ma również ograniczenia. Istnieją trudności z porównaniem wyników uzyskanych przez ekstrakcję na różnych typach włókien. Problematyczne jest też określenie wydajności włókna i czasu jego zużycia. Sygnał generowany przez lotne składniki z konkretnego włókna dryfuje wraz ze stopniem zużycia włókna z uwagi na zmniejszenie pojemności sorpcyjnej [Kalua i in. 2006].

Technikę ekstrakcji do fazy stacjonarnej łączy się zazwyczaj z chromatografią gazową i różnego rodzaju detektorami. Najpopularniejszym jest spektrometr mas, dzięki któremu można zidentyfikować lotne składniki analizowanych próbek. Stosując odpowiednie substancje wzorcowe i wykorzystując detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) na podstawie czasów retencji i pola powierzchni pików można zarówno zidentyfikować, jak i oznaczyć badane związki [Mildner-Szkudlarz i in. 2003]. W przypadku lotnych związków siarki można zastosować detektor płomieniowo-fotometryczny (FPD), a także sprzężony zestaw GC ze spektrometrem mas z pułapką jonową (HS-SPME-GC-IT-MS) [Kataoka i in. 2000].

SPME jest łatwą do praktycznego zastosowania techniką izolacji lotnych składników próbek olejów roślinnych. Poprzez oznaczenie całkowitej ilości lotnych produktów degradacji lipidów można scharakteryzować zarówno surowy jak i rafinowany olej [Lee i in. 2007b]. 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 [Biswas i in. 2004; Doleschall i in. 2001; Mildner-Szkudlarz i in. 2003].

Korzystanie z techniki SPME wymaga doboru odpowiednich warunków ekstrakcji: czasu, temperatury, szybkości mieszania, a przede wszystkim właściwego włókna (Rys. 9.) [Zhou i in. 2007]. Gruba powłoka włókna jest bardziej efektywna w przypadku ekstrakcji mniej lotnych składników z matrycy próbki, ale im grubsza warstwa sorbentu na włóknie tym

dłuższy czas desorpcji, a tym samym istnieje możliwość przenoszenia analitów do następnej ekstrakcji [Wardencki i in. 2004]. Na podstawie badań Jelenia i Kalua najbardziej odpowiednim włóknem do ekstrakcji w fazie nadpowierzchniowej lotnych związków pochodzących z próbek olejów roślinnych jest włókno pokryte polimerem sieciowanym diwinylobenzen/karboksen/polidimetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS). Podobne wnioski płyną z badań dotyczących analizy związków lotnych w próbkach oliwy z oliwek przeprowadzonych przez Vichy oraz Cavalli [Cavalli i in. 2003; Vichy i in. 2003]. Włókna zawierające mieszaną fazę sorpcyjną z DVB są odpowiednie do analizy lotnych składników ponieważ zmniejszają dyskryminację składników spowodowaną różnicą mas cząsteczkowych. Włókno pokryte sorbentem CAR wykazuje dużą czułość w stosunku do małych lotnych cząsteczek, podczas gdy PDMS charakteryzuje się wysoką czułością wobec składników niepolarnych [Dolleschall i in. 2002, Dolleschall i in. 2003]. Zastosowanie mieszanego włókna DVB/CAR/PDMS zapewnia szeroki liniowy zakres stężeń analizowanych składników i niską granicę wykrywalności, co sprawia że jest ono najlepsze z dotychczas dostępnych komercyjnie włókien do analizy lotnych składników olejów roślinnych, takich jak oliwa z oliwek czy olej rzepakowy [Jeleń i in. 2000; Kalua i in. 2006; Mildner-Szkudlarz i in. 2003].



Rys. 9. Porównanie chromatogramów próbek rafinowanego oleju rzepakowego z dodatkiem 10 µg/l poszczególnych wzorców uzyskanych techniką SPME/GC-MS z zastosowaniem różnych włókien: (A) chromatogram wzorców, (B) włókno PA, (C) włókno DVB/CAR/PDMS, (D) włókno PDMS, (E) włókno CW/DVB [Jeleń i in. 2000].

4.2.3 Techniki analityczne stosowane w analizie olejów - chromatografia gazowa i cieczowa

Najbardziej popularnymi i najczęściej stosowanymi technikami w analizie olejów roślinnych, są chromatografia gazowa i cieczowa z różnymi wariantami detekcji. Często stosuje się również techniki łączone poddając próbki najpierw separacji na poszczególne składniki przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej, a następnie uzyskane frakcje analizuje się przy pomocy chromatografii gazowej [Ruiz-Mendez i Dobarganes 2007]. Wśród detektorów najbardziej popularne są detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) i diodowy (UV-DAD) z uwagi na ich dostępność i cenę, a także spektrometr mas (MS) umożliwiający łatwą identyfikację składników analizowanej próbki [Destailats i Cruz-Hernandez 2007; Kawai i in. 2007; Sullivan i in. 2009]. Techniki te umożliwiają analizę związków należących do różnych grup przy zastosowaniu jednego aparatu. W tabeli 4 zebrano informacje o technikach chromatograficznych wykorzystywanych do analizy poszczególnych grup składników występujących w różnych olejach roślinnych. Ponieważ nazwy wielu technik analitycznych nie mają jeszcze odpowiedników w języku polskim wyjaśnienia skrótów znajdujące się pod tabelą podano również w języku angielskim.

Tab. 4. Zestawienie informacji literaturowych o technikach chromatograficznych stosowanych w analizie olejów.

Rodzaj oleju	Anality	Zastosowanie	Techniki analityczne	Literatura
olej z orzechów laskowych	skład kwasów tłuszczowych	do oceny rozkładu grup arylowych w triacyloglicerolach	GC/FID	Alasalvar i in., 2003
oleje roślinne	skład kwasów tłuszczowych	do oceny termicznej stabilności olejów	GC/FID	Miraliakbari i in., 2008; Smith i in., 2007; Pereira i in., 2002; Naglic i in., 1997; Allouche i in., 2007; Lisa i in., 2007
olej z orzechów laskowych	sterole	ilościowe i jakościowe oznaczenie steroli	GC/FID	Alasalvar i in., 2003
oleje roślinne	sterole	do oceny stabilności oksydatywnej fitosteroli w olejach	GC/MS	Zhang i in., 2006
oleje roślinne	lotne wodoronadtlenki	do oceny stabilności oksydatywnej	HAS/GC/FID/TCD	Smith i in., 2007
olej sojowy i słonecznikowy	tokoferole	ilościowe i jakościowe oznaczenie tokoferoli	HAS/GC/FID	Warner 2005
oliwa z oliwek	związki lotne	identyfikacja i ilościowe oznaczanie zanieczyszczeń i zafałszowań oliwy	GC/MS	Capote i in., 2007

oleje roślinne	triacyloglicerole, kwasy tłuszczowe	oznaczenie kwasów tłuszczowych w polarnych tłuszczach i triacyloglicerolach	SPE/GC	Giacometti i in., 2002
olej z orzechów laskowych	kwasy tłuszczowe, sterole, alkohole	charakterystyka oleju z orzechów laskowych i porównanie z innymi olejami	GC/FID, TLCxGC/FID	Benitez-Sanchez i in., 2003
oleje roślinne	związki lotne	ilościowe i jakościowe oznaczenie związków lotnych w olejach roślinnych, określenie zmian w ich zawartości w trakcie przechowywania olejów	SPME/GC/MS	Jeleń i in., 2000
oleje roślinne	związki lotne	do szybkiej identyfikacji różnych rodzajów olejów roślinnych i monitoringu zmian zachodzących podczas ich przechowywania	SPME/GC/MS	Mildner-Szkudlarz i in., 2003
oliwa z oliwek	związki lotne	do porównania różnych oliw na podstawie ich lotnych frakcji	SPME/GC/MS/FID	Lizzani-Cuvelier i in., 2007
oliwa extra virgin	związki lotne	w celu porównania technik analitycznych w analizie lotnych frakcji oliwy	SPME/GC/TOF-MS; DSH-TD/GC/MS	Kanavouras i in., 2005
oleje roślinne	policykliczne węglowodory aromatyczne	identyfikacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych w olejach roślinnych	SPME/GCxGC/TOF-MS	Purcaro i in., 2007
oleje roślinne	lotne rozpuszczalniki	wykrywanie pozostałości rozpuszczalników w olejach roślinnych	HAS/GC/FID/EC D; SPME/GC/FID/E CD	Michulec i in., 2004, 2005, 2007
olej z granatowca	kwasy tłuszczowe, fitosterole, TAG	stworzenie widma typu „odcisk palca” w celu rozróżnienia oleju z granatowca od innych olejów roślinnych	GC/MALDI-TOF/MS	Kauffman i in., 2007
olej arganowy	kampesterol	do wykrywania zafałszowań na poziomie analizy zawartości kampesterolu	HPLCxGC/FID	Hilali i in., 2007
olejek bergamotowy	związki lotne	porównanie olejów uzyskanych przy pomocy różnych procedur ekstrakcji	GC/MS	Belisto i in., 2007
oleje roślinne	związki niezmydlające się	analiza różnych grup związków	RPLC-GC/FID	Cortes i in., 2006
oleje roślinne	związki lotne	analiza jakościowa związków lotnych w olejach roślinnych	RPLC-GC/FID; SDE/GC/MS	del Mar Caja i in., 2000
oliwa z oliwek	erytrodiol, uvaol	do oznaczenia zafałszowań oliwy	RPLC-GC	Blanch i in., 1998
oleje roślinne	acyloglicerole, kwasy tłuszczowe, węglowodory, estry alkilowe		ACxHPSECxGC /FID	Ruiz-Mendez i in., 2007

oleje roślinne	TAGs	ilościowa analiza TAG w celu utworzenia „odcisku palca” różnych rodzajów olejów	LCxGC	Janssen i in., 2003
oliwa z oliwek	sterole		TLCxGC	Lopez-Lopez i in., 2008
oleje roślinne	sterole		LCxGC	Senorans i in., 1998; Senorans i in., 1996; Villon i in., 1998
olej z orzechów laskowych	tokoferole		HPLC	Alasalvar i in., 2003
oliwa z oliwek	związki fenolowe	jakościowa i półilościowa analiza, profile fenolowe oliwy	HPLC/UV-DAD	Bonoli i in., 2004; Carrasco-Pancorbo i in., 2007; Gomez-Alonso i in., 2002; Romero i in., 2002
oliwa z oliwek, olej słonecznikowy	fenole, tokoferole, karotenoidy	analiza jakościowa i ilościowa	HPLC/UV-DAD	Allouche i in., 2007; Mancebo-Campos i in., 2007; Mateos i in., 2005; Pellegrini i in., 2001; Pereira i in., 2002
olej arachidowy	związki polarne	analiza różnych klas polarnych związków w olejach roślinnych	HPSEC; GPC	Gomes i in., 1999
olej z owoców acai	fenole	charakterystyka głównych składników fenolowych i ich stabilności	HPLC/MS	Pacheco-Palencia i in. 2008
oliwa z oliwek	tokoferole, fenole	ocena zmian zachodzących w oleju pod wpływem działania wysokich temperatur	HPLC/ detektor fluorescencyjny; HPLC/UV-DAD	Bester i in., 2008
olej dyniowy	tokoferole	ocena zawartości tokoferoli w olejach roślinnych	HPLC/ detektor fluorescencyjny; HPLC/UV-DAD	Gliszczyńska-Świgło i in., 2004
olej słonecznikowy, kukurydziany, oliwa			MLC	Noguera-Orti i in., 1999
oleje roślinne	kwasy tłuszczowe TAGs	ocena składu kwasów tłuszczowych i TAG w olejach roślinnych	HPLC/FID; HPLC/MS	Byrdwell i in., 2001
oleje roślinne	akroleina	wyznaczenie zawartości akroleiny w olejach poddanych działaniu podwyższonej temperatury	LC/PED	Casella i in., 2004
oleje roślinne	estrogen	oznaczanie estrogenu w olejach roślinnych	GPC/LC/MS	Tong i in., 2006

olej z orzechów laskowych	tokoferole, tokotrienole	charakterystyka oleju z orzechów laskowych na tle innych olejów roślinnych	NP-HPLC/MS	Benitez-Sanchez i in., 2003
oleje roślinne		analiza jakościowa, kontrola jakości	TLC/EASI-MS	Haddada i in., 2008

AC	adsorption chromatography	chromatografia adsorpcyjna
DHS-TD	dynamic headspace thermal desorption	dynamiczna analiza fazy nadpowierzchniowej z desorpcją termiczną
EASI	easy ambient sonic-spray ionization	jonizacja z wykorzystaniem ultradźwięków
GPC	gel permeation chromatography	chromatografia żelowa
HPSEC	high-performance size-exclusion chromatography	wysokosprawna chromatografia wykluczania
MLC	micelar liquid chromatography	cieczowa chromatografia micelarna
NP-HPLC	normal phase HPLC	chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz
PED	pulsed electrochemical detector	pulsacyjny detektor chromatograficzny
RPLC	reversed phase liquid chromatography	chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych
SDE	steam destilation – solvent extraction	destylacja z parą wodną połączona z ekstrakcją rozpuszczalnikiem
TAGs	triacylglycerols	triacyloglicerole
TOF-MS	time of flight	spektrometria mas czasu przelotu

II CEL PRACY

Zasadniczym celem rozprawy doktorskiej było opracowanie nowych procedur analitycznych umożliwiających ocenę stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych przy wykorzystaniu wybranych technik instrumentalnych. Następnie należało skorelować opracowane procedury z metodami aktualnie stosowanymi w krajowym przemyśle tłuszczowym. Nowością w podejściu do problemu było połączenie promieniowania UV jako czynnika przyspieszającego utlenienie z techniką SPME/GC na etapie analizy i identyfikacji lotnych produktów utleniania oraz wykorzystanie stosunku stężeń wybranych markerów w celu wyznaczenia krzywej kinetyki utleniania, na podstawie której oznaczano okresy indukcji. Ostatnim etapem prac było opracowanie projektu normy oznaczenia stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych opartej na opracowanej metodyce instrumentalnej.

W badaniach stosowano następujące techniki:

- promieniowanie ultrafioletowe (UV) na etapie przyspieszonego utleniania,
- mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME) i statyczną analizę fazy nadpowierzchniowej (HSA) jako techniki ekstrakcji / izolacji lotnych produktów utleniania olejów, oraz
- kapilarną chromatografią gazową (CGC) na etapie rozdzielania i identyfikacji analitów.

Realizacja przedstawionego celu rozprawy doktorskiej obejmowała następujące cząstkowe zadania badawcze:

- Określenie optymalnych warunków ekstrakcji / izolacji lotnych produktów utleniania olejów roślinnych
 - w przypadku techniki HSA: objętość próbki, temperatura i czas ekstrakcji, objętość dozowanej próbki,
 - w przypadku techniki SPME: objętość próbki, temperatura i czas ekspozycji włókna, temperatura i czas desorpcji,
- Określenie optymalnych parametrów etapu rozdzielania chromatograficznego (dobranie programu temperaturowego, temperatury i trybu pracy dozownika, warunków pracy detektorów (FID, MS)),

- Wyznaczenie parametrów walidacyjnych opracowanych metodyk, w tym: granic wykrywalności i oznaczalności dla poszczególnych analitów, powtarzalności pomiarów, zakresów pomiarowych i zakresów liniowości,
- Określenie optymalnych warunków etapu przyspieszonego utleniania (długość fali promieniowania, moc świetlówek, odległość pomiędzy powierzchnią próbki a źródłem światła, powierzchnia naświetlania i grubość filmu naświetlanego oleju),
- Porównanie opracowanych metodyk pod względem możliwości ich zastosowania, powtarzalności pomiarów, kosztów stosowanej aparatury oraz czasu analizy,
- Porównanie opracowanych procedur z metodami stosowanymi w przemyśle (test przechowalniczy, test termostatowy, oznaczenie liczby nadtlenkowej i anizydynowej, oznaczenie stabilności oksydacyjnej za pomocą aparatu Rancimat, techniki różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz metody manostatycznej),
- Wykorzystanie opracowanych procedur w badaniach próbek rzeczywistych olejów w celu określenia ich stabilności oksydacyjnej, rozróżniania odmian nasion z jakich został wytłoczony dany olej oraz oceny jakości oleju palmowego.

III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1 Materiały do badań

Stosowane do badań różne typy olejów roślinnych przedstawiono w tabeli 5, ponadto na etapie sprawdzenia zastosowań opracowanej metodyki w analizie olejów roślinnych prowadzono badania z próbkami oleju palmowego (6 próbek) dobrej i złej jakości dostarczonymi przez ZT Kruszwica oraz z próbkami nierafinowanych olejów rzepakowych wyłoczonych na Politechnice Gdańskiej z nasion różnych odmian rzepaku (Californium, Carousel, Castelle, Digger, Mercantil, Monolit, Nelson, Smart).

Tab. 5. Oleje roślinne wytypowane do badań

<i>Numer próbki</i>	<i>Nazwa oleju</i>	<i>Rodzaj oleju</i>	<i>Kraj pochodzenia</i>
1	Jedyny	rzepakowy	Polska
2	Bartek	sojowy	Polska
3	Rizi	ryżowy	Tajlandia
4	Giglio Oro	kukurydziany	Włochy
5	Giglio Oro	arachidowy	Włochy
6	Kujawski	rzepakowy	Polska
7	Bartek	rzepakowy	Polska
8	Vita	rzepakowy, słonecznikowy	Polska
9	Oliwier	rzepakowy, słonecznikowy, oliwa	Polska
10	Don Vito	słonecznikowy, oliwa	Polska
11	Oskar	rzepakowy	Polska
12	Olek	rzepakowy	Polska
13	Huile de Colza	rzepakowy	Francja
14	Suriny	ryżowy	Tajlandia
15	Davert	słonecznikowy	Niemcy
16	Vita Corn	rzepakowy	Polska
17	Clearspring	sojowy	UK
18	Rainbow	rzepakowy	Finlandia
19	Koipesol	słonecznikowy	Hiszpania
20	Rainbow	słonecznikowy	Finlandia
21	Koipesabor	oliwa	Hiszpania
22	Kiju	rzepakowy	Finlandia
23	Bartek	słonecznikowy	Polska
24	Perla	sojowy	Włochy

25	Clearspring	sezamowy	UK
26	Zucchi	z pestek winogron	Włochy
27	Brolio	słonecznikowy	Niemcy
28	Dolores	słonecznikowy	Ukraina
29	Karolina	słonecznikowy	Ukraina
30	Zucchi	słonecznikowy	Włochy
31	Fabiola	słonecznikowy	Austria
32	Oleo	rzepakowy	Polska
33	Mazowiecki	rzepakowy	Polska
34	Floriol	rzepakowy	Polska
35	Rapso	rzepakowy	Austria

Dla wytypowanych do badań próbek przeprowadzono charakterystykę składu kwasów tłuszczowych (Tab. 6.).

Tab. 6. Skład procentowy kwasów tłuszczowych badanych olejów roślinnych, najbardziej charakterystyczne kwasy dla danego oleju wyróżniono kolorem; numery próbek zgodne z opisem w tabeli 5

Typ oleju	Nr próbki	Skład procentowy kwasów tłuszczowych [%]											
		C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1
arachidowy	5	1,19	0,99	19,10	0,00	10,97	39,79	27,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
kukurydziany	4	0,00	0,04	11,93	0,11	1,82	29,38	55,16	0,79	0,38	0,22	0,14	0,03
oliwa	21	0,00	0,02	11,45	0,87	3,38	75,48	7,45	0,61	0,39	0,23	0,12	0,00
ryżowy	3	0,02	4,59	19,50	0,19	2,03	39,49	31,44	1,13	0,86	0,47	0,28	0,00
ryżowy	14	0,02	0,32	21,08	0,24	2,03	44,74	29,22	0,84	0,80	0,46	0,26	0,00
rzepakowy	1	0,00	0,16	3,04	0,21	1,17	63,19	19,70	9,64	0,51	1,34	0,32	0,72
rzepakowy	6	0,02	0,04	3,16	0,15	1,10	63,84	19,24	9,71	0,55	1,39	0,29	0,51
rzepakowy	7	0,02	0,07	5,16	0,28	1,84	61,28	20,61	9,34	0,57	0,03	0,30	0,52
rzepakowy	11	0,03	0,08	5,38	0,25	1,82	60,44	20,18	8,73	0,51	1,56	0,24	0,79
rzepakowy	12	0,02	0,08	5,15	0,28	1,89	60,45	20,15	9,51	0,57	1,30	0,30	0,30
rzepakowy	13	0,06	0,03	4,67	0,15	1,45	60,65	21,23	9,59	0,52	1,26	0,30	0,09
rzepakowy	16	0,02	0,07	5,45	0,21	1,94	58,06	22,87	9,47	0,50	1,01	0,30	0,09
rzepakowy	18	0,02	0,07	5,56	0,23	1,62	59,06	21,45	9,74	0,54	1,19	0,33	0,19
rzepakowy	22	0,03	0,07	4,51	0,19	1,92	62,43	19,24	9,16	0,60	1,34	0,32	0,18
rzepakowy	32	0,01	0,06	4,59	0,21	1,73	61,00	19,80	8,67	0,66	1,73	0,41	0,44
rzepakowy	33	0,01	0,06	4,69	0,22	1,81	60,85	19,39	6,99	0,69	1,96	0,41	1,01
rzepakowy	34	0,01	0,06	4,39	0,20	1,88	62,26	18,36	8,73	0,65	1,81	0,36	0,66
rzepakowy	35	0,01	0,05	4,60	0,21	1,80	63,88	18,06	8,29	0,66	1,43	0,37	0,05
rzepakowy i słonecznikowy	8	0,02	0,07	5,31	0,26	0,09	61,55	22,09	8,69	0,84	0,04	0,34	0,69
rzepakowy, słonecznikowy, oliwa	9	0,02	0,07	5,23	0,25	2,00	57,89	23,53	8,24	0,55	1,35	0,35	0,53

		Skład procentowy kwasów tłuszczowych [%]											
sezamowy	25	1,44	0,00	19,39	0,00	11,13	40,22	27,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
słonecznikowy	15	0,01	0,01	5,36	0,01	3,26	26,57	64,06	0,01	0,02	0,02	0,67	0,00
słonecznikowy	19	0,00	0,07	5,91	0,06	3,47	33,82	55,51	0,08	0,25	0,16	0,68	0,00
słonecznikowy	20	0,00	0,06	2,94	0,10	3,46	34,87	57,32	0,19	0,23	0,15	0,66	0,00
słonecznikowy	23	0,02	0,07	6,45	0,09	3,38	27,82	60,49	0,43	0,26	0,21	0,72	0,06
słonecznikowy	27	0,00	0,08	6,32	0,09	3,69	25,11	62,05	0,08	0,29	0,40	0,74	0,01
słonecznikowy	28	0,00	0,08	6,43	0,13	3,81	31,16	54,50	1,65	0,37	0,50	0,76	0,07
słonecznikowy	29	0,01	0,07	6,34	0,09	3,95	27,04	60,33	0,29	0,30	0,27	0,79	0,01
słonecznikowy	30	0,00	0,10	6,61	0,10	4,10	25,37	61,62	0,19	0,30	0,26	0,79	0,00
słonecznikowy	31	0,01	0,07	6,60	0,09	4,11	26,90	60,12	0,14	0,31	0,31	0,83	0,00
słonecznikowy z oliwą	10	1,37	18,44	18,44	0,00	5,35	36,44	38,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
sojowy	2	0,00	0,09	11,74	0,11	3,32	25,56	52,07	5,96	0,33	0,29	0,41	0,11
sojowy	17	1,24	1,29	19,82	0,00	10,45	28,06	31,78	7,35	0,00	0,00	0,00	0,00
sojowy	24	1,68	1,34	23,96	0,00	12,08	34,20	26,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
winogronowy	26	1,17	1,39	20,59	0,00	10,78	31,14	34,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1

2 Odczynniki chemiczne

Stosowane do badań związki wzorcowe, ich stopień czystości i nazwę producenta zestawiono w tabeli 7.

Tab. 7. Substancje wykorzystywane jako wzorce w opracowaniu procedury analitycznej

Nazwa związku	Stopień czystości	Producent
akroleina	95%	Fluka
propanal	97%	Aldrich
propanol	99,5%	Sigma-Aldrich
izobutanol	99,8%	Fluka
butan-2-ol	99,8%	Fluka
pentanal	87%	Fluka
pentanol	99,8%	Fluka
propionian izobutylu	98%	Aldrich
heksanal	97%	Fluka
heptanal	95%	Fluka
dekan	98%	Fluka
oktanal	98%	Fluk
<i>trans</i> -hept-2-enal	96%	Fluka
nonanal	95%	Fluka
dodekan	98%	Fluka
<i>trans</i> -non-2-enal	97%	Aldrich
dekanal	95%	Fluka

Inne stosowane odczynniki i gazy:

- Heksan, GC grade (Merck)
- Chloroform, cz.d.a. (POCH)
- Kwas octowy 99,5%, cz.d.a. (CHEMPUR)
- Jodek potasu, cz.d.a. (CHEMPUR)
- Tiosiarczan sodu, odważka analityczna (POCH)
- Skrobia ziemniaczana, cz. (POCH)
- 2,2,4-trimetylopentan (izo-oktan) (Sigma-Aldrich)
- 4-metoksyanilina (*p*-anizydyna) (Sigma-Aldrich)
- Metanol, cz.d.a. (CHEMPUR)
- Wodorotlenek potasu, cz.d.a. (P.P.H.Stanlab)
- Chlorek tionylu 97% (Sigma-Aldrich)
- Chlorek sodu, cz.d.a. (P.P.H.Stanlab)
- Gazy:
 - gaz nośny – hel (MS, FID)
 - gazy pomocnicze – powietrze i wodór (FID)

3 Aparatura

- Fotoreaktor z dwiema rtęciowymi lampami UV (2 x 6 W) z maksimum emisji przy 254 nm (Cobrabid, Warszawa, Polska)
- Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan, Mannedorf, Szwajcaria)
- Urządzenie do SPME (Supelco)
- Włókna SPME (Supelco)
 - diwinylobenzen/carboksen/polidimetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS)
 - grubość warstwy sorpcyjnej 50/30 μm ,
 - długość warstwy sorpcyjnej 2 cm
- Chromatograf gazowy Autosystem XL firmy Perkin-Elmer wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID)
- Automatyczna przystawka do analizy fazy nadpowierzchniowej Headspace Sampler TurboMatrix HS-16 firmy Perkin-Elmer
- Chromatograf gazowy ze spektrometrem mas Trace DSQ, firmy Thermo Finigan, USA
- Kolumny chromatograficzne:
 - SPB-20 (Supelco) - 20% difenylo / 80% dimetylosiloksan; długość 30 metrów, średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu fazy stacjonarnej 1 μm ,

- DB-23 (Agilent J&W, USA) - 50% cyjanopropylo-metylopolisiloksan; długość 30 metrów, średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu fazy stacjonarnej 0,25 μm ,
- Stabilwax DA (Restek) - 20% difenilo / 80% dimetylosiloksan; długość 30 metrów, średnica wewnętrzna 0,32 mm, grubość filmu fazy stacjonarnej 0,5 μm ,
- Fiolki do analizy fazy nadpowierzchniowej firmy Perkin-Elmer, o objętości 15 ml z membranami uszczelniającymi (PTFE/Silicone) oraz z aluminiowymi kapslami
- Fiolki o objętości 15 ml firmy Supelco, z membranami uszczelniającymi (PTFE/Silicone) oraz plastikowymi nakrętkami
- Manostat (konstrukcja wykonana w Katedrze Chemii Technologii i Biotechnologii Żywności)
- Rancimat 743 (Metrohm AG, Herisau, Szwajcaria)
- Skaningowy kalorymetr różnicowy TA 3000 (Mettler, Szwajcaria)
- Pipety automatyczne Transferpette (Brand) o zakresach 0,5-10 μl , 10-100 μl , 100-1000 μl
- Mieszadło magnetyczne (Corning)
- Termostat elektroniczny (Omnisfera)
- Vortex
- Waga analityczna XP 504 firmy (Mettler Toledo, Warszawa, Polska)

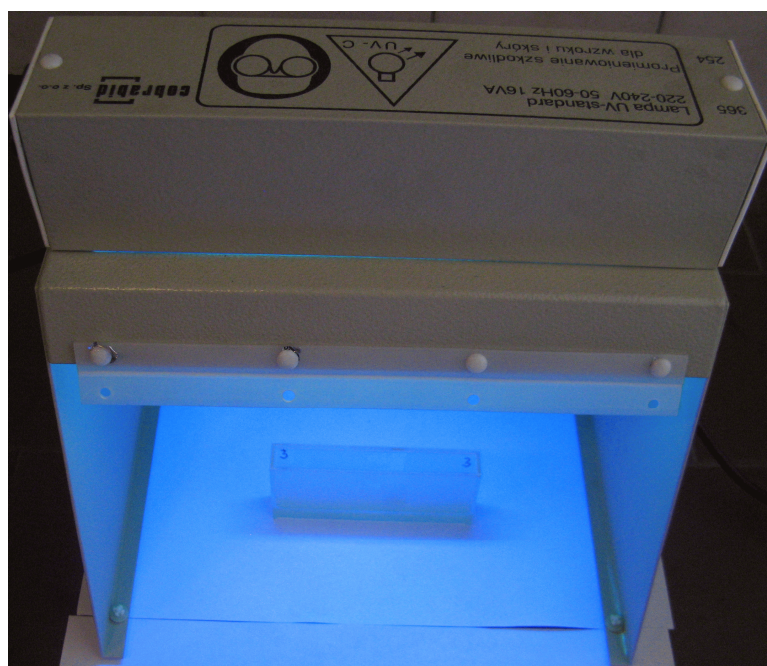
3.1 Szkło laboratoryjne i akcesoria

- Kuwety kwarcowe
- Fiolki do analizy fazy nadpowierzchniowej firmy Perkin-Elmer, o objętości 15 ml z membranami uszczelniającymi (PTFE/Silicone) oraz z aluminiowymi kapslami
- Fiolki o objętości 15 ml firmy Supelco, z membranami uszczelniającymi (PTFE/Silicone) oraz plastikowymi nakrętkami
- Jednorazowe strzykawki medyczne o objętości 10, 20 i 50 ml
- Pipety wielomiarowe o objętości 1, 2, 5, 10, 25 ml
- Kolby szklane ze szlifem i korkiem szklanym (300 ml)
- Kolby miarowe 25 ml i 50 ml
- Probówki wg Eggertza, skalowane, 10 ml, z korkiem
- Naczynka wagowe

4 Metodyka badań

4.1 Warunki naświetlania promieniowaniem UV

W celu przyspieszenia procesu utleniania próbki oleju naświetlano promieniowaniem ultrafioletowym, stosując dwie lampy rtęciowe niskociśnieniowe, każda o mocy 6 W i maksimum emisji przy 254 nm (Cobrabid, Warszawa). Próbka zawierająca 10 ml oleju umieszczana była w kuwecie kwarcowej (Tab. 8) pod lampą (Rys. 10.) i poddawana naświetlaniu przez określony czas (0-24 godzin) w temperaturze pokojowej.



Rys. 10. Widok lampy UV stosowanej w badaniach

Tab. 8. Wymiary kuwety kwarcowych stosowanych w naświetlaniu olejów roślinnych promieniowaniem UV.

Kuweta	Wymiary [cm]	Powierzchnia [cm ²]	Grubość filmu [mm]	Powierzchnia/objętość [cm ² /ml]
A	5 x 7	35	3	3,5
B	4 x 5	20	5	2
C	3 x 5	15	7	1,5
D	1 x 10	10	10	1

4.2 Warunki działania podwyższoną temperaturą – zmodyfikowany test Schaala

W celu przyspieszenia procesu utleniania próbki oleju poddawano działaniu podwyższonej temperatury (80 °C). Próbka zawierająca 10 ml oleju umieszczana była

w zamkniętym naczynku wagowym w cieplarni i podawana działaniu podwyższonej temperatury w ciemności przez określony czas (0 - 24 godzin). W badaniach stosowano nieco wyższe temperatury niż przyjęte dla klasycznego testu Schaala (63 °C) [Szukalska 2003; Wroniak i in. 2006], aby uzyskać efekt utleniania próbki w czasie nie dłuższym niż 24 godziny. Próbkę utleniano w zamkniętych naczynkach aby nie utracić związków lotnych, które następnie poddawano oznaczeniu.

4.3 Warunki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME)

W badaniach ekstrakcji lotnych produktów reakcji utleniania zastosowano włókno pokryte mieszaną fazą diwinylobenzen/ karboksen/ polidymetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS, długość 2 cm, grubość fazy stacjonarnej 50/30 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Próbkę oleju (8 ml) umieszczano w szczelnie zamkniętej fiole (15 ml) i termostatowano w temperaturze 30 °C przez 10 min, następnie w fazie nadpowierzchniowej umieszczano włókno z fazą stacjonarną i prowadzono ekstrakcję w tej samej temperaturze przez 15 min. Próbkę cały czas mieszano przy pomocy mieszadła magnetycznego. Po zakończonym procesie ekstrakcji włókno z zaadsorbowanymi analitami umieszczano w gorącym dozowniku chromatograficznym (250 °C) i termicznie desorbowano przez 4 min [Gromadzka i Wardencki 2008b].

4.4 Analiza chromatograficzna (GC/FID)

Analizy zostały przeprowadzone z zastosowaniem chromatografu gazowego AutoSystem XL (Perkin Elmer) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Gazem nośnym był hel o natężeniu przepływu 1 ml/min, temperatura dozownika i detektora wynosiły 250 °C. Separację analitów przeprowadzono stosując kolumnę SPB-20 z fazą stacjonarną 20 % difenylo/ 80 % dimetylosiloksan (30 m x 0,25 mm x 1 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Analizę przeprowadzano 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) [Gromadzka i Wardencki 2008b].

4.5 Analiza chromatograficzna (GC/MS)

Analizy zostały przeprowadzone z zastosowaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas Trace DSQ firmy Thermo Finigan. Gazem nośnym był hel o natężeniu przepływu 1,5 ml/min. Próbka była dozowana za pomocą włókna SPME w trybie

bez podziału strumienia. Temperatura dozownika wynosiła 250 °C. Detektor pracował w trybie skanowania widma w zakresie 35-350 m/z. Temperatura źródła jonów wynosiła 240 °C, a temperatura linii przesyłowej 250 °C.

Anality rozdzielano w kolumnie chromatograficznej Stabilwax DA (Restek) o długości 30 metrów, stosując program temperaturowy: 40 °C (4 min), następnie przyrost 5 °C/min do 80 °C i kolejny przyrost 10 °C/min do 220 °C (10 min).

4.6 Warunki statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej (HSA)

W badaniach ekstrakcji lotnych produktów reakcji utleniania zastosowano automatyczną przystawkę do analizy fazy nadpowierzchniowej z podajnikiem próbek Headspace Sampler TurboMatrix HS-16 (Perkin Elmer). Próbkę oleju (8 ml) umieszczano w szczelnie zamkniętej fiolce (15 ml) i termostatowano w temperaturze 80 °C przez 20 min, następnie 0,16 ml fazy nadpowierzchniowej wprowadzano do kolumny chromatograficznej.

Analiza chromatograficzna została przeprowadzona z wykorzystaniem tego samego aparatu i tej samej kolumny co w przypadku techniki HS-SPME/GC. Analiza odbywała się z podziałem strumienia (*split*) w stosunku 1:10, temperatura dozownika i detektora wynosiły odpowiednio 170 °C i 230 °C. Program temperaturowy był następujący: 70 °C (1 min), następnie przyrost 6 °C/min do 100 °C i kolejny przyrost 15 °C/min do 250 °C (1 min) [Gromadzka i Wardencki 2010].

4.7 Przygotowanie roztworów wzorcowych

Z otrzymanych od producenta substancji wzorcowych (Tab. 7.) przygotowano roztwory robocze indywidualnych substancji, oraz ich mieszaninę w heksanie (250 µg/ml dla techniki HSA/GC oraz 100 µg/ml dla techniki SPME/GC). Do identyfikacji aldehydów (GC/FID) w matrycy olejowej przygotowano roztwory pojedynczych wzorców (250 µg/ml) poprzez dodanie odpowiedniej ilości roztworu danego związku w heksanie do matrycy olejowej. Jako matrycę olejową zastosowano rafinowany olej rzepakowy zakupiony w supermarkecie.

Wszystkie roztwory wzorcowe i wzorce handlowe trzymano w lodówce w temperaturze 4 °C, aby uniknąć ich degradacji. Niektóre z nich przechowywane były w atmosferze azotu lub argonu. W identycznych warunkach przechowywano próbki oleju.

4.8 Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych

Skład kwasów tłuszczowych w badanych próbkach oleju oznaczono przy pomocy chromatografu gazowego firmy Perkin Elmer wyposażonego w kapilarną kolumnę DB-23 (Agilent J&W), po wcześniejszym przeprowadzeniu kwasów tłuszczowych w lotne pochodne – estry metylowe. Proces estryfikacji przeprowadzono zgodnie z opisaną poniżej procedurą według Polskiej Normy PN-EN ISO 5509. Olej w ilości 0,1 g umieszczano w szklanej ampułce o pojemności 5 ml, dodawano 1 ml roztworu wodorotlenku potasu sporządzonego w bezwodnym metanolu i prowadzono reakcję zmydlania przez 10 min w łaźni glicerynowej w temperaturze 80 °C. Następnie dodawano 2 ml 2% roztworu chlorku tionylu w bezwodnym metanolu i estryfikowano przez 10 min w 80 °C. Po ostudzeniu dodawano do ampułki 2 ml heksanu. Do analiz chromatograficznych pobierano 0,7 µl warstwy heksanowej estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Próbkę dozowano do kolumny w trybie z podziałem strumienia (*split*) w stosunku 1:60. Rozdzielanie chromatograficzne następowało zgodnie z wytycznymi zawartymi w normie PN-EN ISO 5508, w warunkach izotermicznych w temperaturze 180 °C, temperatura dozownika i detektora wynosiły 250 °C. Gazem nośnym był hel o natężeniu przepływu 1 ml/min. Kwasy tłuszczowe identyfikowano na podstawie porównania ich czasów retencji z czasami retencji uzyskanymi dla standardowej mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME, Supelco).

4.9 Oznaczenie liczby nadtlenkowej (PV)

Liczbę nadtlenkową w badanych olejach (świeżych oraz utlenionych) oznaczano zgodnie z Polską Normą PN-EN ISO 3960:2005. Każdą analizę wykonywano w trzech powtórzeniach i do oznaczeń końcowych okresu indukcji wykorzystano wartości średnie obliczone na podstawie wyników trzech pomiarów.

4.10 Oznaczenie stabilności oksydacyjnej metodą Rancimat

Do oznaczeń zastosowano aparat Metronom 743 Rancimat firmy Metronom USA Inc. Oznaczenia wykonano zgodnie z Polską Normą PN-EN ISO 6886 dla 2,5 g próbki oleju w temperaturze 120 °C, przepływ powietrza 20 l/h. Każdą analizę wykonywano w dwóch powtórzeniach. Oznaczenia wykonano w Zakładach Tłuszczowych w Kruszwicy oraz w laboratorium firmy Elstar Oils.

4.11 Oznaczenie liczby anizydynowej (A_nV)

Liczbę anizydynową w badanych olejach (świeżych oraz utlenionych) oznaczano zgodnie z Polską Normą PN-EN-ISO 6885. Każdą analizę wykonano w trzech powtórzeniach i do oznaczeń końcowych wykorzystano wartości średnie obliczone na podstawie wyników trzech pomiarów.

4.12 Oznaczanie stabilności oksydacyjnej metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC)

Do badań zastosowano skaningowy kalorymetr różnicowy TA 3000 (Mettler, Szwajcaria). Próbkę oleju roślinnego (ok. 30 mg) zamykano w aluminiowym tyglu i umieszczano w termostacie kalorymetru razem z próbką odniesienia (pusty tygiel) w temperaturze 120 °C. Przez próbkę przepływał tlen (6 l/h) powodując jej utlenienie.

4.13 Oznaczanie stabilności oksydacyjnej metodą manostatyczną

Próbkę oleju roślinnego (50 g) umieszczano w szklanym naczyniu reakcyjnym i ogrzewano w temperaturze 120 °C. Przez próbkę przepuszczano czysty osuszony tlen (płuczki z wodorotlenkiem potasu i żelazem krzemionkowym). Przez cały czas trwania procesu utleniania próbka była intensywnie mieszana przy pomocy mieszadła mechanicznego (2700 obr/min).

4.14 Test przechowalniczy

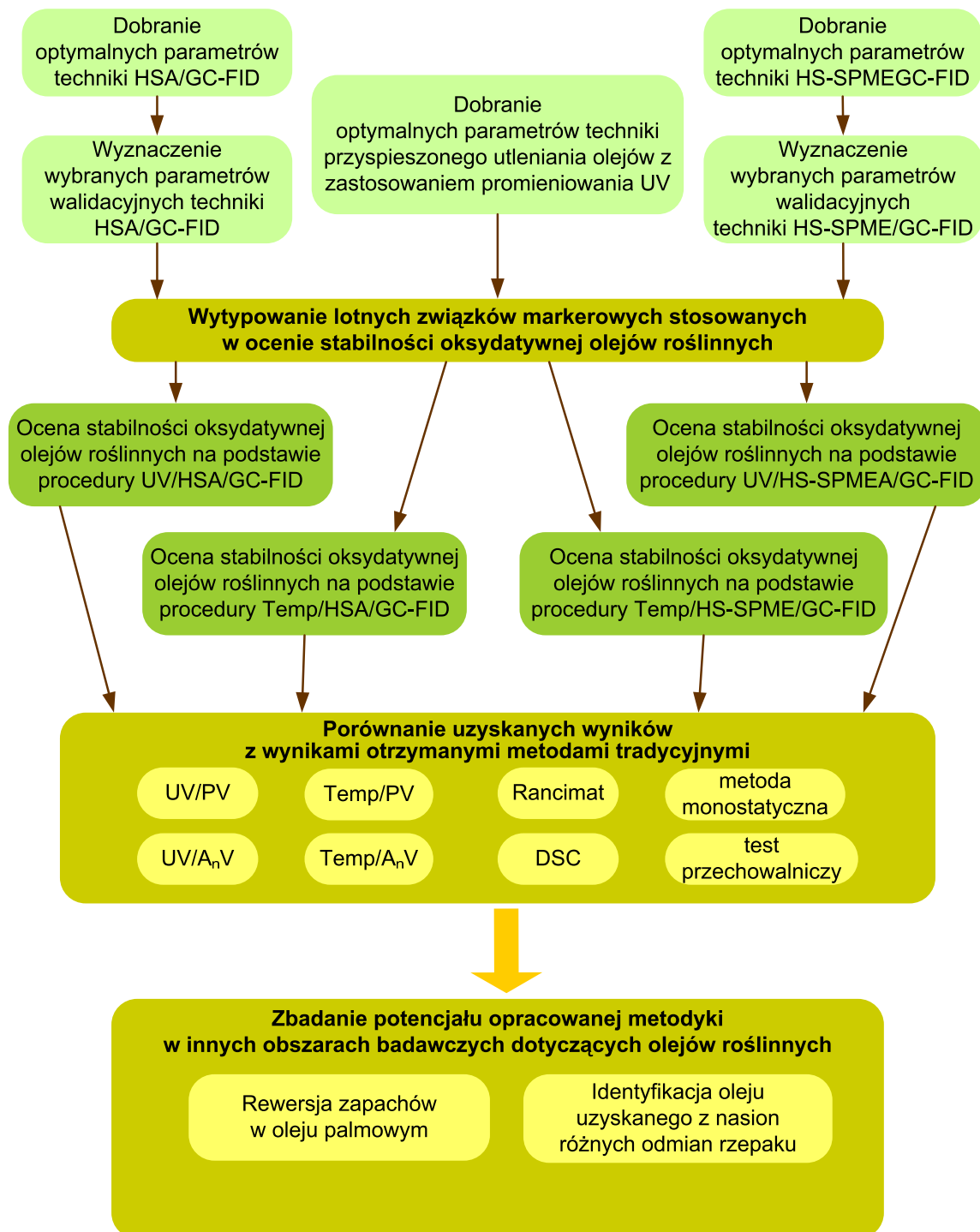
Próbki rafinowanego oleju rzepakowego (8 ml) przechowywano przez okres 24 tygodni w szklanych, szczelnie zamkniętych fiolkach o pojemności 15 ml. Próbki przechowywano w ciemnej szafce bez dostępu światła w temperaturze pokojowej oraz na parapecie okiennym, gdzie olej był wystawiony na działanie promieniowania światła słonecznego oraz światła sztucznego. Co dwa tygodnie pobierano po jednej próbce i zamrażano (-20 °C). Na koniec eksperymentu we wszystkich próbkach oznaczono zawartość liczby nadtlenkowej, a także zawartość aldehydów przy pomocy procedury HS-SPME/GC/FID.

4.15 Obliczenia statystyczne

Uzyskane wyniki analizowano statystycznie, wykonując podstawowe obliczenia, takie jak wartość średnia, odchylenie standardowe oraz współczynnik korelacji. Do obliczeń stosowano program EXCEL 2003.

5 Schemat przeprowadzonych badań

Dla czytelności niniejszej rozprawy etapy przeprowadzonych badań przedstawiono na poniższym schemacie.



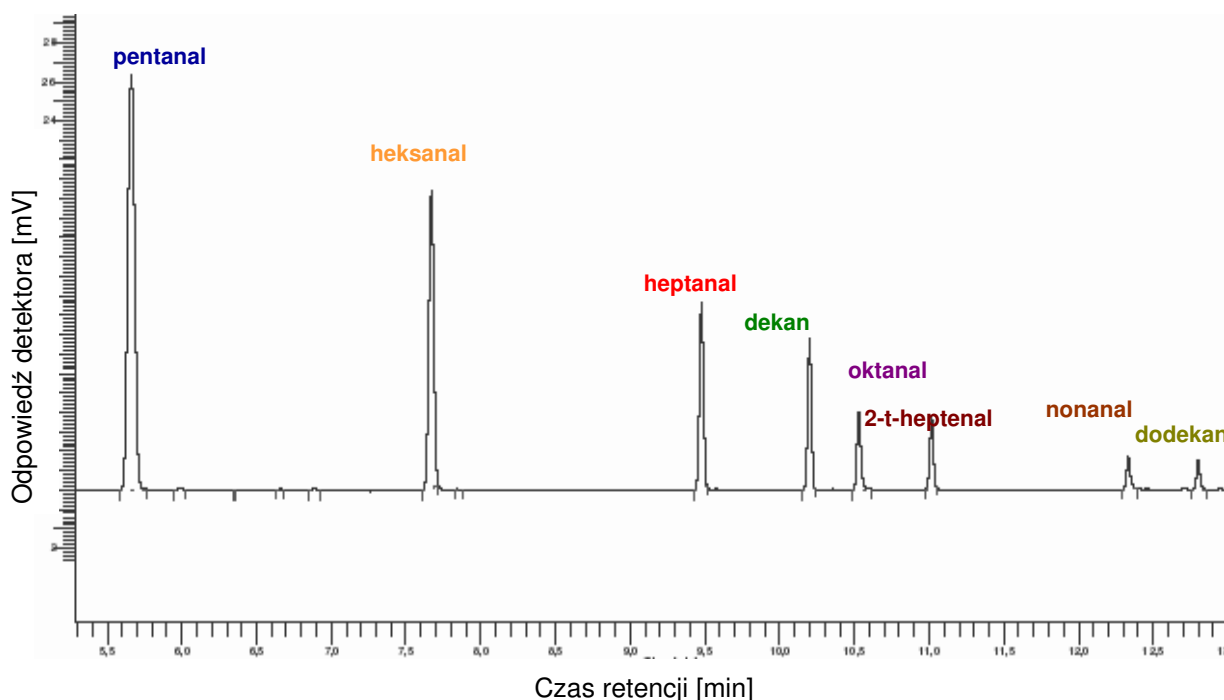
Rys. 11. Schemat badań przeprowadzonych w trakcie realizacji pracy doktorskiej

6 Wyniki badań i dyskusja

6.1 Opracowanie procedury oznaczania związków lotnych techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej (HSA)*

6.1.1 Identyfikacja indywidualnych związków wzorcowych

Pojedyncze roztwory wybranych związków wzorcowych zostały poddane analizie z zastosowaniem techniki statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej. Próbki o objętości 8 ml umieszczano w 15 ml fiolkach. Przed ekstrakcją próbki termostatowano przez 20 minut w temperaturze 80 °C w celu osiągnięcia równowagi pomiędzy fazą ciekłą, a gazową nad jej powierzchnią. Po oznaczeniu czasów retencji poszczególnych analitów, w podobny sposób przeprowadzono ekstrakcję, a następnie rozdzielanie składników próbki, zawierającej wszystkie substancje wzorcowe w mieszaninie o stężeniu 250 ppm. Uzyskany chromatogram przedstawia rysunek 12.



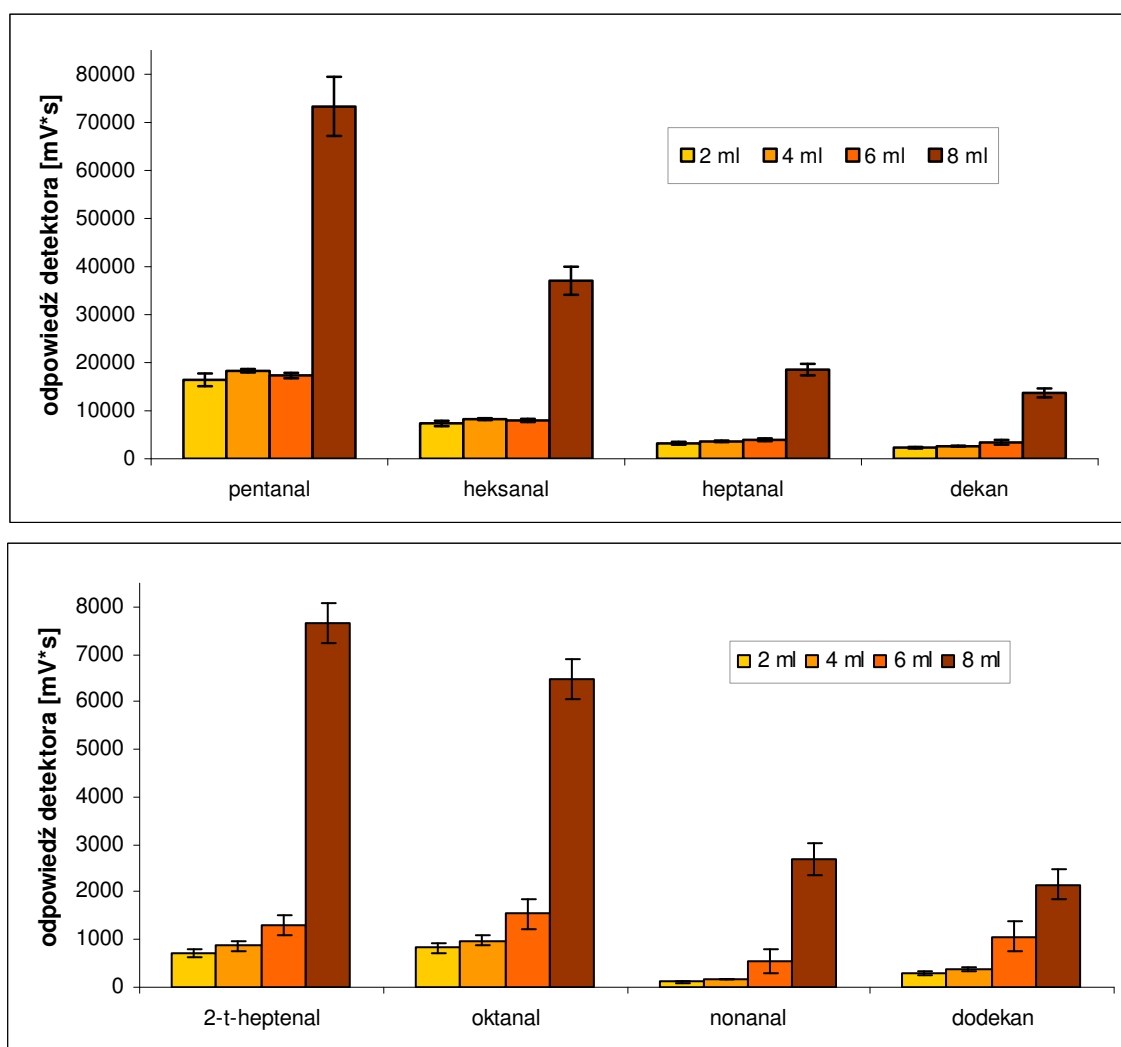
Rys. 12. Chromatogram wybranych substancji wzorcowych w matrycy olejowej; wyniki uzyskano stosując metodę statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej połączoną z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HSA/GC/FID); kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 µm, (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

* Wyniki opublikowane: J. Gromadzka, W. Wardencki, "Opracowanie procedury oznaczania lotnych produktów utleniania olejów roślinnych techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej", *Rośliny Oleiste*, XXX, 1, 103-118, 2009

6.1.2 Dobór warunków ekstrakcji

W celu dobrania optymalnych warunków ekstrakcji na podstawie doniesień literaturowych wybrano parametry wyjściowe (czas i temperaturę ekstrakcji, objętość oleju oraz objętość dozowanej próbki), które kolejno optymalizowano przy stałych wartościach wyjściowych pozostałych parametrów.

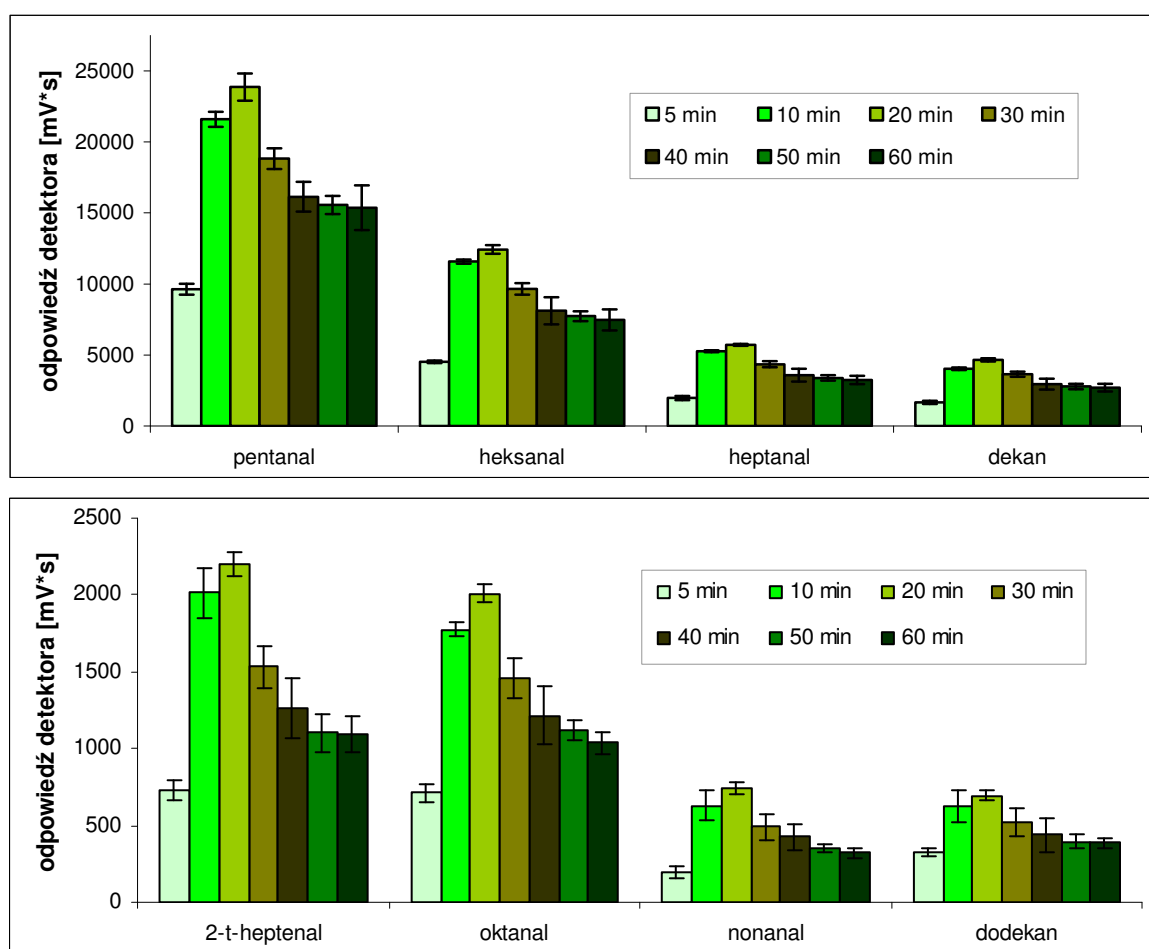
Pierwszym etapem pracy było dobranie optymalnej objętości próbki oleju poddawanej procesowi ekstrakcji. Próbki oleju w objętości 2, 4, 6 i 8 ml umieszczano w 15 ml fiolkach do analizy fazy nadpowierzchniowej, szczelnie zamykano silikonową membraną i aluminiowym kapslem i poddawano procesowi ekstrakcji (80 °C, 30 min). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 13.



Rys. 13. Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji (olej z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiołce, temperatura termostatowania 80 °C, czas termostatowania 30 min, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,1 ml, czas wyrównywania ciśnień 2 min)

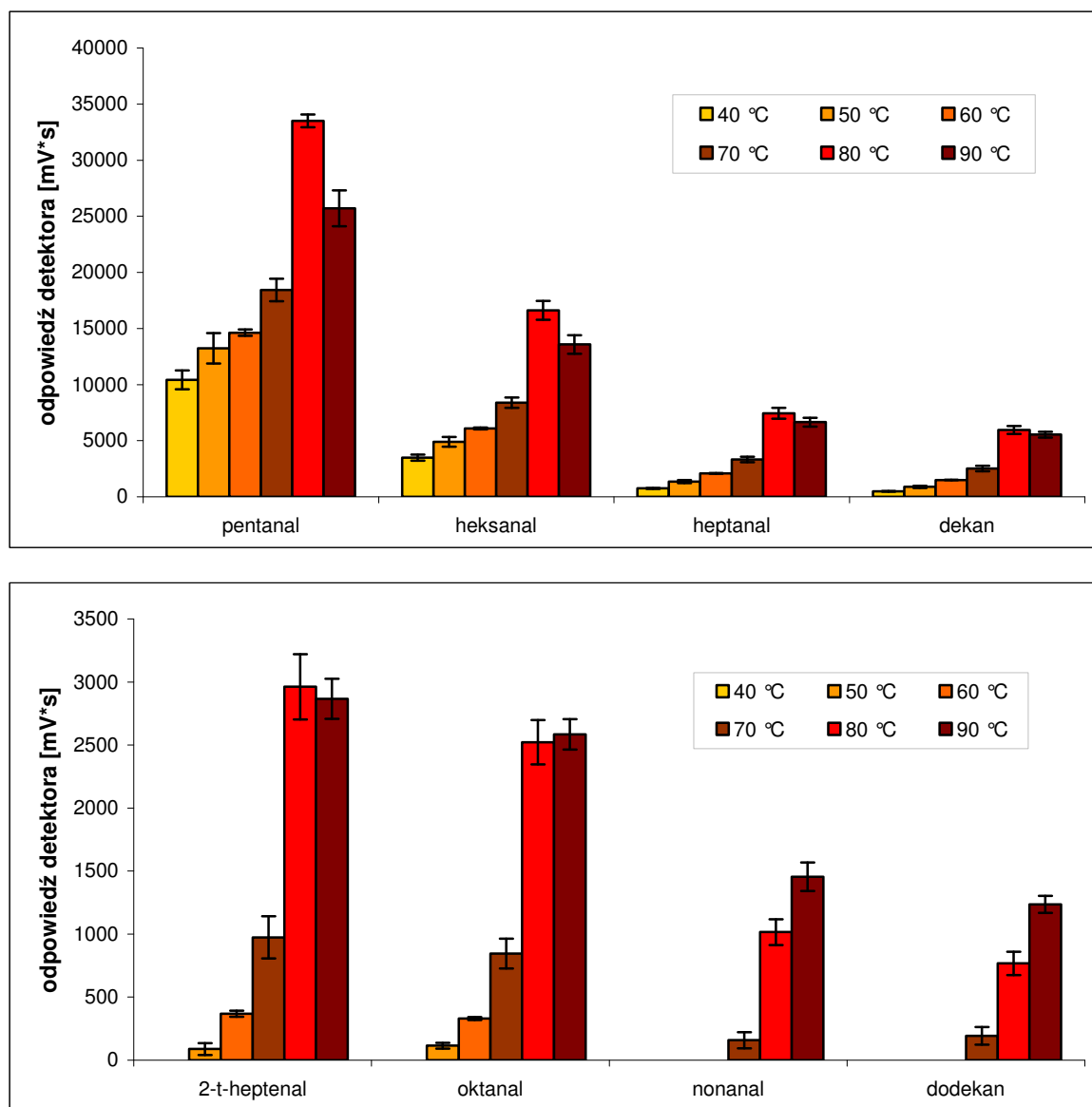
Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji obserwowano na podstawie zmieniającej się powierzchni pików analizowanych związków. W przypadku małych objętości wpływ na wydajność ekstrakcji był niewielki, zarówno w przypadku związków bardziej lotnych jak i mniej lotnych, natomiast gdy objętość próbki zwiększono do 8 ml zaobserwowano kilkakrotny wzrost powierzchni pików dla każdego z badanych związków. Dlatego też, objętość 8 ml oleju uznano jako najbardziej odpowiednią w 15 ml fiołce. Jest to również największa objętość zalecana dla metody analizy fazy nadpowierzchniowej. W metodach tych, bowiem przyjmuje się, że objętość próbki powinna być zbliżona do połowy objętości fiołki ekstrakcyjnej [Supelco Bulletin 923].

Kolejnym etapem doboru optymalnych parametrów procesu ekstrakcji było sprawdzenie wpływu czasu termostatowania na wydajność ekstrakcji. W tym celu próbki oleju zawierające dodatek mieszaniny wzorców termostatowano w 80 °C przez 5 do 60 min (Rys. 14).



Rys. 14. Wpływ czasu termostatowania na wydajność ekstrakcji (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiołce, temperatura termostatowania 80 °C, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,1 ml, czas wyrównywania ciśnienia 2 min)

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



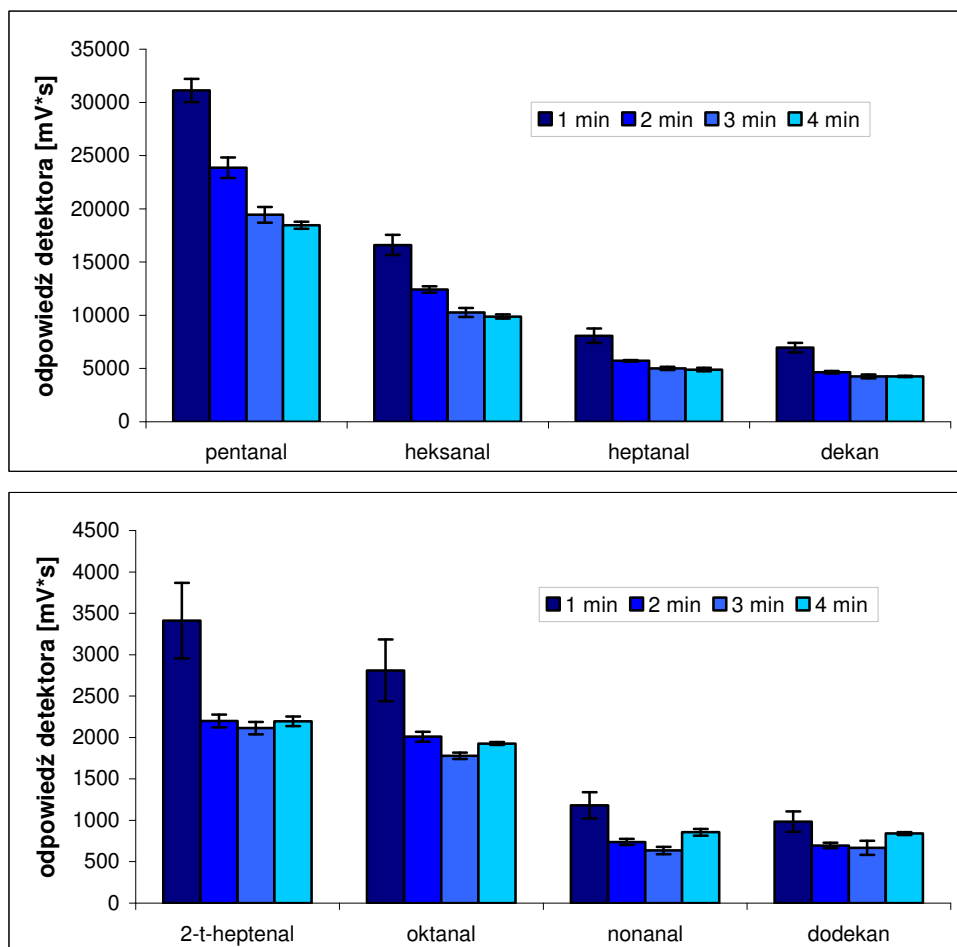
Rys. 15. Wpływ temperatury termostatowania na wydajność ekstrakcji (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiołce, czas termostatowania 30 min, objętość fazy nadpowierzchniowej wprowadzanej do kolumny 0,1 ml, czas wyrównywania ciśnienia 2 min)

Następnie określono optymalną temperaturę termostatowania próbki. Zbadano wydajność ekstrakcji w temperaturach od 40 °C do 90 °C, stosując standardową procedurę. 8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm umieszczano w 15 ml fiołce i przeprowadzano termostatowanie próbki przez 30 min w kolejnych badanych temperaturach (Rys. 15).

Jak wynika z powyższego rysunku, wzrost temperatury ekstrakcji wpływa na zwiększenie wydajności ekstrakcji. Jednak wzrost temperatury znacząco wpływa także na wzrost produktów utleniania w tłuszczach. 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.

Dodatkowo, z uwagi na powstawanie w wyższych temperaturach większej ilości różnorodnych lotnych produktów rozkładu termicznego olejów roślinnych zmienia się równowaga dynamiczna pomiędzy związkami lotnymi znajdującymi się w próbce oleju a tymi samymi związkami w fazie nadpowierzchniowej. Jako najbardziej optymalną wybrano temperaturę 80 °C.

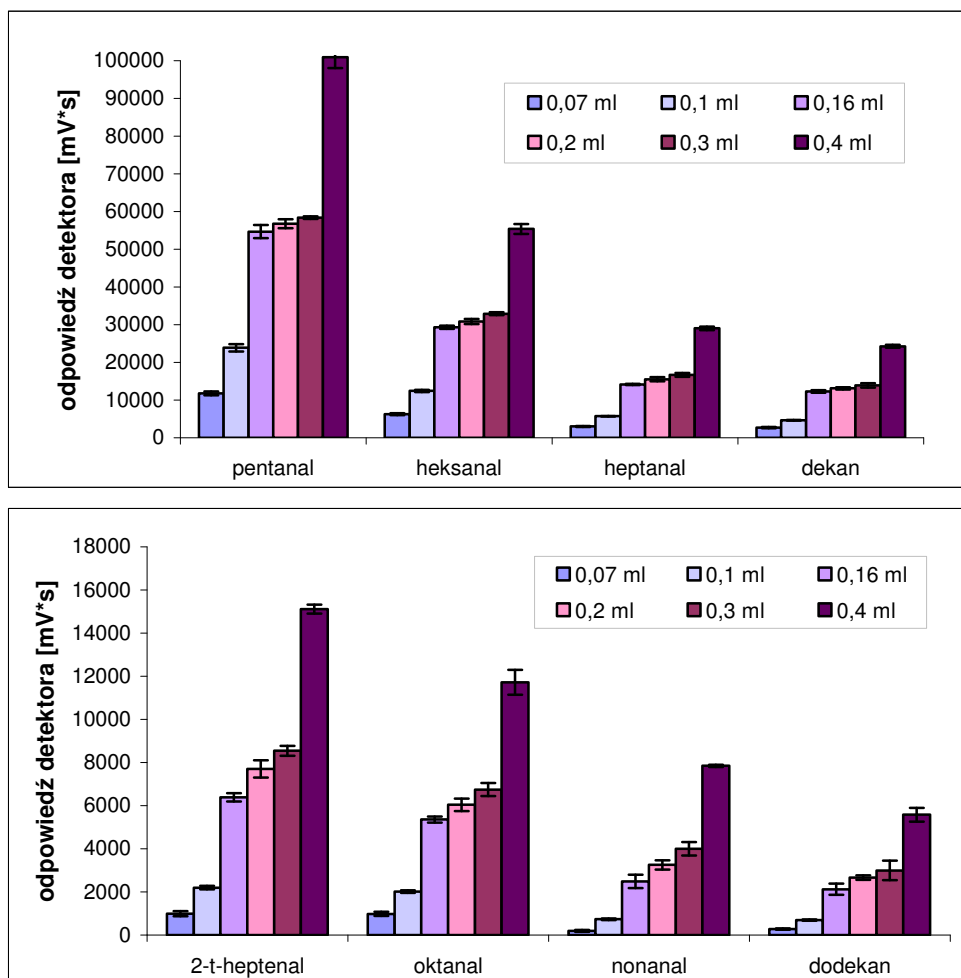
W dalszej kolejności zbadano wpływ czasu wyrównywania ciśnień na wydajność ekstrakcji badanych analitów. Etap ten następuje tuż przed zadozowaniem składników fazy nadpowierzchniowej do kolumny. Najpierw następuje przebicie szczelnej membrany i wprowadzenie przy pomocy igły gazu nośnego, który umożliwia wyrównanie ciśnienia panującego we fiolce z analitami i w kolumnie chromatograficznej. Zbadano zachowanie się analitów w przedziale trwania tego etapu od 1 do 4 minut. Uzyskane wyniki ilustruje rysunek 16.



Rys. 16. Wpływ czasu wyrównywania ciśnień na wydajność ekstrakcji (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)

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

Dalszym etapem dobierania optymalnych warunków prowadzenia procesu było wyznaczenie objętości fazy nadpowierzchniowej dozowanej do kolumny. Zbadano zakres o objętości od 0,07 do 0,4 ml (Rys. 17). Wraz ze wzrostem objętości fazy nadpowierzchniowej dozowanej do kolumny wzrasta powierzchnia pików badanych substancji, jednak zbyt duża ilość zadozowanej fazy powoduje, iż uzyskane na chromatogramie piki stają się niesymetryczne i rozmyte. Pojawia się również ogonowanie pików. Dlatego zdecydowano, że najbardziej optymalną ilością fazy nadpowierzchniowej dozowanej do kolumny jest objętość 0,16 ml.



Rys. 17. Wpływ objętości fazy nadpowierzchniowej na wydajność ekstrakcji (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 250 ppm w 15 ml fiołce, czas termostatowania 30 min, temperatura termostatowania 80 °C, czas wyrównywania ciśnień 2 min)

W wyniku tego etapu ustalono parametry ekstrakcji (Tab. 9), które stosowano w dalszym etapie badań oraz przy przeprowadzaniu elementów walidacji metody.

Podobne badania prowadził Frankel, który próbki oleju poddawał termostatowaniu w 100 °C lub nawet 180 °C przez 10 min. Było to jednak podejście uproszczone, które służyło jedynie izolacji heksanal z fazy nadpowierzchniowej [Frankel i in., 1994; Warner i in., 1989]. Również Gordon w swoich badaniach nad zmianą składu fazy nadpowierzchniowej w trakcie procesu utleniania stosował technikę HSA, a próbki oleju termostatował przez jedną godzinę w 180 °C [Gordon i in., 1994]. Prezentowana w niniejszej pracy procedura umożliwia w podobnym czasie analizę lotnych produktów utlenienia, ale izolowanych w zdecydowanie niższej temperaturze. Dzięki obniżeniu temperatury minimalizuje się niebezpieczeństwo rozkładu niektórych mniej stabilnych termicznie związków.

Tab. 9. Optymalne warunki ekstrakcji związków lotnych w olejach roślinnych techniką HSA

Parametr ekstrakcji	Wartość optymalna
Objętość próbki	8 ml w 15 ml fiołce
Czas termostatowania	20 min
Temperatura termostatowania	80 °C
Czas wyrównywania ciśnień	1 min
Objętość fazy nadpowierzchniowej	0,16 ml
Podział strumienia	1:10

6.1.3 Wyznaczenie wybranych parametrów walidacyjnych

Kolejnym krokiem po dobraniu optymalnych parametrów metody jest wyznaczenie parametrów walidacyjnych. Jest to etap szczególnie istotny, gdyż pozwala określić m.in. powtarzalność metody i granicę oznaczalności. Aby wyznaczyć powtarzalność, a także granicę wykrywalności i oznaczalności przeprowadzono badania roztworów substancji wzorcowych rozpuszczonych w olejowej matrycy próbki. Podobnie jak poprzednio, zgodnie z opracowaną procedurą ekstrakcji do 8 ml oleju dodawano mieszaninę wzorców o stężeniu 1 – 250 pmm, a następnie całość umieszczano w 15 ml fiołce. Ekstrakcję prowadzono w zoptymalizowanych warunkach (20 min w 80 °C).

W opracowanej przez autora rozprawy metodzie 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 10. Miarą zależności między badanymi zmiennymi jest współczynnik regresji określa. 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.

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.

Tab. 10. Równania krzywych kalibracyjnych i współczynników regresji dla badanych związków techniką HSA/GC/FID

Związek	Zakres liniowości [ppm]	Równanie krzywej	Współczynnik regresji
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
heksanal	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
dekan	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
oktanal	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
dodekan	90 – 187,5	$y = 0,9296x - 41,047$	0,9800
	187,5 - 375	$y = 2,2784x - 292,05$	0,9961

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

$$\text{LOD} = 3,3 \times s/b,$$

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 analitu, na podstawie których wyznaczono krzywą kalibracyjną,

Y_i – wartości sygnałów dla danych zawartości analitu obliczone na podstawie uzyskanej krzywej kalibracyjnej,

n – liczba roztworów wzorcowych stosowanych do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej.

Natomiast dla granicy oznaczalności przyjęto trzykrotną wartość granicy wykrywalności:

$$\text{LOQ} = 3 \times \text{LOD}$$

Obliczone granice wykrywalności i oznaczalności dla wybranych substancji wzorcowych przedstawiono w tabeli 5, w której umieszczono również wartości powtarzalności metody. (rozrzut uzyskanych wyników wokół wartości średniej). Jej miarą jest odchylenie standardowe rozumiane jako współczynnik zmienności:

$$CV = RSD \times 100\% = (SD/\text{średnia}) \times 100\%,$$

gdzie RSD – względne odchylenie standardowe,

SD – odchylenie standardowe

Porównując uzyskane wartości powtarzalności i granic oznaczalności (Tab. 11.) z danymi literaturowymi dla stosowanej techniki przygotowania próbek można je uznać za zadowalające [Keszler i in. 1998].

Tab. 11. Powtarzalność metody (CV), granice oznaczalności i wykrywalności (LOD i LOQ) dla wybranych substancji wzorcowych w oleju rzepakowym wyizolowanych przy pomocy procedury HSA/GC/FID

Nazwa	LOD [mg/kg]	LOQ [mg/kg]	CV [%]
pentanal	4,41	13,23	2,3
heksanal	3,21	9,62	6,9
heptanal	20,37	61,11	9,3
dekan	16,21	48,62	9,4
2-t-heptenal	26,91	80,73	7,1
oktanal	21,41	64,23	13,3
nonanal	50,66	151,97	19,7
dodekan	27,02	81,07	8,2
dane literaturowe	18 - 173	54 - 519	2,5 - 37

6.2 Opracowanie procedury oznaczania związków lotnych techniką mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME)*

Pierwszym etapem badań było dobranie optymalnych warunków analizy chromatograficznej (ustalenie programu temperaturowego) i procesu mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej. Spośród szerokiej gamy faz stacjonarnych dostępnych na rynku na podstawie studium literaturowego [Cavalli i in. 2004; Doleschall i in. 2003; Jeleń i in. 2000; Jimenez i in. 2004; Keszler i in. 1998; Vichi i in. 2003], wybrano włókno krzemionkowe pokryte fazą mieszaną diwinylobenzen/karboksen/polidymetylosiloksan. Włókno takie daje możliwość ekstrakcji analitów w szerokim zakresie stężeń, wykazuje najwyższą wydajność dla substancji średniolotnych, jakimi w większości są produkty reakcji utleniania tłuszczu roślinnych [Pawliszyn 2003].

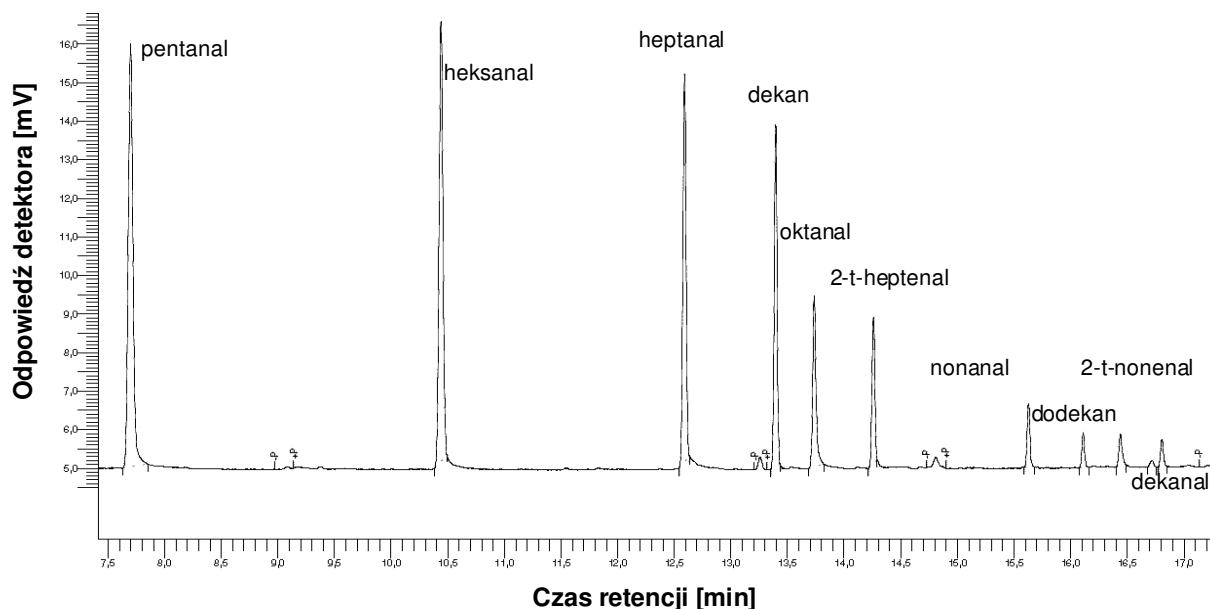
Do rozdzielania i identyfikacji analitów zastosowano taką samą kolumnę chromatograficzną SPB-20 jak dla opracowanej wcześniej metody HSA. Próbkę dozowano do kolumny w trybie bez podziału strumienia (splitless), dlatego należało dobrać nowy program temperaturowy, szczególnie że dla analizy z zastosowaniem techniki SPME zaleca się, aby początkowa temperatura kolumny wynosiła 40-50 °C [Supelco Bulletin 869A].

Etap optymalizacji był nakierowany głównie na izolację lotnych aldehydów. Parametry ekstrakcji dobrano tak, aby uzyskać jak największe ilości wyizolowanych z fazy nadpowierzchniowej aldehydów. Dobór optymalnych parametrów ekstrakcji prowadzono stosując roztwory wzorcowe, które przygotowano poprzez dodatek do oleju odpowiedniej ilości mieszaniny wzorców w heksanie w taki sposób, aby uzyskać końcowe stężenie każdej z wzorców substancji na poziomie 100 mg/kg. W trakcie termostatowania i ekstrakcji próbki mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego.

Pojedyncze roztwory wybranych związków wzorcowych zostały poddane analizie z zastosowaniem techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej. Próbkę o objętości 8 ml umieszczano w 15 ml fiolkach. Przed ekstrakcją próbki termostatowano przez 10 minut w temperaturze 40 °C w celu osiągnięcia równowagi pomiędzy fazą ciekłą a gazową nad jej powierzchnią. Po oznaczeniu czasów retencji

* Wyniki opublikowane: J. Gromadzka, W. Wardencki, „Dobór optymalnych parametrów metody UV-HS-SPME/GC/FID do oceny stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych”, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 5 (60), 235-247, 2008

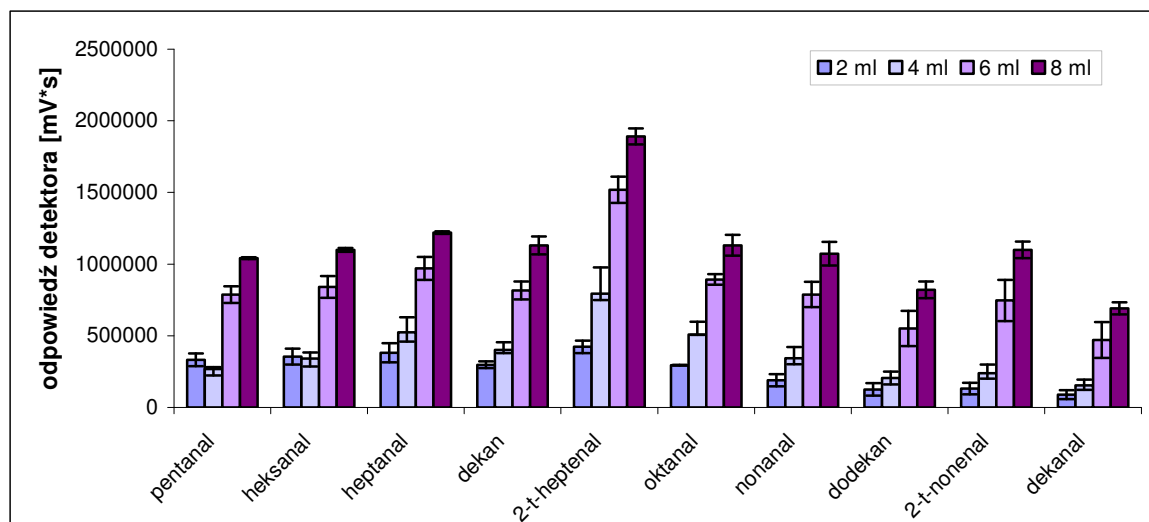
poszczególnych analitów, w podobny sposób przeprowadzono ekstrakcję, a następnie rozdzielanie składników próbki, zawierającej wszystkie substancje wzorcowe w mieszaninie o stężeniu 100 ppm. Uzyskany chromatogram przedstawia rysunek 18.



Rys. 18. Chromatogram wybranych substancji wzorcowych w matrycy olejowej; wyniki uzyskano stosując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HS-SPME/GC/FID); włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, faza stacjonarna 50/30 μm ; kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

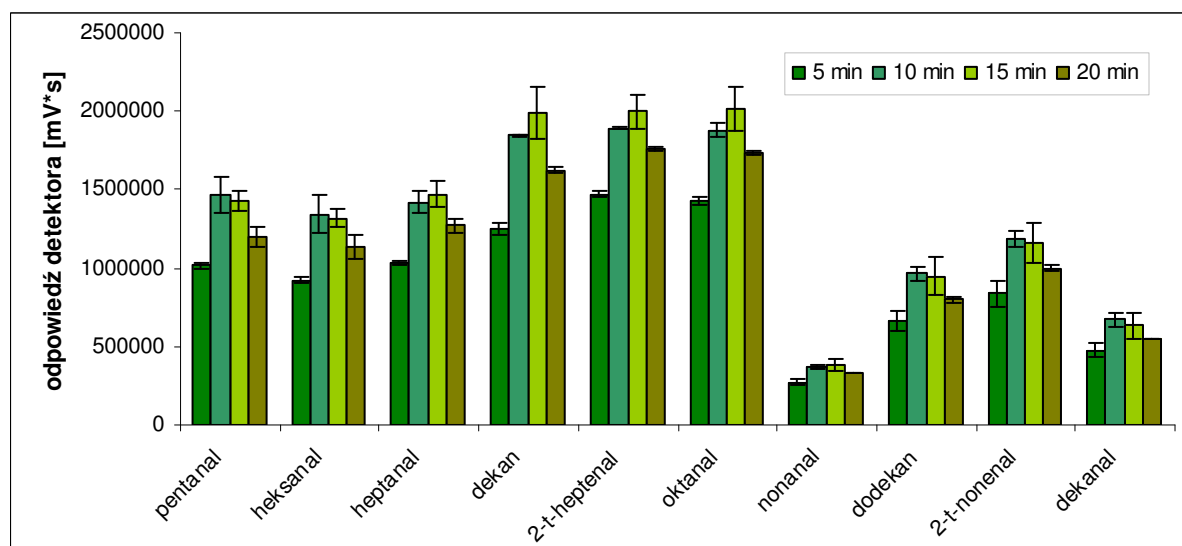
6.2.1 Dobór warunków ekstrakcji

Następnie dobrano objętość próbki w fiolce, umieszczając w 15 ml fiolce szklanej 2, 4, 6 i 8 ml oleju, oraz mieszaninę wzorców, a następnie szczelnie ją zamykając silikonowo-teflonową membraną i plastikową nakrętką. Tak przygotowane próbki poddawano termostataowaniu, a następnie ekstrakcji w 40 °C przez okres odpowiednio 15 i 30 min. Następnie włókno z zaadsorbowanymi analitami umieszczano w dozowniku chromatografu (250 °C) i desorbowano przez 5 min. Jak wynika z rysunku 19 wzrost objętości próbki w fiolce powoduje 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 techniki analizy fazy nadpowierzchniowej najlepsze rezultaty ekstrakcji lotnych składników próbki osiąga się gdy faza gazowa stanowi 40 - 60 % objętości próbki, co potwierdziły wcześniej przeprowadzone badania [Pawliszyn 2003; Snow i Snack 2002].



Rys. 19. Wpływ objętości próbki na wydajność ekstrakcji analitów (olej z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 100 ppm w 15 ml fiolce, czas termostatowania 15 min, czas ekstrakcji 30 min, temperatura termostatowania i ekstrakcji 40 °C)

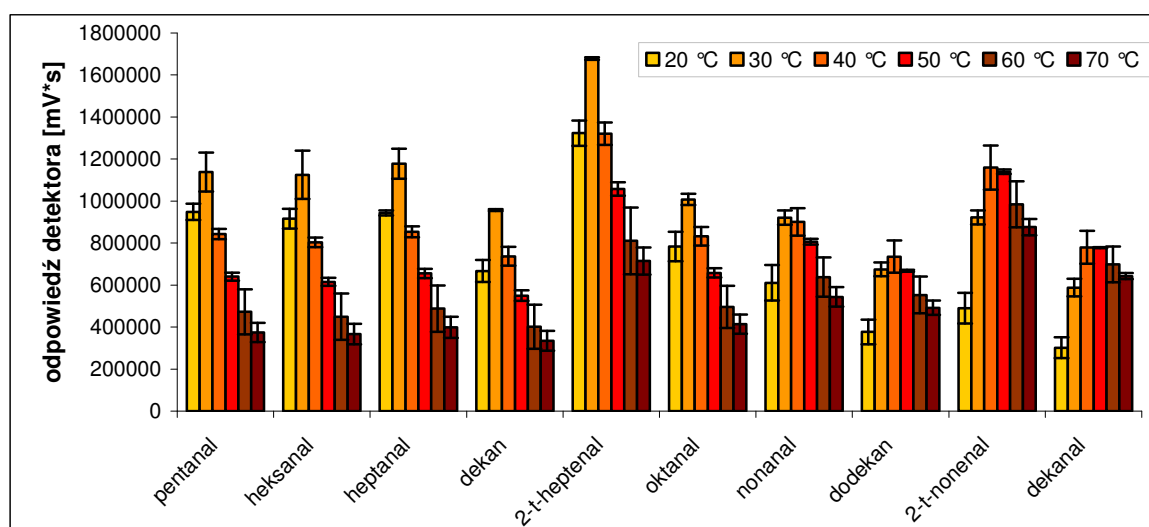
Na wydajność procesu ekstrakcji znaczący wpływ ma czas termostatowania próbki przed ekstrakcją. W tym okresie dochodzi do ustalenia stanu równowagi pomiędzy lotnymi analitami rozpuszczonymi w ciekłej próbce a związkami znajdującymi się w fazie gazowej nad powierzchnią próbki. Analizując różne czasy termostatowania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



Rys. 20. Wpływ czasu termostatowania na wydajność ekstrakcji analitów (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 100 ppm w 15 ml fiolce, czas ekstrakcji 30 min, temperatura termostatowania i ekstrakcji 40 °C)

Istotny wpływ na proces osiągnięcia równowagi między obiema fazami ma również temperatura. Wraz ze wzrostem temperatury wzrasta wydajność ekstrakcji (więcej związków

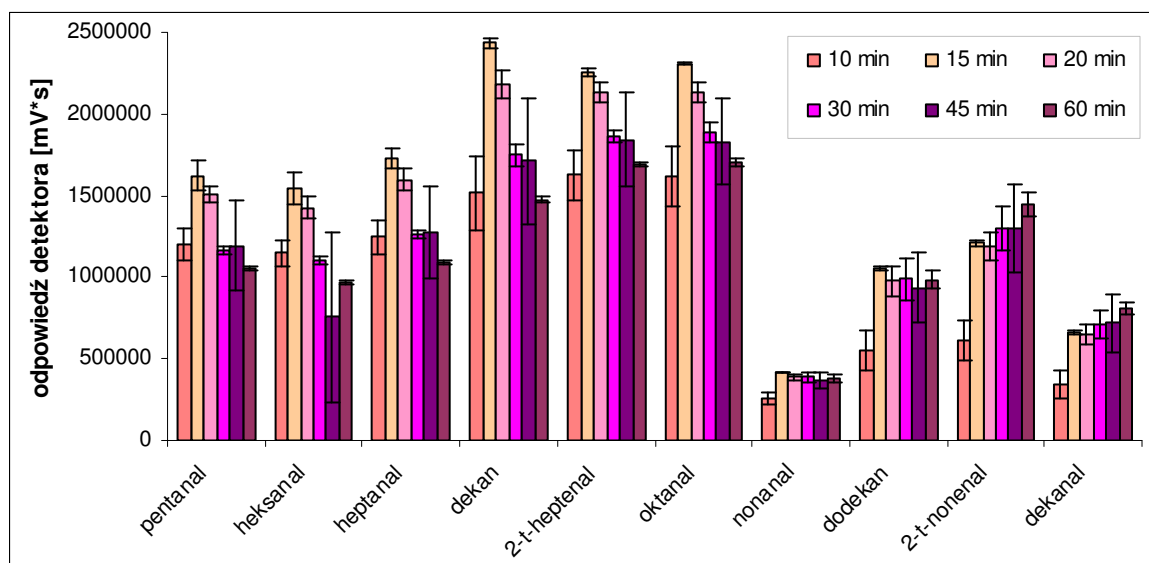
łatwiej przechodzi to fazy nadpowierzchniowej). Jednak olej jest substancją wrażliwą na działanie podwyższonej temperatury, która jest czynnikiem przyspieszającym proces utleniania lipidów [Szukalska 2003]. Dlatego ważną kwestią jest dobranie optymalnej temperatury termostatowania, w której następnie 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 °C do 70 °C (Rys. 21). Przeprowadzone badania wykazały, że zadowalające wyniki ekstrakcji techniką SPME można osiągnąć już w temperaturze 30 °C, co zapobiega generacji dodatkowych substancji w podwyższonej temperaturze, mogących fałszować wynik oceny stabilności oksydacyjnej i jakości badanego oleju. Ponadto, w wyższych temperaturach obserwowano zmniejszenie powierzchni pików analizowanych związków co wskazuje na zmniejszenie ich ilości zaabsorbowanych w fazie stacjonarnej włókna. Może to być związane z powstawaniem większej ilości związków w wyższej temperaturze, powodując zwiększenie konkurencji do aktywnych centrów sorpcyjnych na włóknie. Pomimo, że więcej różnorodnych związków zostaje wyizolowanych z próbki, to jednocześnie następuje spadek stężenia poszczególnych związków w fazie stacjonarnej włókna.



Rys. 21. Wpływ temperatury ekstrakcji na wydajność ekstrakcji analitów (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 100 ppm w 15 ml fiolce, , czas termostatowania 15 min, czas ekstrakcji 30 min)

Należało również dobrać optymalny czas prowadzenia procesu ekstrakcji. W tym celu próbki oleju zawierające mieszaninę substancji wzorcowych poddawano ekstrakcji w przedziale czasu od 10 min. do 60 min. Pomimo, że w technice SPME maksymalną czułość uzyskuje się w stanie równowagi fazowej, to jej osiągnięcie nie jest konieczne ze względu na fakt iż w warunkach nierównowagowych zachodzi liniowa zależność pomiędzy analitami

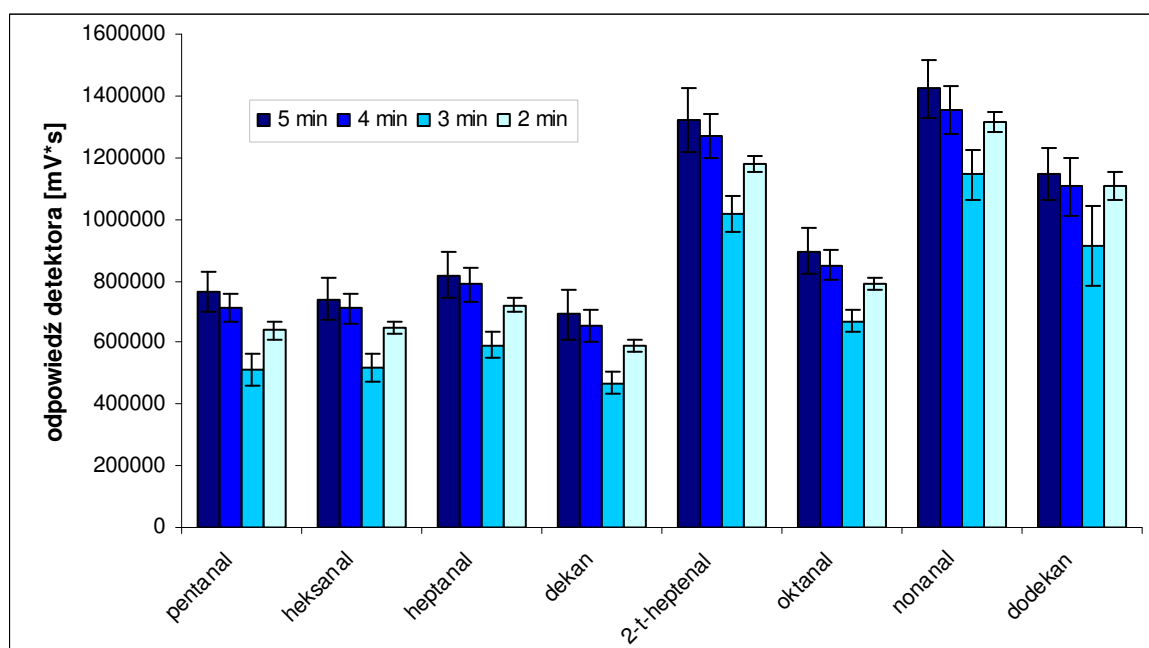
zaadsorbowanymi na włóknie a ich początkowym stężeniem w matrycy próbki [Katoka i in. 2000]. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż zadawalającą wydajność ekstrakcji osiąga się już po 15 minutach trwania procesu. Skrócenie czasu ekstrakcji z pierwotnie założonych 30 min. do 15 minut (Rys. 22.) 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 ilość zanalizowanych próbek w jednostce czasu, co w przypadku serii analiz wykonywanych w laboratoriach kontroli jakości ma istotne znaczenie.



Rys. 22. Wpływ czasu ekstrakcji na wydajność ekstrakcji analitów (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 100 ppm w 15 ml fiołce, czas termostatowania 15 min, temperatura termostatowania i ekstrakcji 40 °C)

Ostatnim etapem tej części badań było dobranie optymalnych warunków desorpcji analitów z włókna do kolumny w dozowniku chromatografu. Na podstawie literatury [Jeleń i in. 2000; Katoka i in. 2000] oraz zaleceń producenta włókna [Supelco Bulletin 923] i własnych badań [Gromadzka i in. 2008a], 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 warstwa sorbentu tym bardziej efektywna jest ekstrakcja, szczególnie w przypadku mniej lotnych składników matrycy próbki, ale również tym dłuższy czas desorpcji jest potrzebny do całkowitego przeniesienia analitów do kolumny chromatograficznej. Czas desorpcji badano w przedziale 5 - 2 min (Rys. 23.). Okazało się, że zmniejszanie czasu desorpcji powoduje niecałkowite uwolnienie analitów z włókna (a tym

samym obniżeniu wydajności tego procesu), a jednocześnie przenoszenie ich do następnych analiz. Ostatecznie do dalszych analiz wybrano 4 minutowy czas desorpcji.



Rys. 23. Wpływ czasu desorpcji na ilościowe wprowadzenie analitów do kolumny (8 ml oleju z dodatkiem mieszaniny wzorców o stężeniu 100 ppm w 15 ml fiołce, czas termostatowania 15 min, czas ekstrakcji 30 min, temperatura termostatowania i ekstrakcji 40 °C)

Ostatecznie ustalone parametry procesu mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej do stacjonarnej włókna (HS-SPME) związków lotnych w olejach roślinnych zestawiono w tabeli 12. Podobne parametry procesu ekstrakcji stosował Cavalli analizując lotne składniki francuskiej i hiszpańskiej oliwy z oliwek [Cavalli i in. 2004]. Badania te skupiały się jednak na analizie pełnego składu frakcji lotnej, natomiast badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy dotyczą głównie składu lotnych aldehydów – produktów utleniania olejów, dlatego możliwe było istotne skrócenie zarówno czasu termostatowania jak i ekstrakcji.

Tab. 12. Zestawienie ustalonych optymalnych warunków mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (HS-SPME) związków lotnych z olejów roślinnych

<i>Parametr ekstrakcji</i>	<i>Wartość optymalna</i>
faza stacjonarna włókna	DVB/CAR/PDMS, 50/30 μ m, 2 cm
objętość próbki	8 ml w 15 ml fiołce
czas termostatowania	10 min
temperatura ekstrakcji	30 °C
czas ekstrakcji	15 min
temperatura desorpcji	250 °C
czas desorpcji	4 min
mieszanie próbki	tak

6.2.2 Wyznaczenie wybranych parametrów walidacyjnych

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 ilustruje tabela 13. Precyzję metody wyrażono w formie współczynnika zmienności i oznaczono na podstawie kolejnych 10 powtórzeń dla analitów o stężeniu na poziomie 450 µg/kg, natomiast LOD i LOQ wyznaczono na podstawie uzyskanych krzywych wzorcowych dla poszczególnych analitów [Konieczka 2003a; Konieczka 2003b].

Tab. 13. Granica oznaczalności (LOD), wykrywalności (LOQ) oraz powtarzalność (CV) dla wybranych substancji wzorcowych w oleju roślinnym wyekstrahowanych techniką HS-SPME/GC/FID (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)

Związek	LOD [µg/kg]	LOQ [µg/kg]	CV [%]
pentanal	216	648	3,87
heksanal	222	666	4,63
heptanal	250	750	5,82
dekan	215	645	5,64
2-trans-heptenal	208	624	5,53
oktanal	219	657	7,21
nonanal	238	714	7,90
dodekan	346	1038	7,92
2-trans-nonenal	162	486	8,98
dekanal	293	879	9,29

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 % [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]. W przypadku analizowanych związków ich granice wykrywalności są w większości o 3 rzędy niższe niż przyjęte dla analizy fazy nadpowierzchniowej, a powtarzalność metody mieści się w zakresie 3,87 – 9,29 %, a więc w dolnej średniej granicy.

Podobnie jak w przypadku techniki HSA, również w technice HS-SPME, analizowane związki charakteryzują się kilkoma zakresami liniowości w wybranym przedziale stężeń.

Równania sporządzonych krzywych kalibracyjnych i ich współczynniki regresji zostały zebrane w tabeli 14.

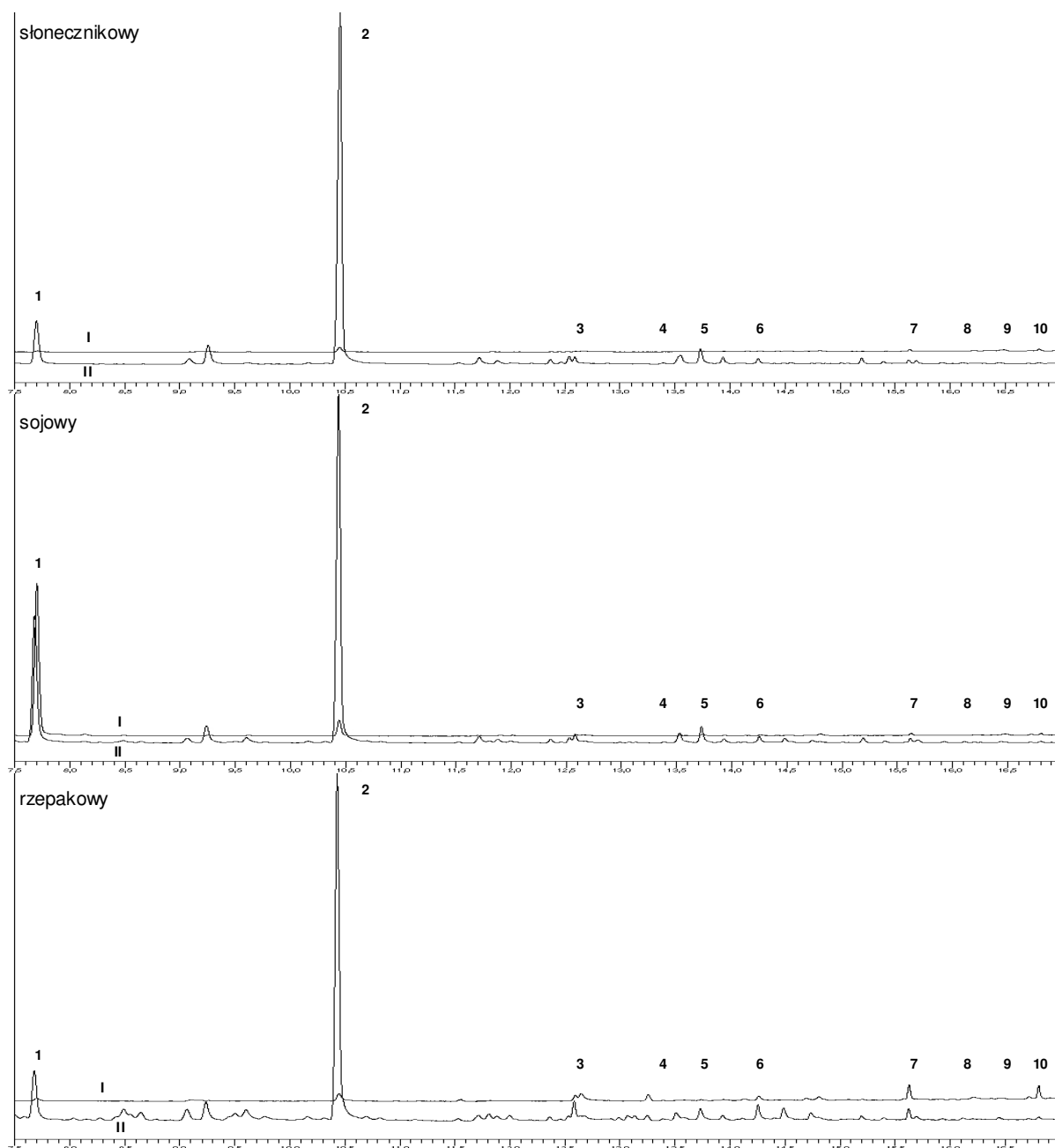
Tab. 14. Równania krzywych kalibracyjnych i współczynników regresji dla badanych związków techniką HS-SPME/GC/FID

<i>Analit</i>	<i>Zakres liniowości</i>	<i>Równanie krzywej</i>	<i>Współczynnik regresji</i>
pentanal	18 - 4 ppm	$y = 9885x + 38153$	0,9928
	6 - 0,72 ppm	$y = 17265,00x + 1765,30$	0,9863
	720 - 360 ppb	$y = 12,56x + 6187,10$	0,9746
heksanal	18 - 4 ppm	$Y = 8434x + 19186$	0,9918
	6 - 0,72 ppm	$y = 12932,00x - 450,66$	0,9912
	720 - 360 ppb	$y = 7,79x + 3963,10$	0,9732
heptanal	18 - 4 ppm	$Y = 4573x + 10610$	0,9995
	6 - 0,72 ppm	$y = 6631,30x - 337,92$	0,9946
	720 - 360 ppb	$y = 4,32x + 1692,50$	0,9663
dekan	18 - 4 ppm	$Y = 3942x - 222$	0,9798
	6 - 0,72 ppm	$y = 4283,30x + 1218,40$	0,9936
	720 - 360 ppb	$y = 4,18x + 1301,20$	0,9748
oktanal	18 - 4 ppm	$Y = 2035x + 1479$	0,9960
	6 - 0,72 ppm	$y = 2375,50x + 287,27$	0,9980
	720 - 360 ppb	$y = 2,25x + 492,87$	0,9738
2-t-heptenal	18 - 4 ppm	$Y = 6336x + 2864$	0,9952
	6 - 0,72 ppm	$y = 8246,00x - 5386,60$	0,9889
	720 - 360 ppb	$y = 2,43x + 452,07$	0,9763
nonanal	18 - 4 ppm	$Y = 1050x + 1185$	0,9754
	6 - 0,72 ppm	$y = 963,22x + 284,83$	0,9981
	720 - 360 ppb	$y = 1,23x + 200,67$	0,9693
dodekan	18 - 4 ppm	$Y = 593x - 283$	0,9885
	6 - 0,72 ppm	$y = 598,97x + 53,42$	0,9974
	720 - 360 ppb	$y = 0,70x + 65,67$	0,9384
2-t-nonenal	18 - 4 ppm	$Y = 568x - 685$	0,9848
	6 - 0,72 ppm	$y = 506,5x + 25,58$	0,9978
	720 - 360 ppb	$y = 0,69x - 67,20$	0,9855
dekanal	18 - 4 ppm	$Y = 374x + 2,37$	0,9894
	6 - 0,72 ppm	$y = 442,54x - 239,11$	0,9770
	720 - 360 ppb	$y = 0,09x + 132,73$	0,9546

6.2.3 Analiza próbek rzeczywistych

Ostatnim etapem prezentowanych badań była analiza próbek rzeczywistych, które wcześniej zostały poddane naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym, w celu przyspieszenia procesu ich utleniania. Reakcję fotoutleniania przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.4.1. Próbkę pobierano w równych odstępach czasu przez 72 godziny, umieszczano w szczelnie zamkniętej fiolce 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 czasów retencji, porównując je z czasami retencji związków w mieszaninie wzorcowej. Na rysunku 24 przedstawiono przykładowe chromatogramy analizowanych olejów roślinnych poddanych naświetlaniu promieniami UV przez 72 godziny oraz świeżych olejów rafinowanych nie naświetlanych. We wszystkich naświetlanych olejach obserwuje się wyraźny wzrost zawartości heksanal, co potwierdza tezę, że związek ten jest dobrym wskaźnikiem jakości olejów roślinnych. Wiele prac dotyczących heksanal jako wskaźnika utleniania tłuszczów, oznaczanego techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej (HSA) opublikował Frankel, który w latach 80-tych zaproponował, aby przeprowadzając ocenę stabilności olejów brać pod uwagę nie tylko sumaryczną zawartość związków lotnych w próbce, ale także wzrost zawartości heksanal. Podobnie jak w prezentowanych w pracy badaniach, Frankel zauważył także istotny wzrost zawartości pentanal w utlenionych próbkach. W swoich badaniach stosował jednak głównie termiczne utlenianie, natomiast poniższe chromatogramy uzyskano dla olejów utlenionych pod wpływem promieniowania UV, a związki lotne izolowano techniką SPME [Frankel 1993; Frankel i in, 1994; Medina i in., 1999].



Rys. 24. Chromatogramy olejów słonecznikowego, sojowego i rzepakowego świeżo rafinowanych (I) i naświetlanych promieniowaniem UV przez 72 h (12 W, 254 nm) (II) uzyskane w wyniku mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (włókno DVB/CAR/PDMS, 2 cm, 50/30 μ m; objętość próbki 8 ml, czas i temperatura ekstrakcji odpowiednio 15 min i 30 $^{\circ}$ C). Warunki analizy: detektor FID, kolumna SPB-20 (Supelco, 30 m x 0,25 mm x 1 μ m), program temp.: 50 $^{\circ}$ C (1 min), 6 $^{\circ}$ C/min do 100 $^{\circ}$ C, 15 $^{\circ}$ C/min do 250 $^{\circ}$ C (2 min) (1 – pentanal, 2 – heksanal, 3 – heptanal, 4 – dekan, 5 – 2-*trans*-heptenal, 6 – oktanal, 7 – nonanal, 8 – dodekan, 9 – 2-*trans*-nonenal, 10 – dekanal)

6.3 Zestawienie porównawcze metody HSA i SPME*

Po optymalizacji i walidacji opracowanych metodyk analitycznych dokonano porównania wyznaczonych parametrów. Zbiorcze wyniki przedstawiono w tabeli 15, która stanowi połączenie wyników prezentowanych wcześniej w tabelach 9 i 12.

Tab. 15. Porównanie optymalnych warunków procedur HSA/GC i HS-SPME/GC stosowanych w oznaczeniu związków lotnych w olejach roślinnych

Parametr	HSA	SPME
kolumna chromatograficzna	SPB-20 (Supelco) 30 m x 0,25 mm x 1 µm (20% difenylo / 80% dimetylosiloksan)	
program temperaturowy	70°C (1 min), 6°C/min do 100°C, 15°C/min do 250°C (1 min)	50°C (1 min), 6°C/min do 100°C, 15°C/min do 250°C (2 min)
podział strumienia	1:10	brak (splitless)
gaz nośny	hel o natężeniu przepływu 1 ml/min	
temperatura dozownika / detektora	170 °C / 230 °C	250 °C / 250 °C
faza stacjonarna włókna	-	DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm, 2 cm
objętość próbki	8 ml w 15 ml fiolce	
czas równowagi	20 min	10 min
temperatura ekstrakcji	80 °C	30 °C
czas ekstrakcji	-	15 min
czas wyrównywania ciśnień	1 min	-
objętość nastrzyku	0,16 ml	-
mieszanie próbki	nie	tak
warunki naświetlania UV	2 niskociśnieniowe rtęciowe lamy (6 W każda) z maksimum emisji przy 254 nm	

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, iż w przypadku oznaczania lotnych produktów utleniania olejów roślinnych, zwłaszcza aldehydów, technika SPME w połączeniu z GC/FID jest zdecydowanie lepszym narzędziem analitycznym niż technika

* Wyniki opublikowane: J. Gromadzka, W. Wardencki, "Static headspace sampling and solid phase microextraction in edible oils stability assessment", *Chromatographia*, 71, 81-86

HSA/GC/FID, choć całkowity czas procedury analitycznej w przypadku techniki SPME jest nieco dłuższy niż w przypadku techniki HSA (Tab. 16).

Tab. 16. Zestawienie czasu analiz przeprowadzonych przy zastosowaniu procedur HSA/GC/FID oraz HS-SPME/GC/FID

Czas [min]	HSA	SPME
przygotowanie próbki	21	25
analiza GC	17	21
czas całkowity	38	46

Etap izolacji i wzbogacania analityków w metodzie HSA jest całkowicie zautomatyzowany, co sprowadza pracę analityka do minimum (odmierzenie odpowiedniej objętości próbki, zaprogramowanie urządzenia). Takie podejście jest szczególnie przydatne w laboratoriach przemysłowych, gdzie wykonuje się dużą liczbę analiz, natomiast technika SPME wymaga większego zaangażowania i umiejętności analityka. Dodatkowo przy zastosowaniu procedury opartej o technikę SPME czas przygotowania próbki (izolacji analityków z matrycy) jest o 4 min, a całkowity czas analizy o 8 min dłuższy niż w przypadku HSA. Zdecydowanie niższa temperatura termostatowania próbki w metodzie SPME (80 °C dla HSA i 30 °C dla SPME) istotnie ogranicza możliwość rozkładu matrycy próbki i powstawania artefaktów, gdyż oleje roślinne są niezwykle wrażliwe na działanie podwyższonej temperatury (mało stabilne termicznie).

Powtarzalność opracowanych procedur mieści się w granicach powszechnie akceptowalnych dla technik analizy fazy nadpowierzchniowej, ale dla metody SPME/GC/FID (CV < 10%) jest zdecydowanie lepsza, niż dla HSA/GC/FID (CV < 20%) (Tab. 17). Granice wykrywalności dla wszystkich analizowanych związków są również 20-200 razy niższe w przypadku metody SPME/GC. W celu ułatwienia porównania wyniki prezentowane wcześniej w tabelach 11 i 13 zebrano w zbiorczej tabeli 17.

Koszty związane z wdrożeniem proponowanych procedur do laboratoriów przemysłowych w przypadku techniki HSA wymagają jednorazowego dużego nakładu finansowego, związanego z zakupem specjalnej przystawki do analizy fazy nadpowierzchniowej (ok. 100 000 PLN), którą łączy się z chromatografem gazowym, dostępnym praktycznie w każdym laboratorium przemysłu tłuszczowego. Technika SPME natomiast, wymaga jednorazowego zakupu zestawu do SPME (termostat, mieszadło magnetyczne, strzykawka do SPME i statyw – ok. 10 000 PLN) oraz zakupu włókien ekstrakcyjnych, które zużywają

się po 50-100 analizach i których zapas należy ciągle uzupełniać. Tak więc, jednorazowy wydatek związany z zaadoptowaniem metody w przemyśle jest zdecydowanie niższy dla techniki SPME (10-krotnie niższy), niż dla HSA, jednak metoda ta wymaga stałego nakładu kosztów w trakcie jej eksploatacji (ok. 1 000 PLN/100 analiz).

Tab. 17. Porównanie parametrów walidacyjnych dla zoptymalizowanych procedur HSA/GC i HS-SPME/GC stosowanych w analizie związków lotnych w olejach roślinnych

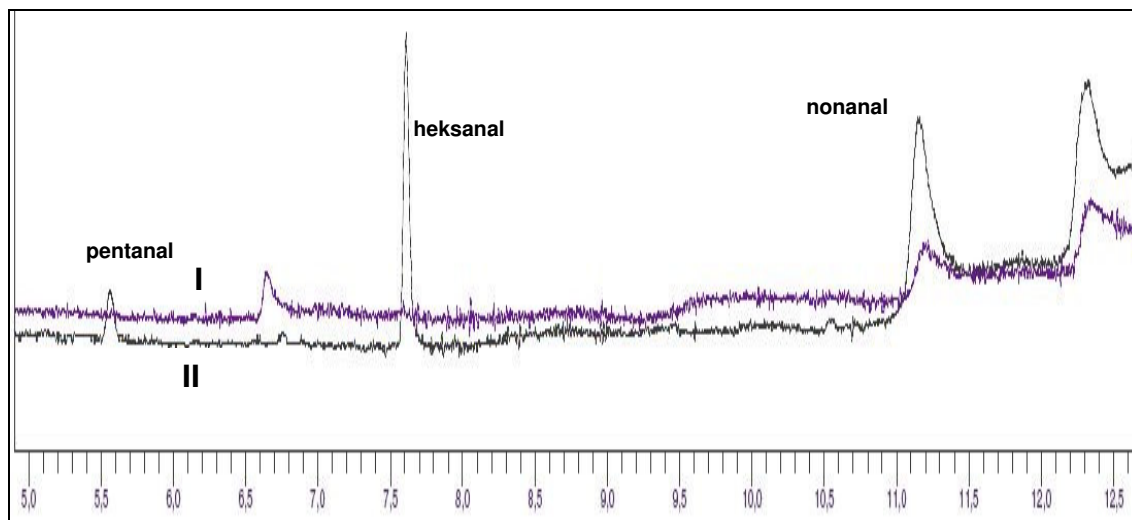
Parametr walidacyjny	HSA			SPME		
	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Powtarzalność CV ¹ (%)	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Powtarzalność CV ² (%)
pentanal	4,41	13,23	2,3	0,216	0,648	4,02
heksanal	3,21	9,62	6,9	0,222	0,666	4,35
heptanal	20,37	61,11	9,3	0,250	0,750	7,65
dekan	16,21	48,62	9,4	0,215	0,645	6,32
2-t-heptenal	26,91	80,73	7,1	0,208	0,624	8,38
oktanal	21,41	64,23	13,3	0,219	0,657	8,53
nonanal	50,66	151,97	19,7	0,238	0,714	8,17
dodekan	27,02	81,07	8,2	0,346	1,038	7,30
2-t-nonenal	-	-	-	0,162	0,486	8,51
dekanal	-	-	-	0,293	0,879	8,24

1) stężenie aldehydów: 250 mg kg⁻¹

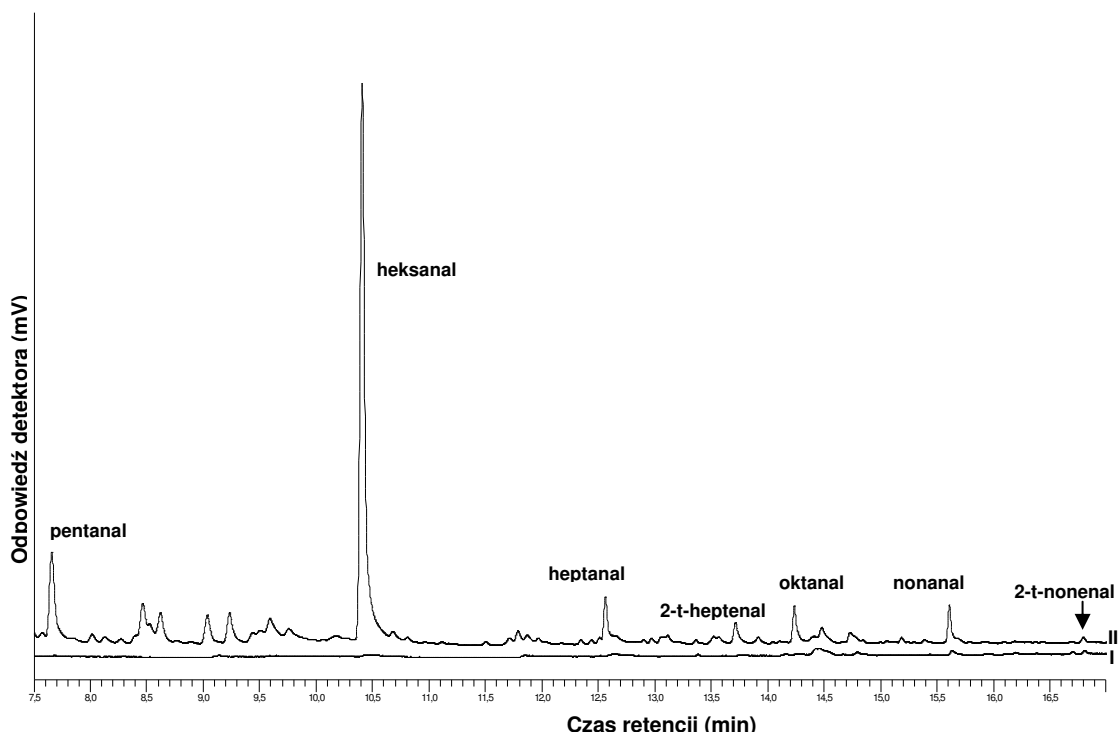
2) stężenie aldehydów: 18 mg kg⁻¹

Efektywność obu wspomnianych metod w identyfikacji lotnych produktów utleniania olejów roślinnych obrazują poniższe chromatogramy (Rys. 25 i Rys. 26) uzyskane dla tego samego oleju rzepakowego przed i po 24 godzinach utleniania.

Można więc stwierdzić, że połączenie promieniowania UV i techniki SPME w teście przyspieszonego utleniania olejów roślinnych w opracowanej procedurze zostało pozytywnie zweryfikowane. Procedura ta umożliwia w łatwy sposób, z pominięciem kosztownych i toksycznych dla środowiska rozpuszczalników organicznych, przeprowadzić ocenę stabilności oksydacyjnej badanych próbek olejów.



Rys. 25. Chromatogramy świeżo rafinowanego (I) i naświetlonego (24 h, UV 12 W, 254 nm) oleju rzepakowego uzyskane w wyniku analizy metodą HSA/GC/FID (kolumna SPB-20, 30 m x 0.25 mm x 1 μ m Supelco, Bellefonte, PA, USA)



Rys. 26. Chromatogramy świeżo rafinowanego (I) i naświetlanego (24 h, UV, 12W, 254 nm) (II) oleju rzepakowego uzyskane w wyniku mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową o detektorze płomieniowo-jonizacyjnym HS-SPME/GC/FID (włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, 50/30 μ m grubość filmu; kolumna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μ m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Na podstawie powyższych chromatogramów jednoznacznie można stwierdzić, że metoda SPME/GC/FID jest bardziej czuła i umożliwia identyfikację większej ilości analitów. Dlatego też w końcowych badaniach korzystano wyłącznie z metody HS-SPME/GC/FID połączonej z promieniowaniem ultrafioletowym na etapie utleniania próbek olejów roślinnych.

6.4 Porównanie opracowanych metod z metodami stosowanymi w analizie stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych*

W celu porównania aktualnie stosowanych metod oznaczania stabilności oksydacyjnej tłuszczów jadalnych wybrano dwa powszechnie stosowane w centralnej i środkowej Europie oleje: rzepakowy i słonecznikowy. Wytypowane oleje pochodziły od różnych producentów z trzech krajów: Polski, Finlandii i Hiszpanii (Tab. 18.) i zostały zakupione w sklepach spożywczych. Wszystkie oleje przebadano stosując zarówno metody powszechnie stosowane w przemyśle (m. in. test Rancimat, oznaczenie liczby nadtlenkowej), jak i nowo opracowane metody instrumentalne (HS-SPME/GC i HSA/GC).

Tab. 18. Oleje roślinne stosowane w badaniach porównawczych metod oznaczania stabilności oksydacyjnej

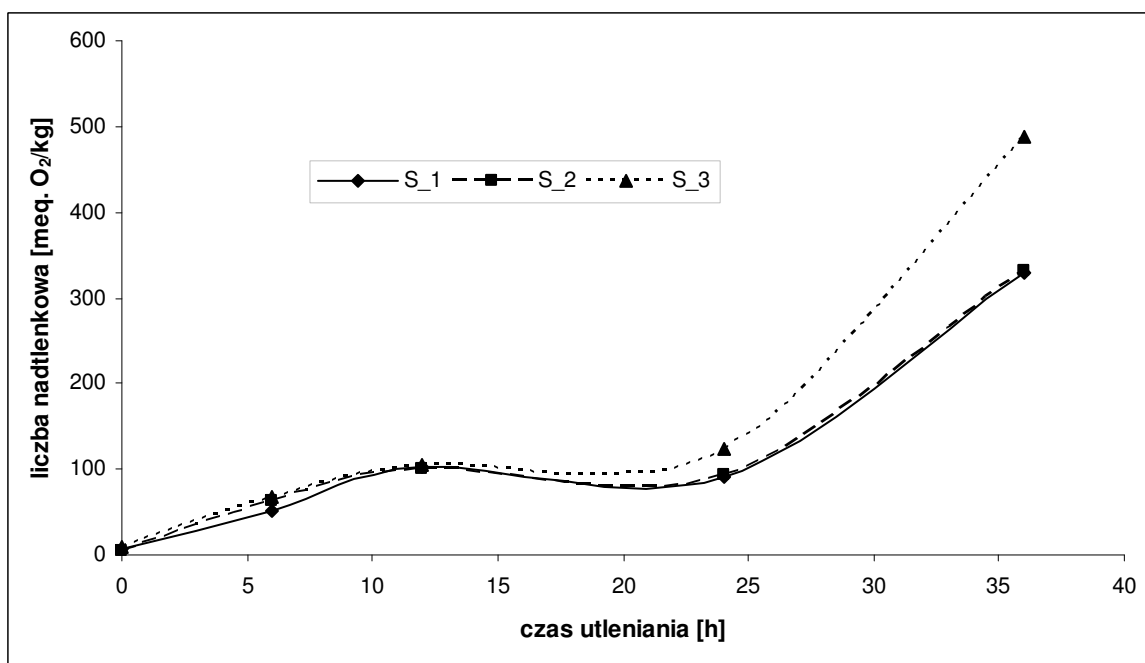
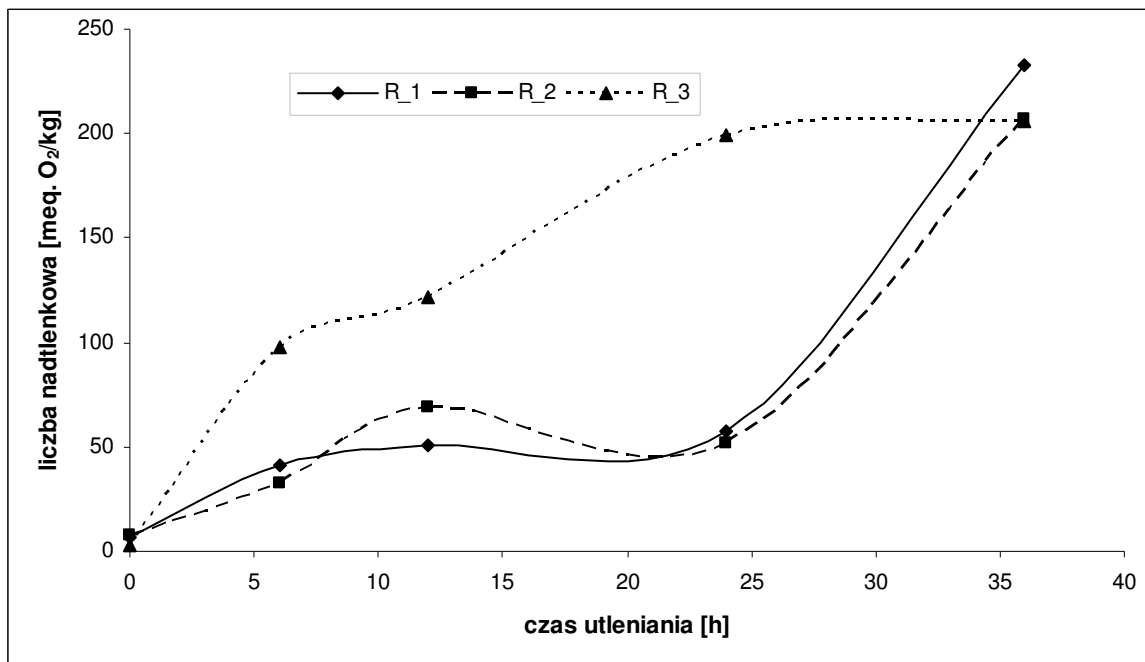
Nr próbki	Typ oleju	Kraj pochodzenia
R_1		Finlandia
R_2	rzepakowy	Finlandia
R_3		Polska
S_1		Finlandia
S_2	słonecznikowy	Hiszpania
S_3		Polska

6.4.1 Oznaczenie zmian liczby nadtlenkowej w czasie utleniania

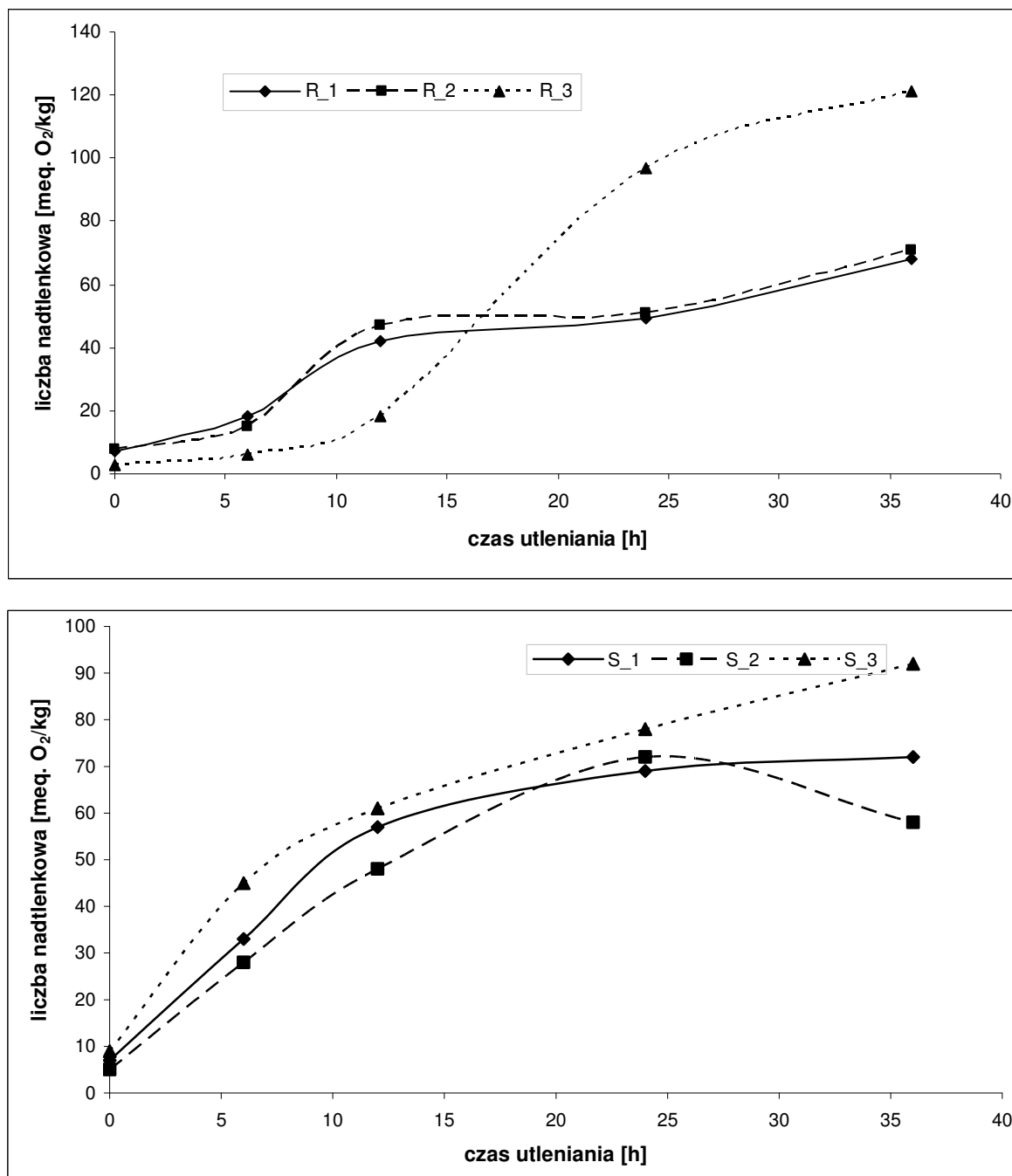
Liczba nadtlenkowa (PV) umożliwia oznaczenie stopnia utlenienia oleju, poprzez oszacowanie zawartości pierwotnych produktów utleniania w badanej próbce. Liczbę nadtlenkową oznaczano w olejach świeżych zakupionych bezpośrednio w sklepie oraz w próbkach poddanych procesowi przyspieszonego utleniania poprzez działanie podwyższonej temperatury (80 °C) lub działanie promieniowania ultrafioletowego (254 nm, 12 W). Oleje utleniano przez 0 - 24 godzin, poddając analizie próbki pobierane co 6 godzin. Każdą analizę wykonywano w trzech powtórzeniach, a do oznaczeń końcowych okresu indukcji wykorzystano wartości średnie z trzech pomiarów. Liczbę nadtlenkową oznaczano zgodnie z Polską Normą PN-EN ISO 3960:2005.

* Wyniki opublikowane: J. Gromadzka, W. Wardencki, R. Pawłowicz, G. Muszyński, "Nowe techniki instrumentalne na tle tradycyjnych metod analizy stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych.", *Tłuszcze Jadalne*, XLIV, 1/2, 71-80, 2009

Na podstawie uzyskanych zależności wartości liczby nadtlenkowej w funkcji czasu naświetlania lub działania podwyższonej temperatury, wykreślono krzywe obrazujące stabilność oksydacyjną badanych olejów (Rys. 27 i Rys. 28).



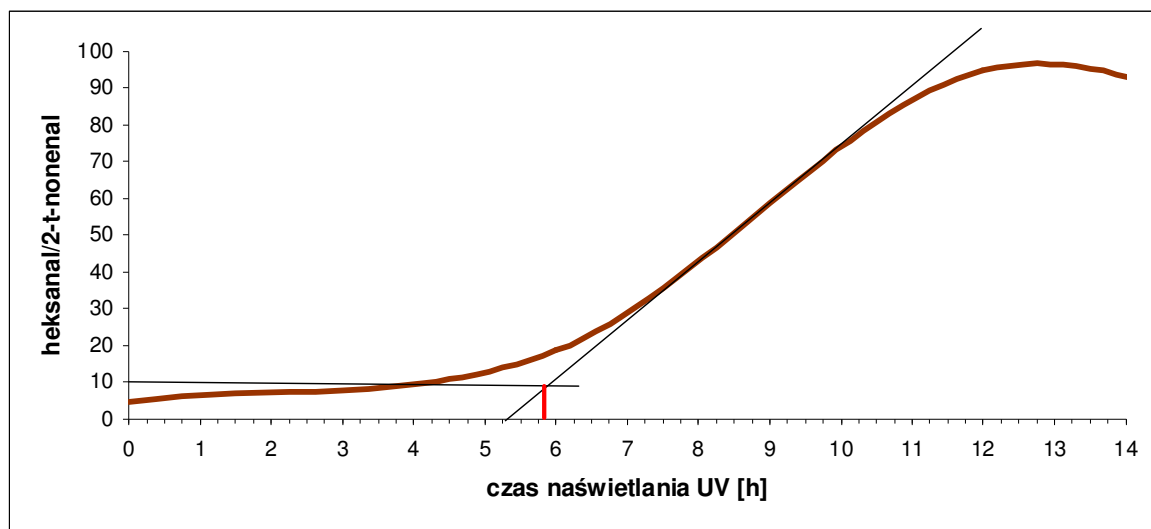
Rys. 27. Zależność liczby nadtlenkowej od czasu działania podwyższonej temperatury w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18



Rys. 28. Zależność liczby nadtlenkowej od czasu naświetlania promieniowaniem UV (254 nm, 12 W) w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18

Na podstawie uzyskanych krzywych, wyznaczono graficznie okres indukcji poszczególnych olejów (Tab. 20). Okres indukcji wyznaczano zgodnie z wytycznymi z normy PN-EN ISO 6886:1997. Na otrzymanym wykresie (Rys. 29) wytyczano prostą równoległą do osi czasu, przechodzącą przez krzywą utleniania w punkcie odpowiadającym pierwszej godzinie utleniania. Następnie kreślono drugą prostą, będącą styczną w punkcie gwałtownego

wzrostu krzywej utleniania. Punkt przecięcia obu prostych wyznacza okres indukcji badanej próbki.

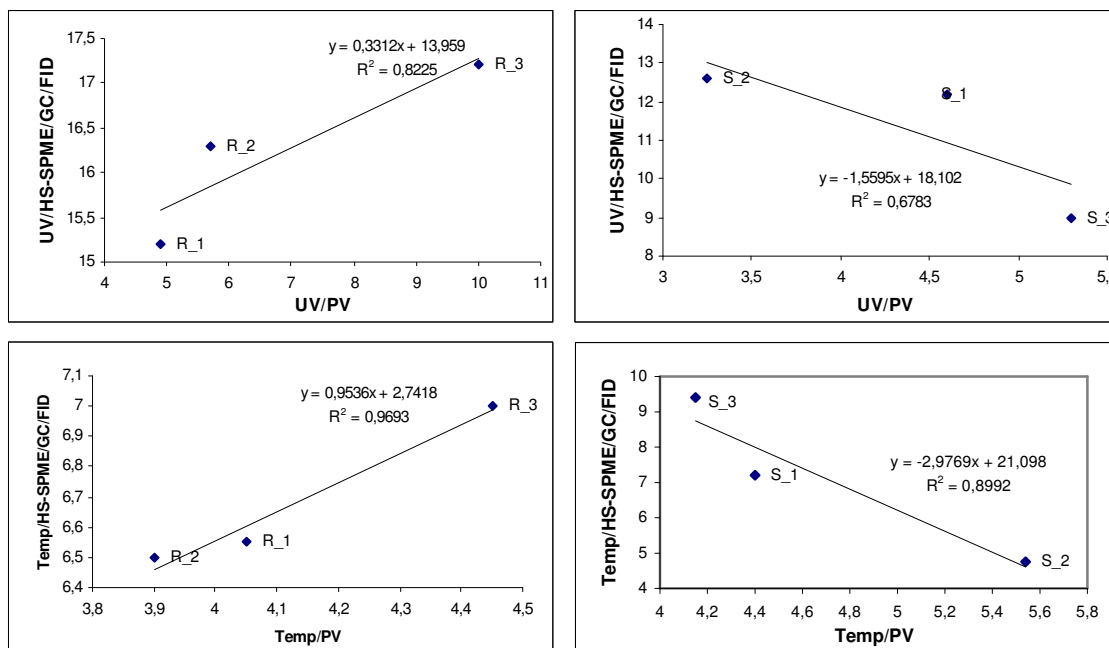


Rys. 29. Przykład graficznego wyznaczenia okresu indukcji dla próbki oleju na podstawie krzywej utleniania

Zbadano również zależności pomiędzy okresami indukcji wyznaczonymi na podstawie wartości liczby nadtlenkowej (PV) oraz na podstawie wartości uzyskanych z zastosowaniem procedury HS-SPME/GC/FID. Dla próbek olejów rzepakowych stwierdzono bardzo dobrą korelację pomiędzy obiema metodami, zarówno dla próbek utlenionych pod wpływem działania promieniowania UV, jak i podwyższonej temperatury (Rys. 30). Natomiast w przypadku próbek olejów słonecznikowych zaobserwowano odwrotną korelację – im wyższy okres indukcji oznaczony metodą HS-SPME/GC/FID tym niższy dla metody opartej o pomiar PV. Zależność ta była stała bez względu na zastosowany czynnik przyspieszający proces utleniania.

Korelacja taka wynikać może między innymi z odmiennego składu kwasów tłuszczowych występujących w olejach słonecznikowych, a więc również z odmiennego składu ilościowego lotnych aldehydów, będących produktami utleniania tych kwasów. W oleju słonecznikowym, bogatym w kwas linolowy, powstają podczas utleniania większe ilości nonanal niż w oleju rzepakowym bogatym w kwas oleinowy, z którego powstaje głównie heksanal. Jednak na uzyskane wyniki istotny wpływ mogły mieć również tzw. substancje towarzyszące, czyli tokoferole, karotenoidy czy też metale.

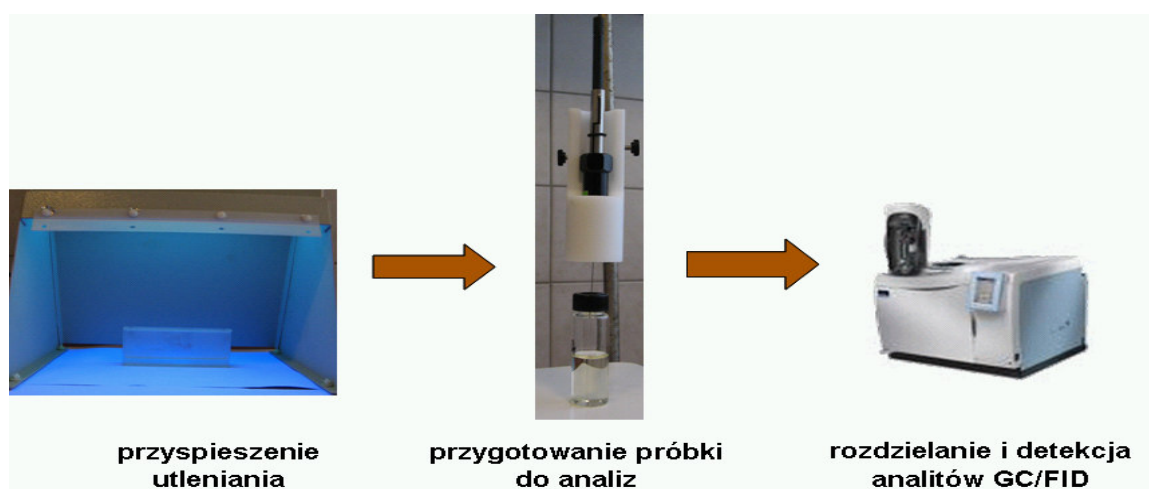
Zasadniczym celem prezentowanej dysertacji było opracowanie i zrifyfikowanie nowych procedur analitycznych umożliwiających ocenę stabilności oksydacyjnej olejów, a nie określenie wpływu różnych czynników na mechanizm utleniania tłuszczów.



Rys. 30. Zależność między okresami indukcji wyznaczonymi metodą HS-SPME/GC/FID i metodą PV dla rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S) po procesie utleniania poprzez naświetlanie promieniowaniem UV oraz działaniem podwyższonej temperatury, numery próbek zgodnie z opisem w tabeli 18

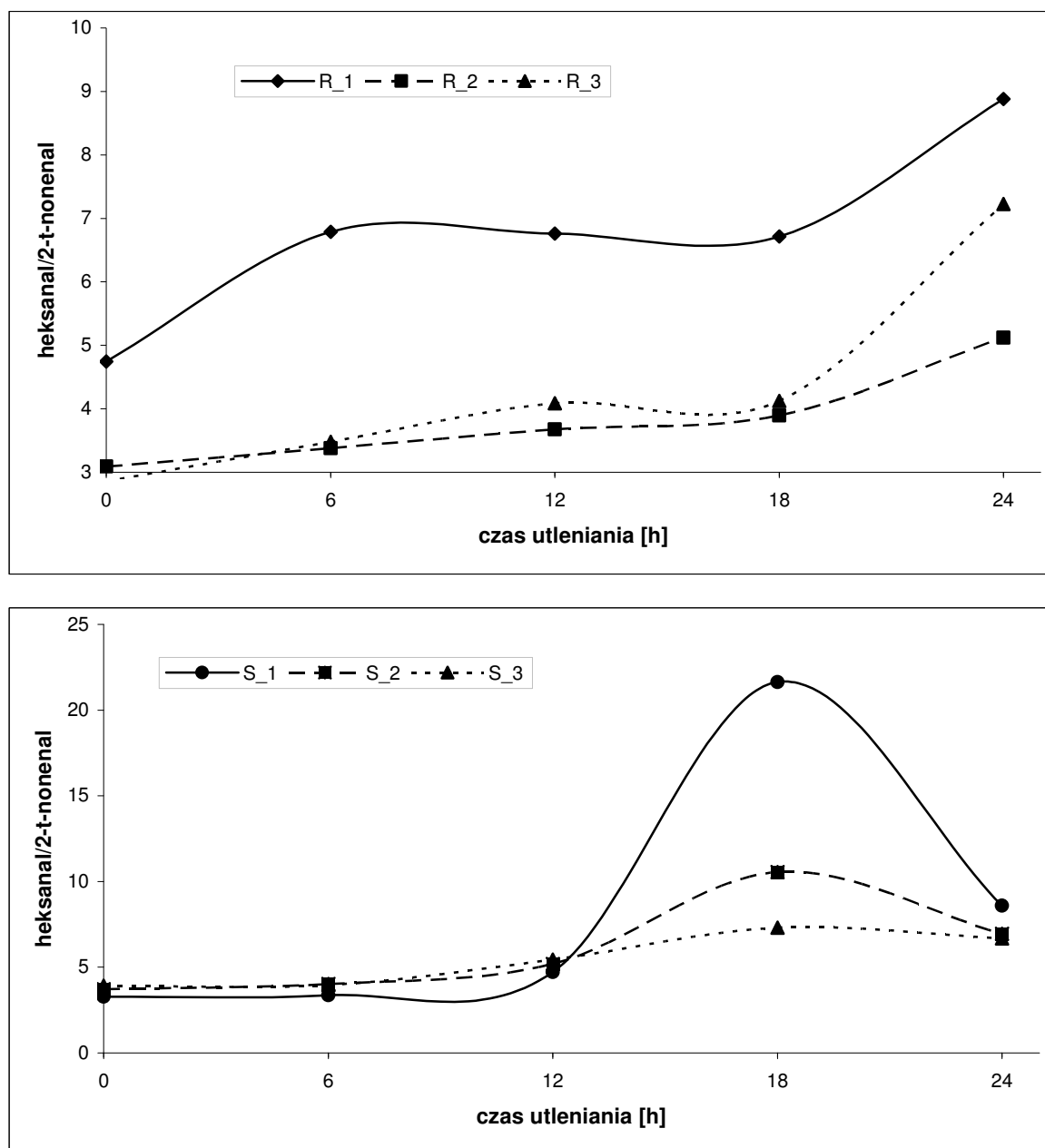
6.4.2 Oznaczenie stabilności oksydacyjnej przy pomocy metody UV-HS-SPME/GC/FID

Stabilność oksydacyjną w badanych próbkach olejów wyznaczono również przy pomocy nowo opracowanej metody, której ogólną ideę przedstawia rysunek 31. Próbkę oleju były naświetlane promieniowaniem UV przez 0 – 24 godziny, następnie przenoszone do fiolek do analizy fazy nadpowierzchniowej i termostatowane. Po ustaleniu zadanej temperatury lotne związki ekstrahowano do fazy stacjonarnej włókna, a następnie termicznie desorbowano w dozowniku chromatograficznym.



Rys. 31. Ogólna idea metody oznaczania lotnych produktów utleniania olejów według procedury UV/HS-SPME/GC/FID

Następnie na chromatogramie odczytywano powierzchnię pików dla heksanal i *trans*-non-2-enalu i wyznaczano stosunek powierzchni obu związków. W kolejnym etapie wykreślano krzywą zależności stosunku heksanal do *trans*-non-2-enalu w funkcji czasu naświetlania próbki promieniowaniem UV, uzyskując charakterystyczne krzywe utlenienia (Rys. 32.), z których następnie graficznie wyznaczono okres indukcji dla badanego oleju. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 20.

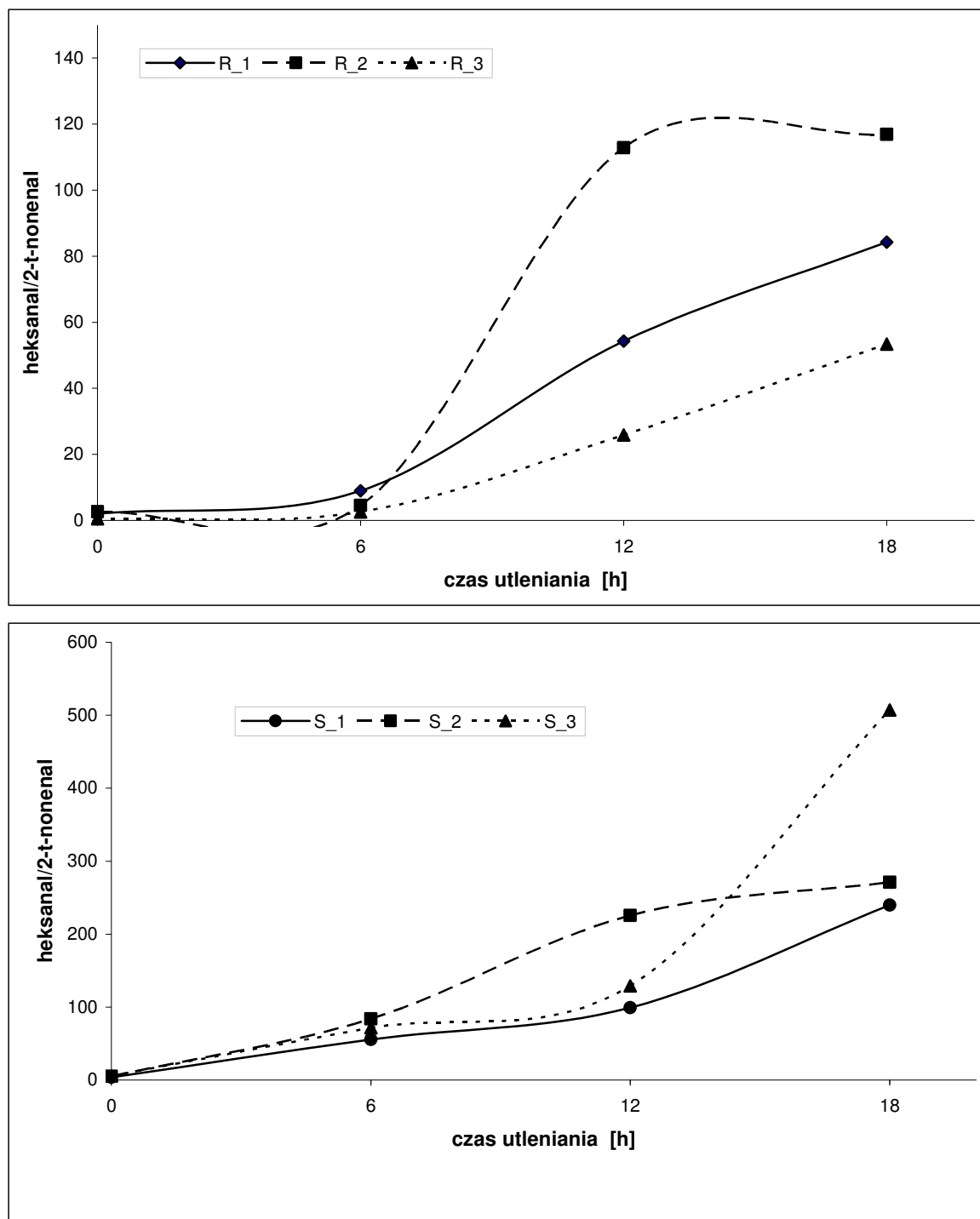


Rys. 32. Zależność stosunku powierzchni pików (heksanal / 2-*trans*-nonenal) od czasu naświetlania promieniowaniem UV (254 nm, 12 W) w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodnie z opisem w Tab. 18

Okresy indukcji wyznaczone na podstawie nowej metody UV/HS-SPME/GC/FID są trzy- do pięciokrotnie wyższe niż w przypadku testu Rancimat, można jednak zauważyć dużą korelację pomiędzy wynikami (Tab. 20). Wyższe okresy indukcji są spowodowane innym mechanizmem utleniania oraz zdecydowanie większą ilością próbki poddanej procesowi utlenienia. W przypadku techniki SPME oznaczane są tylko dwa związki, a nie wszystkie związki lotne. Natomiast w przypadku badań z zastosowaniem aparatu Rancimat oznacza się głównie krótkołańcuchowe kwasy: mrówkowy i octowy. W dodatku wspomniane markery powstają w reakcji utleniania specyficznych kwasów tłuszczowych: heksanal jest produktem utlenienia kwasu linolowego, a *trans*-non-2-enal – kwasu oleinowego. Zatem, dla różnych typów oleju, w zależności od ich charakterystycznego składu kwasów tłuszczowych, obserwuje się różne ilości powstających związków markerowych.

6.4.3 Oznaczenie stabilności oksydatywnej przy pomocy metody termicznej -HS-SPME/GC/FID

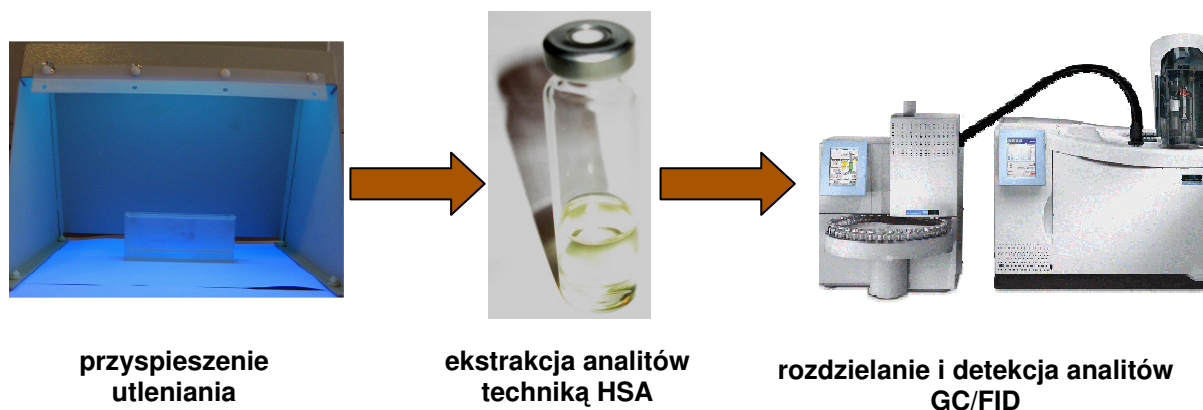
W celu porównania wpływu promieniowania ultrafioletowego i podwyższonej temperatury na powstawanie lotnych produktów reakcji utleniania, próbki badanych olejów poddano działaniu podwyższonej temperatury w czasie 0 - 24 godzin (80 °C- zmodyfikowany test Schaala). Po procesie utleniania próbki olejów przenoszono do fiolek do analizy fazy nadpowierzchniowej i termostatowano, a następnie lotne produkty ekstrahowano z zastosowaniem zoptymalizowanej procedury opartej na technice SPME. Na podstawie analizy chromatograficznej oznaczono zawartość związków markerowych i wykreślono krzywe procesu utleniania przedstawione na rysunku 33. Okresy indukcji wyznaczone w ten sposób są porównywalne z okresami indukcji wyznaczonymi z zastosowaniem testu Rancimat.



Rys. 33. Zależność stosunku powierzchni pików (heksanal / 2-trans-nonenal) od czasu działania podwyższonej temperatury w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18

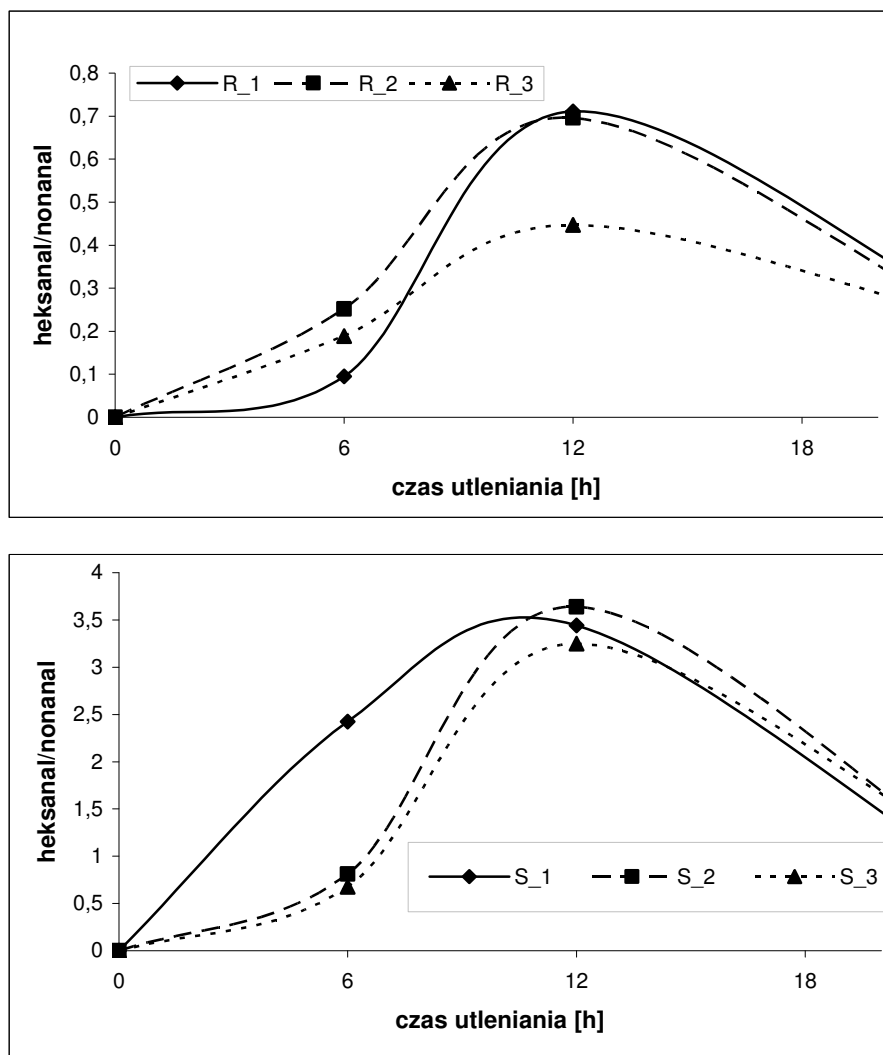
6.4.4 Oznaczenie stabilności oksydacyjnej przy pomocy metody UV-HSA/GC/FID

Schemat metodyki oznaczeń z zastosowaniem techniki analizy fazy nadpowierzchniowej na etapie izolacji analitów przedstawiono na rysunku 34. W przypadku tej metodyki, jako marker procesu utleniania zastosowano stosunek powierzchni pików heksanalu do nonanal. *Trans-non-2-enal*, który powstaje w niewielkich ilościach w trakcie utleniania, był niewykrywalny przy pomocy opracowanej metody, dlatego w celu wyznaczania krzywych utleniania i jednocześnie przy ocenie stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych zdecydowano się korzystać z nonanal (Rys. 35).



Rys. 34. Ogólna idea oznaczania lotnych produktów utleniania olejów według procedure UV/HSA/GC/FID

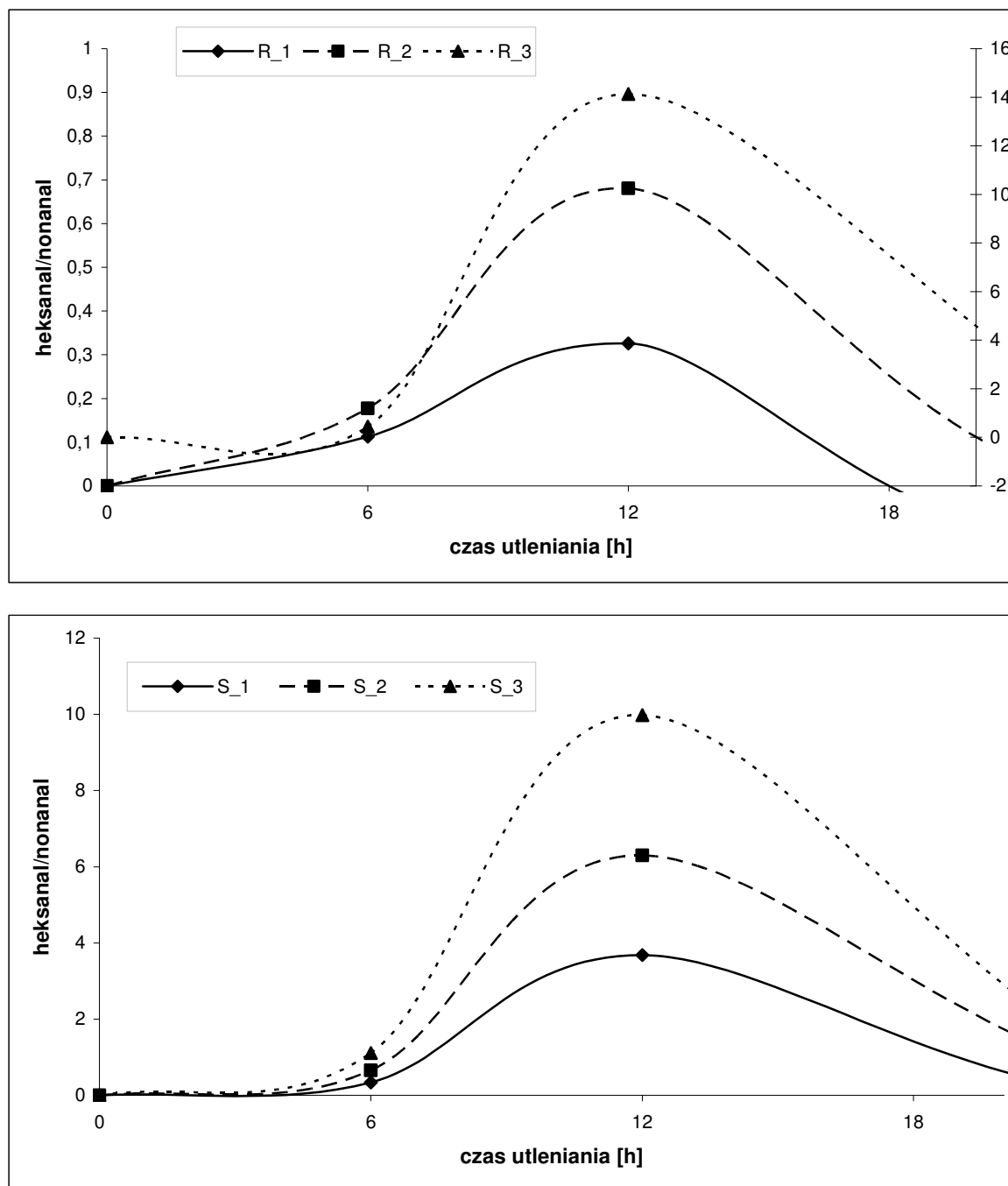
Okres indukcji wyznaczony na podstawie krzywej stosunku powierzchni wspomnianych dwóch markerów jest porównywalny z okresem indukcji wyznaczonym metodą Rancimat i około 3-krotnie krótszy od okresu indukcji wyznaczonego na podstawie opracowanej metody HS-SPME/GC, na podstawie stosunku powierzchni heksanal do *trans-non-2-enal*.



Rys. 35. Zależność stosunku powierzchni pików (heksanal / nonanal) od czasu naświetlania promieniowaniem UV (254 nm, 12 W) w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18

6.4.5 Oznaczenie stabilności oksydatywnej przy pomocy metody termicznej-HSA/GC/FID

Podobnie jak w przypadku metody HS-SPME/GC, w celu porównania wpływu promieniowania UV i podwyższonej temperatury, analizie poddano również próbki oleju utlenione przy pomocy zmodyfikowanego testu Schaala (olej przechowywany w cieplarni w temperaturze 80 °C) w czasie 0 – 24 godzin. Podobnie jak poprzednio uzyskano charakterystyczne krzywe procesu utleniania, na podstawie których wyznaczono okresy indukcji dla badanych próbek olejów (Rys. 36). Podobne wyniki uzyskano dla tych samych próbek oleju metodą HSA/GC/FID po poddaniu ich działaniu promieniowania ultrafioletowego w celu przyspieszenia utleniania (poprzedni rozdział).



Rys. 36. Zależność stosunku powierzchni pików (heksanal / nonanal) od czasu działania podwyższonej temperatury w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18

6.4.6 Porównanie metody UV-HS-SPME/GC/FID i testu Rancimat

Na podstawie przeprowadzonych wstępnych badań porównawczych stwierdzono, że adekwatne i najbardziej zbliżone do testu Rancimat wyniki pomiaru stabilności oksydacyjnej uzyskuje się stosując metodę HS-SPME/GC, poprzedzoną etapem przyspieszonego utleniania z zastosowaniem promieniowania ultrafioletowego. W celu wyznaczenia współczynników korelacji pomiędzy wspomnianą metodą a testem Rancimat,

powszechnie stosowanym w przemyśle, przebadano próbki różnych gatunków olejów roślinnych dostępnych na rynku polskim wyszczególnionych w tabeli 5. Oleje badano równolegle stosując test Rancimat i nowo opracowaną metodę UV-HS-SPME/GC/FID. Na podstawie krzywej utleniania próbek olejów wyznaczano okres indukcji dla obydwu metod (Tab. 19), a następnie współczynniki korelacji.

Tab. 19. Wartości okresów indukcji [h] i współczynników korelacji dla badanych próbek olejów roślinnych, numery próbek zgodne z opisem w tabeli 5

Nr próbki	Typ oleju	Okres indukcji [h]		Współczynnik korelacji		
		Rancimat	UV SPME	SPME/Rancimat	Rancimat/SPME	Średnia (Rancimat/SPME)
5	arachidowy	5,70	4,50	0,79	1,27	1,27
4	kukurydziany	5,09	4,00	0,79	1,27	1,27
21	oliwa	10,29	7,65	0,74	1,35	1,35
14	ryżowy	5,54	4,50	0,81	1,23	1,19±0,06
3	ryżowy	6,17	5,35	0,87	1,15	
16	rzepakowy	2,44	5,70	2,34	0,43	
13	rzepakowy	4,85	11,00	2,27	0,44	0,36±0,08
7	rzepakowy	5,55	11,40	2,05	0,49	
12	rzepakowy	5,54	14,30	2,58	0,39	
11	rzepakowy	5,00	14,80	2,96	0,34	
18	rzepakowy	4,32	15,20	3,52	0,28	
1	rzepakowy	5,65	15,25	2,70	0,37	
22	rzepakowy	4,46	16,30	3,65	0,27	
6	rzepakowy	4,70	17,20	3,66	0,27	
8	rzepakowy i słonecznikowy	5,53	12,65	2,29	0,44	
9	rzepakowy, słonecznikowy, oliwa	5,29	5,00	0,95	1,06	1,06
25	sezamowy	5,79	5,05	0,87	1,15	1,015
23	słonecznikowy	1,82	9,00	4,95	0,20	0,21±0,01
15	słonecznikowy	6,07	11,30	1,86	0,54	
19	słonecznikowy	2,77	12,60	4,55	0,22	
20	słonecznikowy	2,47	12,75	5,16	0,19	
10	słonecznikowy z oliwą	2,95	11,80	4,00	0,25	0,25
24	sojowy	2,35	10,50	4,47	0,22	0,26±0,05
17	sojowy	1,25	12,00	9,60	0,10	
2	sojowy	3,66	12,50	3,42	0,29	
26	z pestek winogron	2,68	4,80	1,79	0,56	0,56

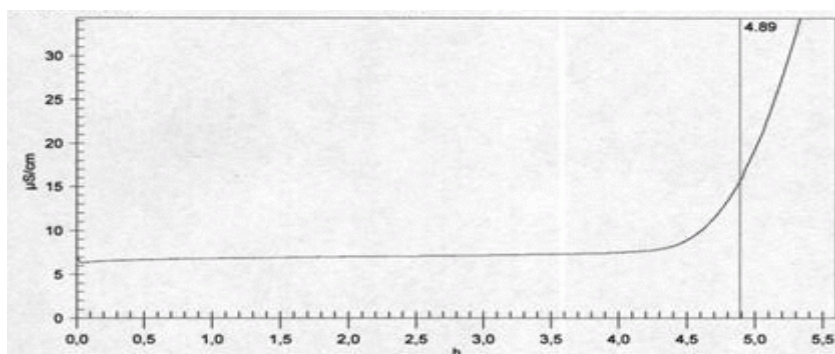
Wyznaczone wartości współczynników korelacji pomiędzy metodą Rancimat a nowo opracowaną metodą UV-HS-SPME/GC wynoszą odpowiednio: dla oleju słonecznikowego $0,21 \pm 0,01$, dla sojowego $0,26 \pm 0,05$, dla rzepakowego $0,36 \pm 0,08$, a dla ryżowego

$1,19 \pm 0,06$. Podobne współczynniki można również wyznaczyć dla innych typów oleju, konieczna jednak byłaby większa ilość próbek.

Różnice w wartościach współczynników korelacyjnych dla różnych typów oleju wynikają z ich różnego składu kwasów tłuszczowych, a w konsekwencji innego składu lotnych produktów utleniania badanych w prezentowanych metodach. Test Rancimat pozwala oznaczyć sumaryczną ilość związków lotnych uwolnionych w trakcie procesu utleniania, natomiast metoda HS-SPME/GC/FID określa jedynie stosunek zawartości dwóch charakterystycznych lotnych produktów utleniania. Na wspomniane różnice wpływa również zróżnicowana zawartość steroli, chlorofili i karotenoidów w różnych gatunkach olejów roślinnych, jednak pełna charakterystyka próbek olejów nie była przedmiotem rozprawy doktorskiej.

6.4.7 Oznaczenie stabilności oksydatywnej metodą Rancimat

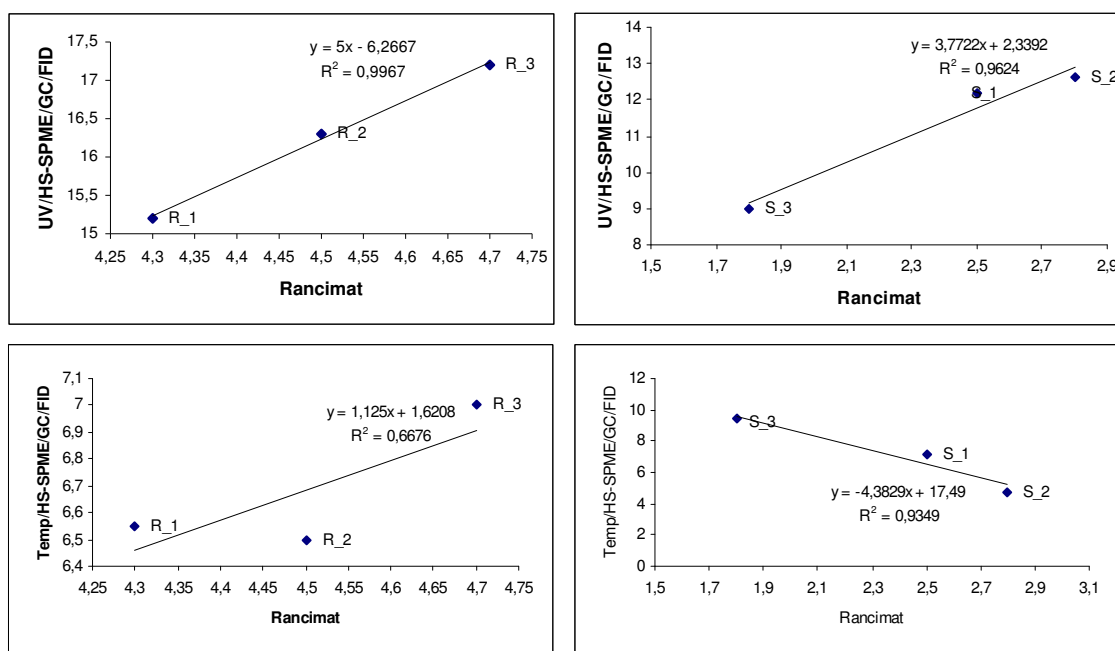
Stabilność oksydacyjną próbek olejów roślinnych oznaczono metodą Rancimat. Oznaczenia wykonano zgodnie z Polską Normą PN-EN ISO 6886:1997 w temperaturze $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Przykładowy wykres zależności przewodności elektrolitycznej od czasu utleniania przedstawiono na rysunku 37. Krzywą utleniania uzyskano dla jednego z badanych olejów rzepakowych.



Rys. 37. Wykres zależności przewodności elektrolitycznej roztworu wodnego lotnych produktów utleniania oleju od czasu natleniania; wykres pochodzi z badań własnych

Okresy indukcji badanych olejów wyznaczone metodą Rancimat przedstawiono w tabeli 20. Otrzymane wyniki nie wykazują zbieżności z okresami indukcji wyznaczonymi na podstawie liczby nadtlenkowej, natomiast zauważalna jest silna korelacja z metodą HS-SPME/GC/FID. Większa korelacja występuje, gdy jako czynnik przyspieszający utlenienie zastosowano promieniowanie ultrafioletowe (Rys. 38).

Dobra korelacja pomiędzy techniką Rancimat i UV/HS-SPME/GC/FID jest związana z podobną grupą związków oznaczanych tymi technikami (drugorzędowe produkty utleniania). Obie metody umożliwiają ocenę stabilności oksydatywnej próbki na podstawie lotnych produktów utleniania: krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych w przypadku Rancimat i aldehydów w przypadku UV/HS-SPME/GC/FID. Natomiast liczba nadtlenkowa umożliwia oznaczenie w badanej próbce zawartości nadtlenków, będących pierwszorzędowymi produktami utleniania. Stąd właśnie wynikają różnice w korelacji pomiędzy porównywanymi metodami.



Rys. 38. Korelacja pomiędzy okresami indukcji wyznaczonymi metodą Rancimat a HS-SPME/GC/FID uzyskanymi dla rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S) po procesie utleniania poprzez naświetlanie promieniowaniem UV oraz działaniem podwyższonej temperatury, numery próbek zgodne z opisem w tabeli 18

Wartości okresów indukcji wyznaczone na podstawie metody UV/HS-SPME/GC/FID są dwa do trzech razy wyższe, niż wartości uzyskane przy zastosowaniu techniki Rancimat, ale wykazują podobną tendencję. Powodem wspomnianych różnic może być temperatura w jakiej znajdowały się próbki oleju podczas etapu utleniania – w metodzie Rancimat 120 °C, a w SPME 30 °C. Co więcej, warunki panujące podczas naświetlania promieniowaniem UV są bardziej zbliżone do naturalnych, jakim podlegają oleje przechowywane w warunkach kuchni domowych. Lepszą korelację obu metod uzyskano dla olejów rzepakowych niż słonecznikowych.

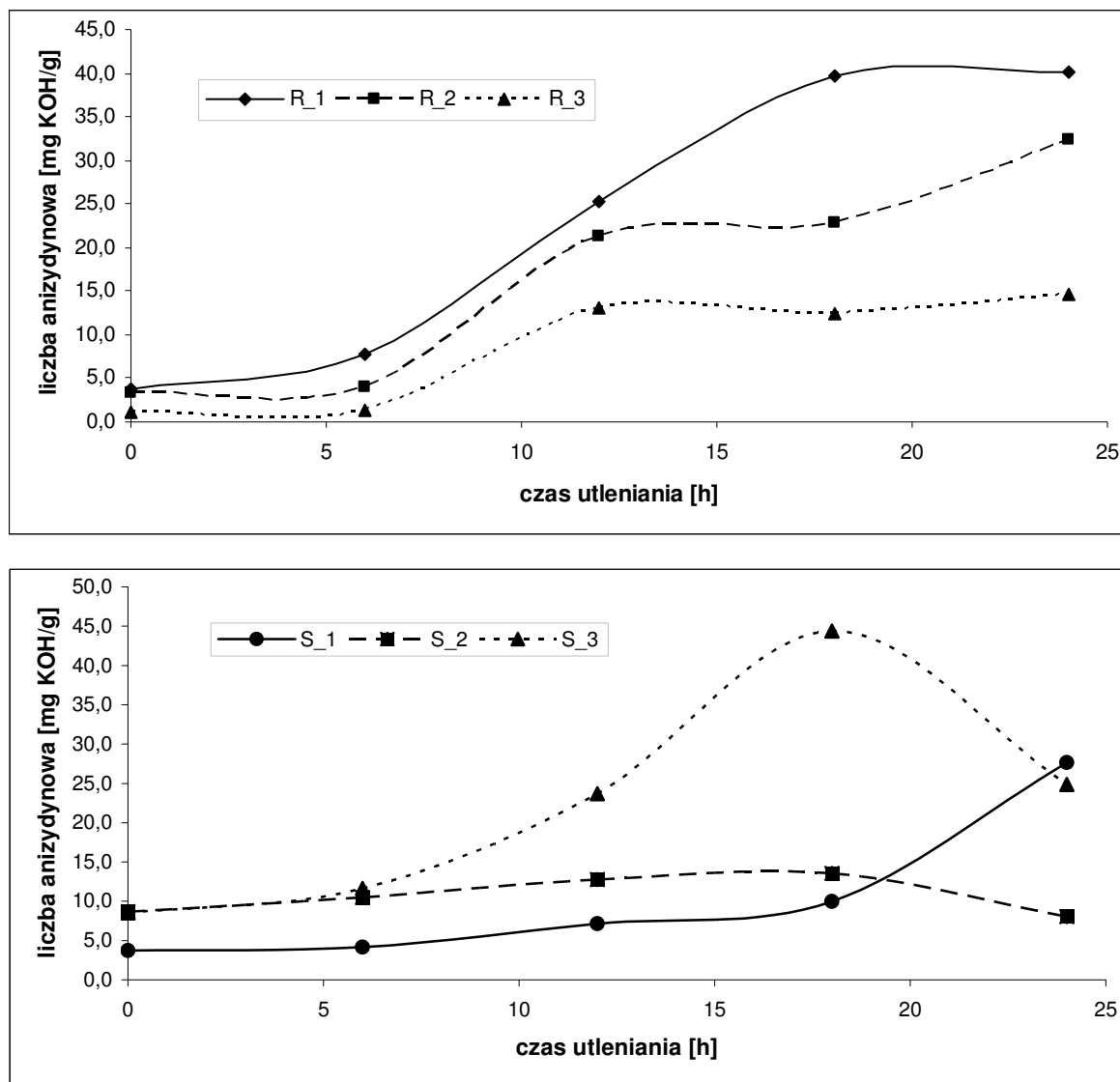
Tab. 20. Okresy indukcji wyrażone w godzinach wyznaczone różnymi metodami stosowanymi w ocenie stabilności oksydacyjnej wybranych próbek olejów roślinnych

Typ oleju	Numer próbki	Rancimat	HS-SPME/GC/FID		PV		A _n V		Manostat	DSC
			UV	Temp.	UV	Temp.	UV	Temp.		
rzepakowy	R_1	4,30	15,20	6,55	4,90	4,05	5,15	5,20	1,90	1,40
	R_2	4,50	16,30	6,50	5,70	3,90	6,85	6,20	2,10	1,50
	R_3	4,70	17,20	6,90	10,00	4,45	15,80	6,60	2,30	1,90
słonecznikowy	S_1	2,50	12,20	7,20	4,60	4,40	3,00	15,10	1,20	1,10
	S_2	2,80	12,60	4,75	3,25	5,54	6,00	6,85	1,30	1,20
	S_3	1,80	9,00	9,40	5,30	4,15	12,70	8,60	0,70	0,60

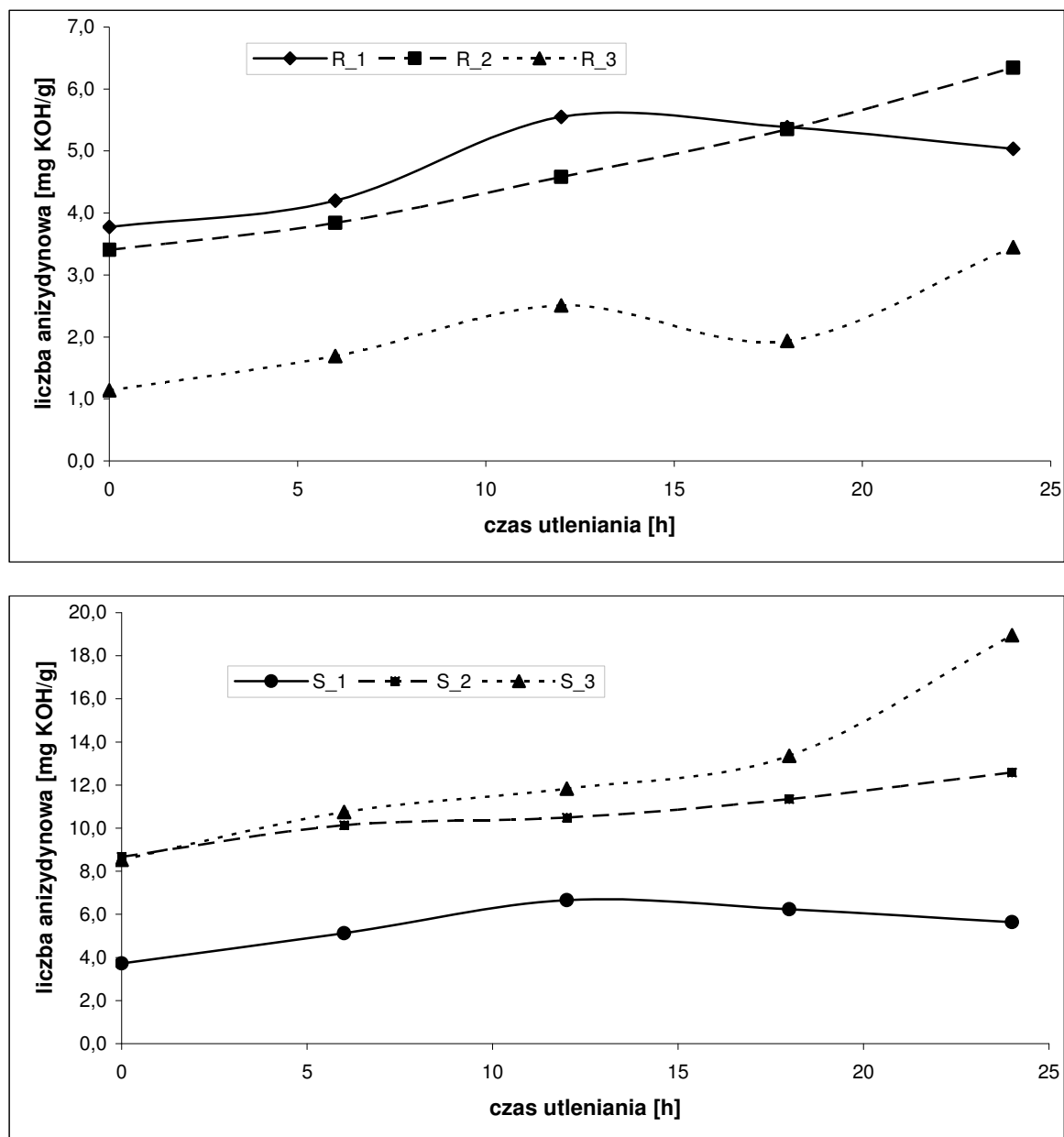
6.4.8 Oznaczanie zmian liczby anizydynowej w czasie utleniania

W trakcie postępującego procesu utleniania pierwszorzędowe produkty zostają przekształcone w lotne związki (wtórne produkty utleniania), które można oznaczyć przy pomocy liczby *p*-anizydynowej (A_nV). Dla wybranych próbek olejów roślinnych oznaczono również liczbę anizydynową, korzystając z metody opisanej w Polskiej Normie PN-EN ISO 6885:2001. Liczbę anizydynową oznaczano w olejach świeżych tuż po ich zakupie w sklepie oraz w próbkach poddanych procesowi przyspieszonego utleniania poprzez działanie podwyższonej temperatury (80 °C) (Rys. 39) lub promieniowania ultrafioletowego (254 nm, 12 W) (Rys. 40). Oleje utleniano przez 0 - 24 godzin, poddając analizie próbki pobierane co 6 godzin. Każdą analizę wykonywano trzykrotnie i do oznaczeń końcowych wykorzystano wartości średnie z tych pomiarów.

Na podstawie uzyskanych zależności wartości liczby anizydynowej od czasu naświetlania promieniowaniem UV lub od czasu utrzymywania w podwyższonej temperaturze wykreślono krzywe obrazujące stabilność oksydacyjną badanych olejów.



Rys. 39. Zależność liczby anizydynowej od czasu utrzymywania próbki w podwyższonej temperaturze w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18



Rys. 40. Zależność liczby anizydynowej od czasu naświetlania promieniowaniem UV (254 nm, 12 W) w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18

6.4.9 Zależność wskaźnika Totox od czasu utleniania

W celu wyznaczenia aktualnego stanu (stopnia utlenienia) oleju należy określić sumę zarówno pierwotnych jak i wtórnych produktów utlenienia. Wartość tę wyraża wskaźnik Totox, który jest sumą wartości podwojonej liczby nadtlenkowej i liczby anizydynowej.

$$L \text{ Totox} = 2 \times PV + A_nV$$

gdzie: PV – liczba nadtlenkowa

A_nV – liczba anizydynowa

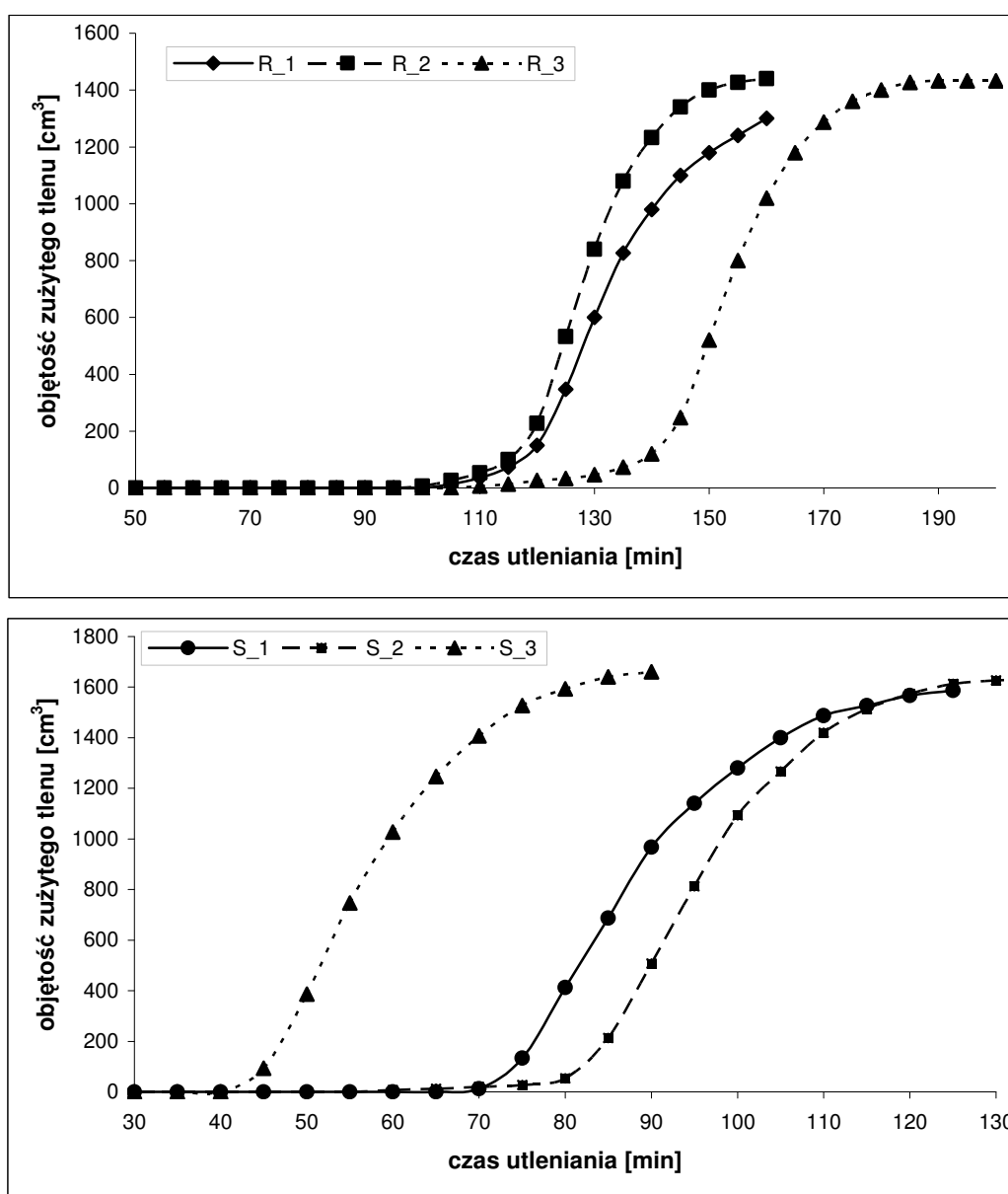
Wartości wyznaczonej liczby nadtlenkowej, anizydynowej oraz wskaźnika Totox dla wybranych olejów na poszczególnych etapach utlenienia przedstawiono w tabeli 21.

Tab. 21. Liczba nadtlenkowa (PV), anizydynowa (A_nV) i wskaźnik Totox dla zbadanych olejów; numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18

Numer próbki	Typ oleju	Czas utleniania [h]	Działanie promieniowania UV			Działanie temperatury 80 °C		
			PV	A_nV	TOTOX	PV	A_nV	TOTOX
R_1	rzepakowy	0	7	3,8	17,8	7	3,8	17,8
		6	18	4,2	40,2	41	7,7	89,7
		12	42	5,5	89,5	51	25,3	127,3
		24	49	5	103	57	40,1	154,1
R_2		0	8	3,4	19,4	8	3,4	19,4
		6	15	3,8	33,8	33	4	70
		12	47	4,6	98,6	69	21,3	159,3
		24	51	6,3	108,3	52	32,4	136,4
R_3		0	3	1,1	7,1	3	1,1	7,1
		6	6	1,7	13,7	98	1,4	197,4
		12	18	2,5	38,5	122	13	257
		24	97	3,5	197,5	199	14,6	412,6
S_1	słonecznikowy	0	7	3,7	17,7	7	3,7	17,7
		6	33	5,1	71,1	51	4,2	106,2
		12	57	6,7	120,7	103	7,2	213,2
		24	69	5,6	143,6	92	27,7	211,7
S_2		0	5	8,7	18,7	5	8,7	18,7
		6	28	10,1	66,1	63	10,5	136,5
		12	48	10,5	106,5	101	12,8	214,8
		24	72	12,6	156,6	94	8	196
S_3		0	9	8,5	26,5	9	8,5	26,5
		6	45	10,7	100,7	67	11,6	145,6
		12	61	11,8	133,8	104	23,7	231,7
		24	78	19	175	123	24,8	270,8

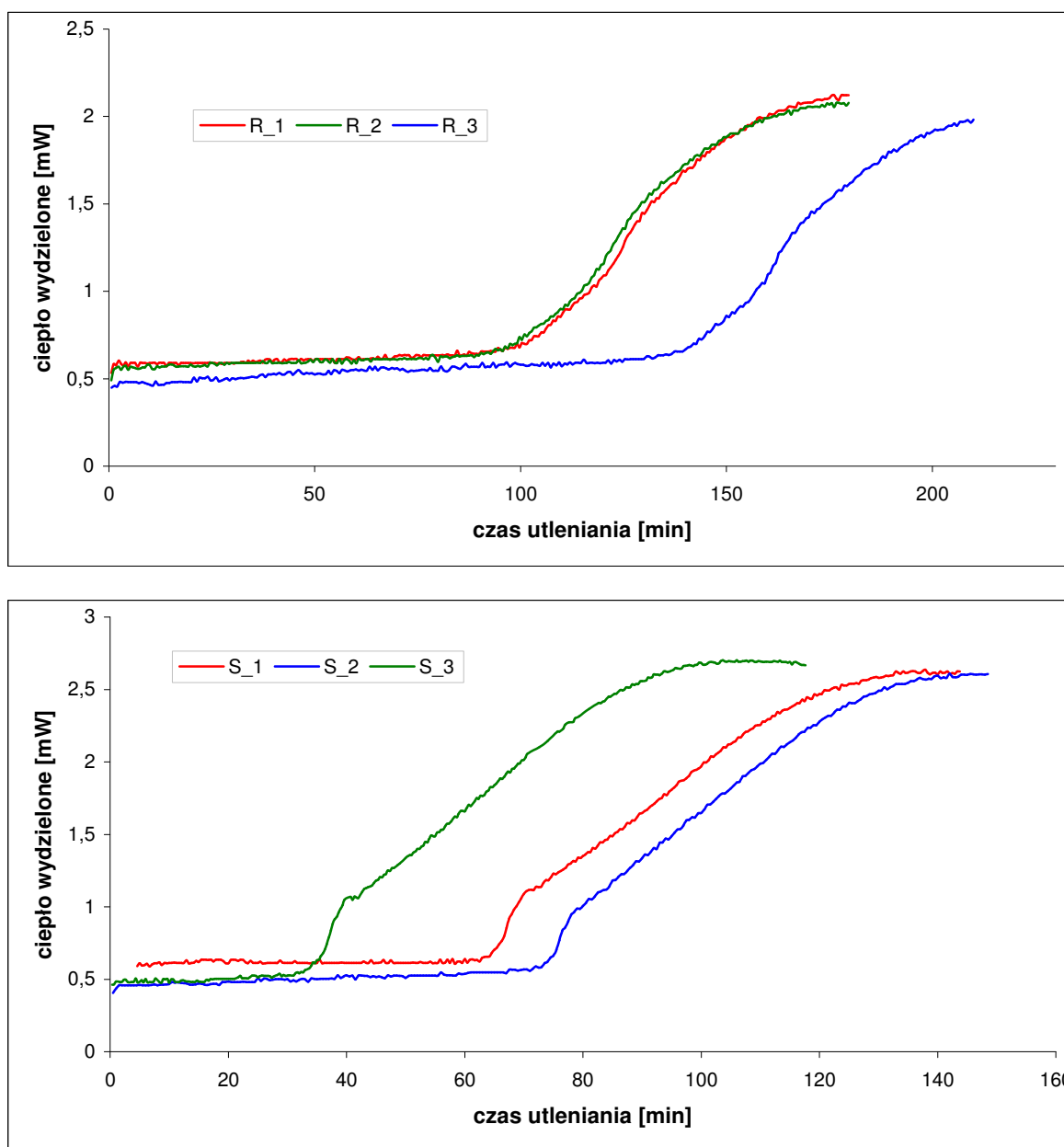
6.4.10 Oznaczenie stabilności oksydatywnej przy pomocy metody manostatycznej oraz testu z wykorzystaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC)

Dla sześciu wybranych próbek olejów roślinnych przeprowadzono badanie stabilności oksydatywnej metodą manostatyczną. Olej utleniano czystym osuszonym tlenem (płuczki z KOH i żelem krzemionkowym) w podwyższonej temperaturze 120 °C, podobnie jak w przypadku testu Rancimat. Na podstawie uzyskanych krzywych procesu utleniania, graficznie wyznaczono okresy indukcji badanych olejów. Wykresy obrazujące zależność zużytego w procesie utleniania tlenu w funkcji czasu reakcji przedstawiono na rysunku 41. Uzyskane wyniki przedstawione są w tabeli 20.



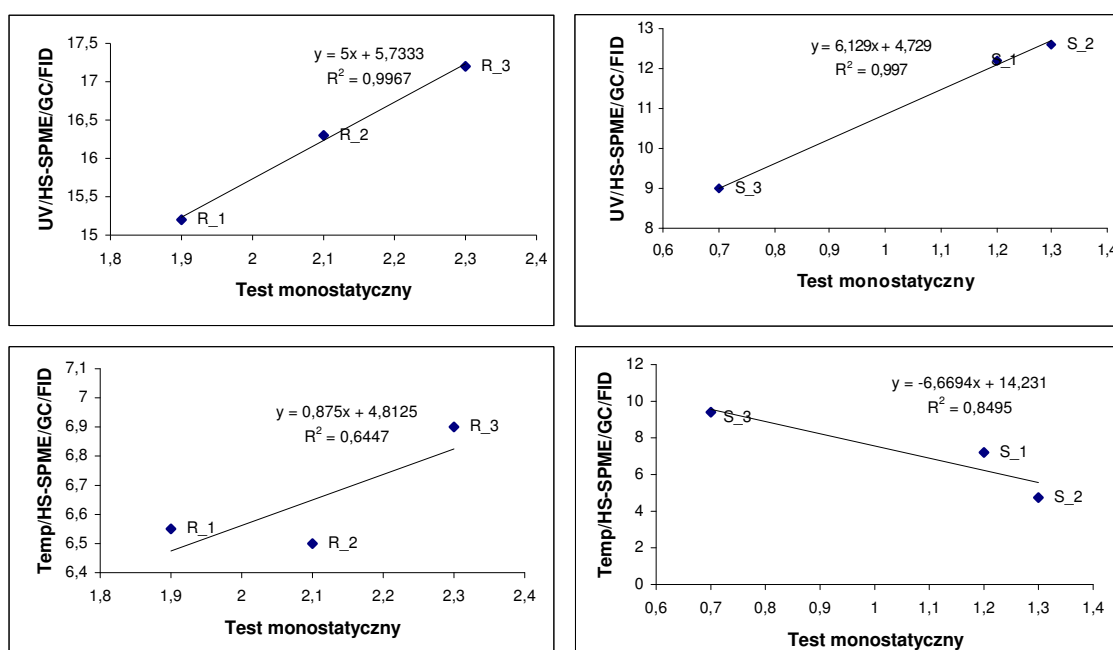
Rys. 41. Zużycie tlenu w trakcie procesu utleniania w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18

Opisane wcześniej wybrane oleje poddano także procesowi utlenienia z zastosowaniem testu wykorzystującego różnicową kalorymetrię skaningową (DSC). Niewielką ilość próbki oleju (ok. 1g) umieszczano w termostacie kalorymetru różnicowego w temperaturze 120 °C. przepuszczając przez próbkę tlen. W trakcie procesu utleniania rejestrowano zmiany termiczne zachodzące w próbce, które zobrazowano w formie krzywej przedstawiającej kinetykę utleniania, na podstawie której, podobnie jak poprzednio, graficznie wyznaczono okres indukcji badanego oleju (Tab. 20, Rys. 42).



Rys. 42. Wydzielenie ciepła w trakcie procesu utleniania w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 18

Charakterystyka utleniania analizowanych próbek olejów roślinnych jest bardzo podobna zarówno dla wyników uzyskanych na podstawie techniki DSC, jak i testu manostatycznego. Wartości okresów idukcji obliczone na podstawie wyników uzyskanych przy pomocy wspomnianych technik są dwukrotnie niższe niż wyniki uzyskane na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem aparatu Rancimat, ale również wykazują podobną tendencję. Wszystkie pomiary przeprowadzone dla powyższych trzech metod zostały wykonane w temperaturze 120 °C.

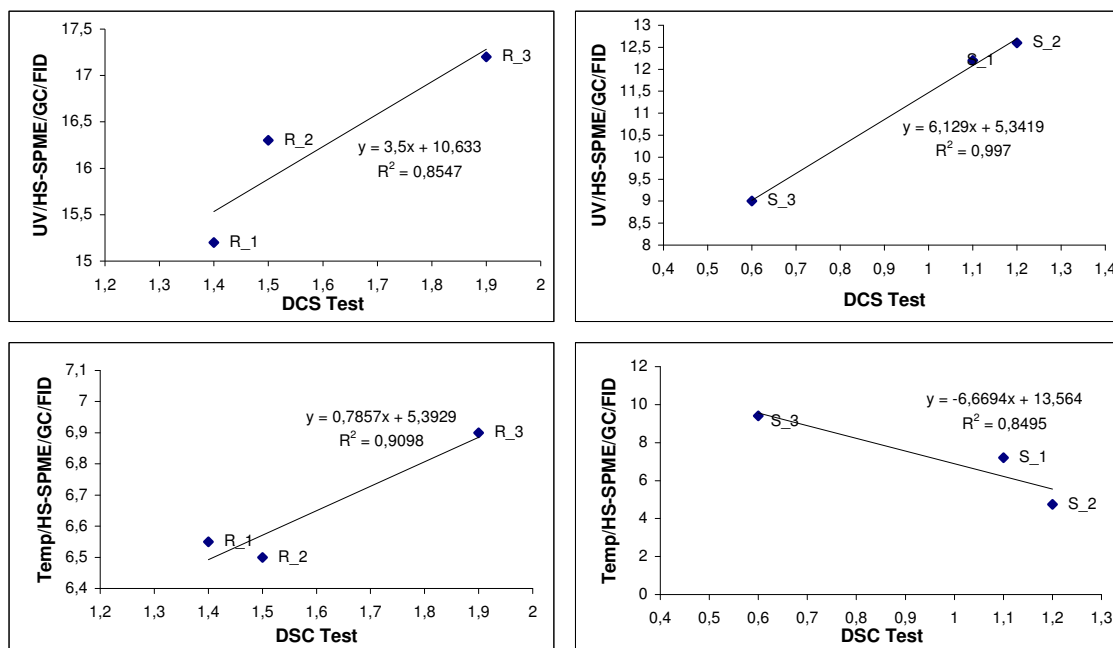


Rys. 43. Korelacja pomiędzy metodą manostatyczną a HS-SPME/GC/FID uzyskana dla rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S) po procesie utleniania poprzez naświetlanie promieniowaniem UV oraz działaniem podwyższonej temperatury, numery próbek zgodne z opisem w tabeli 18

Analizując rysunki 43 i 44 można zauważyć bardzo dobrą korelację pomiędzy metodą DSC i testem manostatycznym a nowo opracowaną metodą UV/HS-SPME/GC/FID, charakteryzowaną przez współczynnik korelacji rzędu $R^2 = 0,99$. Najśłabszą korelację obserwuje się pomiędzy termicznym utlenianiem (80 °C) w połączeniu z metodą HS-SPME/GC/FID a wspomnianymi technikami, zwłaszcza dla olejów słonecznikowych.

Dowodzi to słuszności tezy, iż promieniowanie UV jest lepszym i bardziej zbliżonym do naturalnych procesów czynnikiem przyspieszającym utlenianie niż podwyższona temperatura. Zalety fotoutleniania jako testu przyspieszonego utleniania już w latach 60-tych dostrzegł Moser, jednak z uwagi na niedoskonałą w tamtych czasach aparaturę wystąpiły problemy z kontrolowaniem procesu utleniania i opracowaniem odpowiednich procedur analitycznych [Moser i in., 1965]. Postępujący rozwój technik chromatograficznych

i wprowadzenie do praktyki analitycznej techniki SPME umożliwiło opracowanie prezentowanej procedury analitycznej. Dobra korelacja procedury UV/HS-SPME/GC/FID z metodą Rancimat, a także z technikami DSC i manostatyczną, wskazuje na możliwość wprowadzenia nowo opracowanej procedury do praktyki analitycznej, co powinno pozwolić na bardziej efektywne oznaczanie stabilności oksydacyjnej olejów.



Rys. 44. Korelacja pomiędzy metodą DSC a HS-SPME/GC/FID uzyskana dla rafinowanych olejów rzepakowych (R) i słonecznikowych (S) po procesie utleniania poprzez naświetlanie promieniowaniem UV oraz działaniem podwyższonej temperatury, numery próbek zgodne z opisem w tabeli 18

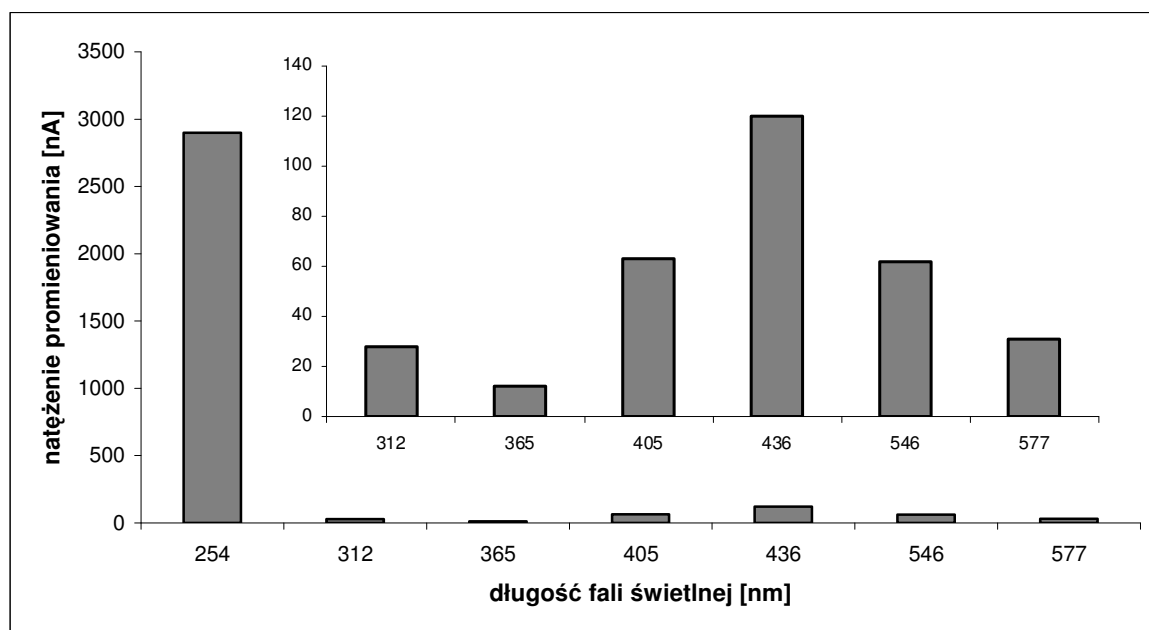
6.5 Dobór optymalnych warunków procesu przyspieszonego utleniania oleju – naświetlania promieniowaniem UV *

Głównym celem poniższej części badań było dobranie odpowiednich warunków procesu naświetlania promieniowaniem ultrafioletowym jako sposobu przyspieszonego utleniania olejów roślinnych. W ramach badań dobrano powierzchnię naświetlania i grubość filmu oleju, a także odległość próbki od źródła światła i moc promieniowania ultrafioletowego.

Zbadano także rozkład i intensywność promieniowania stosowanej w badaniach lampy rtęciowej. Badania przeprowadzono pod opieką dr inż. Ryszarda Signerskiego, w Katedrze Fizyki Zjawisk Elektronowych Politechniki Gdańskiej. Uzyskane wyniki przedstawiono

* Wyniki opublikowane: J. Gromadzka, W. Wardencki, "Selection of UV irradiation conditions for accelerated edible oil oxidation procedure", str. 11-19 w "Advances in research and technology of rapeseed oil", red. E Szyłk, Wyd. Nauk. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń 2009

w formie diagramu na rysunku 45. Wynika z niego, iż najintensywniej emitowaną przez stosowane w badaniach świetlówki UV jest fala o długości 254 nm. Pozostałe długości fali charakteryzują się intensywnością pomijalnie małą w porównaniu z falą główną. Jest to zgodne z typowym rozkładem promieniowania dla niskociśnieniowych lamp rtęciowych, w których ok. 90 % emitowanej energii przypada na długość fali 254 nm [Godlewski 1997].

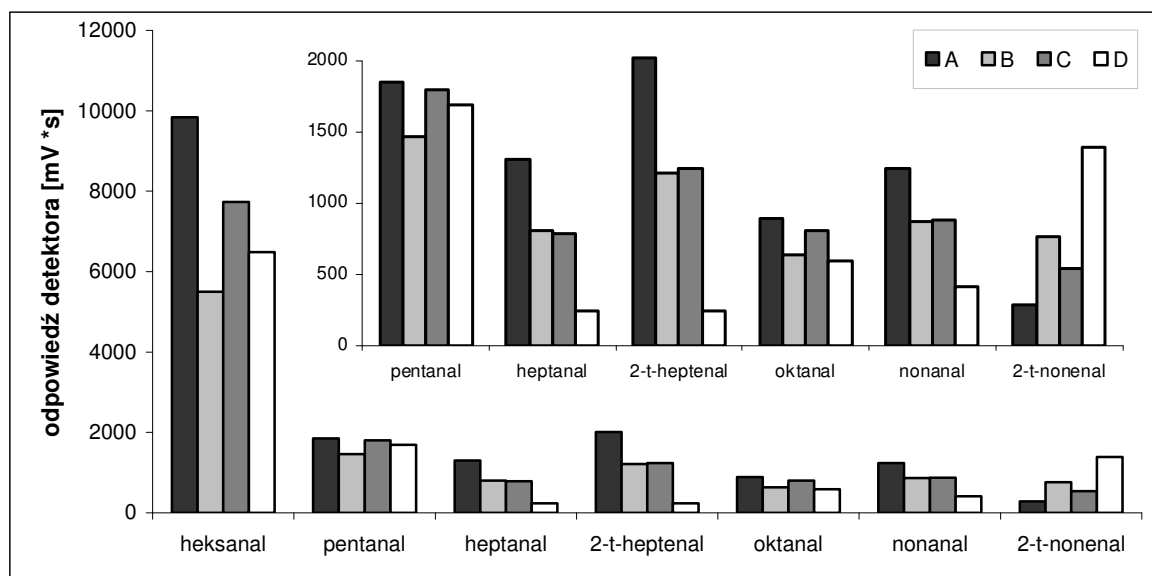


Rys. 45. Natężenie promieniowania podstawowych linii emitowanych przez niskociśnieniową lampę rtęciową w odległości 2,5 cm

6.5.1 Powierzchnia naświetlanego oleju

Pierwszym etapem badań było dobranie powierzchni naświetlania/utleniania oleju. W doświadczeniu zastosowano cztery kuwety kwarcowe o takiej samej objętości (10 cm^3) i różnych powierzchniach: kuweta A - 35 cm^2 i 3 mm wysokości, kuweta B - 20 cm^2 i 5 mm wysokości, kuweta C - 15 cm^2 i 7 mm wysokości oraz kuweta D - 10 cm^2 i 10 mm wysokości. Każda z kuwet była zamykana przykrywką wykonaną ze szkła kwarcowego przepuszczającego promieniowanie UV. Promieniowanie ultrafioletowe działa powierzchniowo, dlatego próbki oleju o najcieńszym filmie powinny najszybciej ulegać procesowi utleniania, gdyż dociera do nich najwięcej energii w przeliczeniu na jednostkę objętości. Próbkę oleju naświetlano przez 6 godzin promieniowaniem ultrafioletowym o mocy 12 W i maksimum emisji przy długości fali 254 nm. Lotne produkty utlenienia izolowano stosując opracowaną wcześniej techniką SPME w połączeniu z GC/FID.

Rysunek 46, zgodnie z przewidywaniami, pokazuje iż najwyższą odpowiedź detektora (najwyższe stężenie analitów w badanej próbce) uzyskano dla największej powierzchni naświetlanej próbki czyli najcieńszego filmu oleju (kuweta A 35 cm²). Jedynym wyjątkiem był 2-*trans*-nonenal, dla którego najwyższą odpowiedź detektora zaobserwowano w próbkach umieszczonych w kuwecie o najmniejszej powierzchni naświetlania. Wspomniane zjawisko mogło być spowodowane nie tyle powstawaniem większych ilości wspomnianego związku ile zróżnicowanymi zdolnościami sorpcyjnymi włókna SPME w stosunku do analizowanych związków. Im bardziej olej ulega utlenieniu tym więcej związków lotnych znajduje się w fazie nadpowierzchniowej, co powoduje zwiększenie konkurencji pomiędzy wspomnianymi związkami do centrów sorpcyjnych w fazie stacjonarnej włókna. Na tej podstawie można stwierdzić, że powinowactwo 2-*trans*-nonenalu do fazy stacjonarnej włókna jest zdecydowanie większe w porównaniu z pozostałymi analitami. Jednakże zauważono, iż zwiększanie powierzchni naświetlania przy zachowaniu takiej samej objętości próbek oleju znacząco przyspiesza proces utleniania próbki.

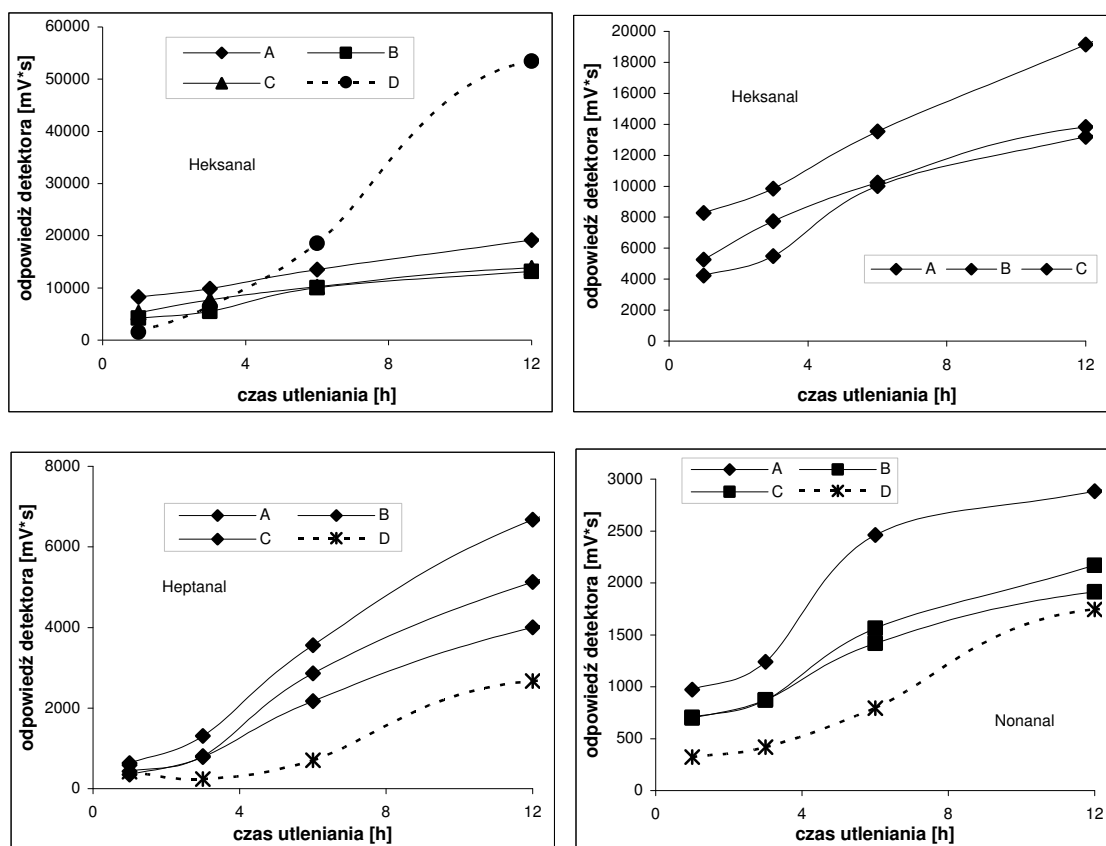


Rys. 46. Wpływ powierzchni naświetlania na powierzchnię pików wybranych markerów procesu utleniania wyekstrahowanych z oleju rzepakowego naświetlanego promieniowaniem UV (6h, 12 W, 254 nm); wyniki uzyskano stosując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HS-SPME/GC/FID); włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, faza stacjonarna 50/30 μ m; kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μ m, (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

6.5.2 Przebieg procesu fotoutleniania

W celu zbadania przebiegu procesu utleniania próbki oleju rzepakowego, umieszczone w czterech kuwecie o różnej powierzchni naświetlania i takiej samej objętości, poddano

działaniu promieniowania UV w przedziale czasowym od 0 do 12 godzin. W trakcie procesu utleniania pobierano próbki i oznaczano w nich zawartość lotnych aldehydów stosując technikę SPME/GC/FID. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 47, który obrazuje zmiany stężenia markerów utleniania w jednostce czasu. Próbka oleju znajdująca się w kuwecie A (największa powierzchnia naświetlania i najcieńszy film oleju) została utleniona najszybciej. Jednakże na podstawie analizy próbek oleju pobranych z kuwety B, zaobserwowano gwałtowny wzrost powierzchni pików oznaczanych związków. Na podstawie przedstawionych poniżej krzywych kinetyki utleniania stwierdzono, że kuweta B zapewnia najlepsze warunki utleniania oleju w celu graficznego wyznaczenia okresu indukcji. Dodatkowo, okres indukcji, wyznaczony na podstawie próbek oleju pobranych z kuwety B, spełnia wymagania stawiane metodom przyspieszonego oznaczania stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych, dla których wartość wspomnianego parametru powinna zawierać się w przedziale 1 - 5 godzin.

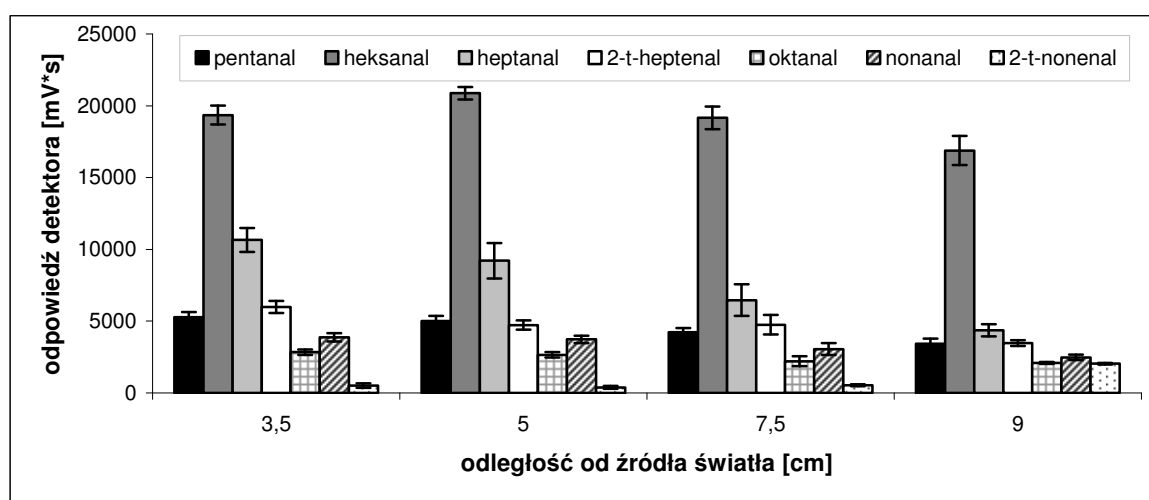


Rys. 47. Zależność przebiegu procesu utleniania (heksanal, heptanal, nonanal) od grubości filmu naświetlanego oleju na przykładzie rafinowanego oleju rzepakowego naświetlanego promieniowaniem UV (6 h, 12 W, 254 nm); wyniki uzyskano stosując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HS-SPME/GC/FID); włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, faza stacjonarna 50/30 μm ; kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

6.5.3 Odległość powierzchni oleju od źródła światła

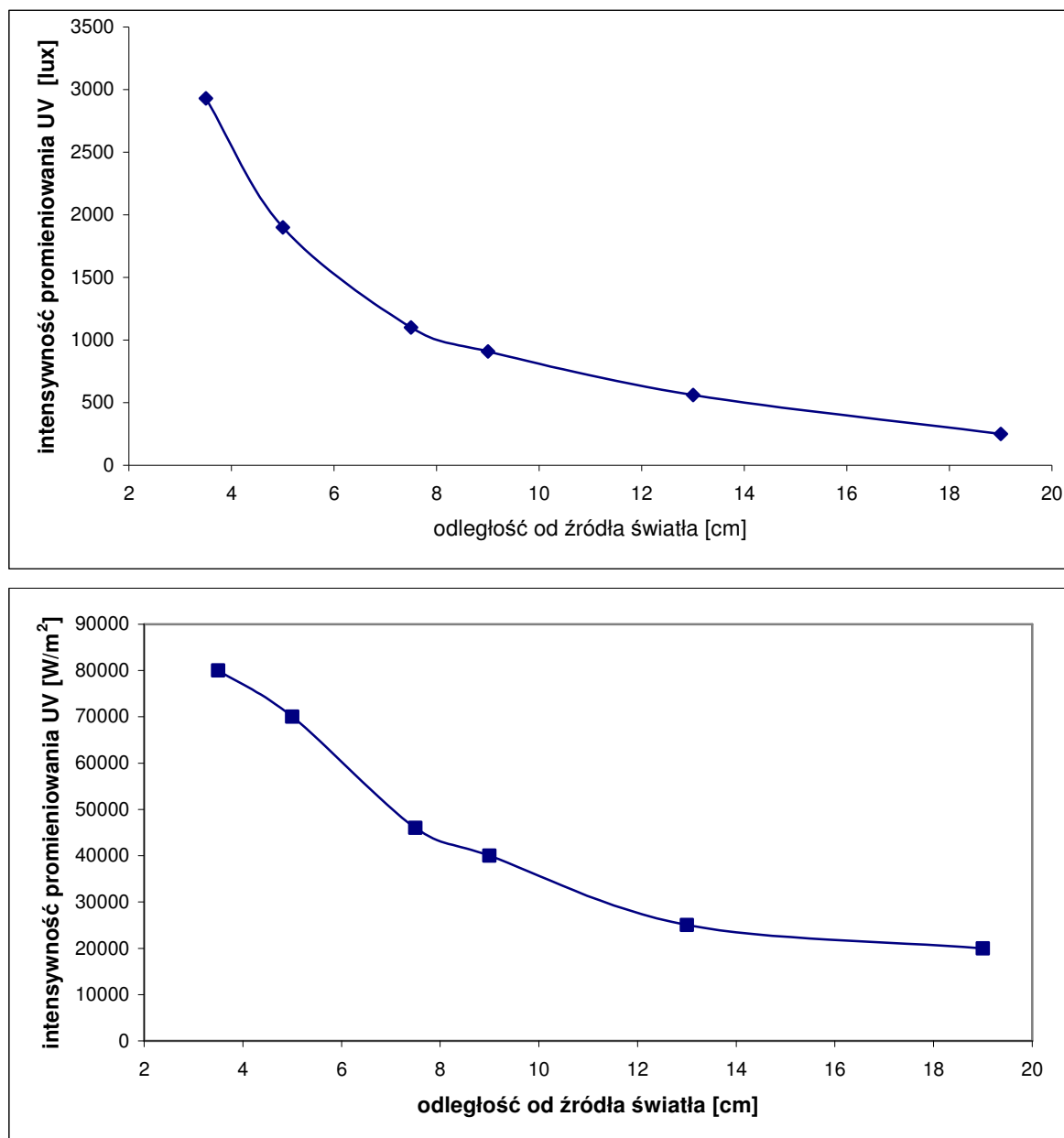
Kolejnym etapem badań było dobranie najodpowiedniejszej z punktu widzenia procesu utleniania odległości pomiędzy powierzchnią próbki oleju a źródłem promieniowania świetlnego. Zbadano 4 różne odległości (9 cm, 7,5 cm, 5 cm, 3,5 cm) działając na próbki oleju umieszczone w kuwecie A promieniowaniem UV o mocy 12 W i maksimum emisji 254 nm. Wszystkie próbki naświetlano przez 6 godzin, a uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 48.

Zgodnie z oczekiwaniami największa ilość związków lotnych została wykryta w próbkach naświetlanych przy najmniejszej odległości oleju od lampy UV. Jest to spowodowane faktem iż promieniowanie UV, podobnie jak inne rodzaje promieniowania świetlnego, ma charakter rozproszony. Im większa odległość pomiędzy źródłem światła i próbką, tym mniejsza energia jest przekazywana do próbki na jednostkę objętości, tym samym olej będzie utleniany wolniej. Założenie to potwierdzają uzyskane wyniki. Podobnie jak w przypadku poprzedniego doświadczenia tylko 2-trans-nonenal wykazuje odwrotną charakterystykę w porównaniu z pozostałymi analitami.



Rys. 48. Wpływ odległości pomiędzy źródłem światła a powierzchnią próbki na powierzchnię pików wybranych markerów utleniania na przykładzie rafinowanego oleju rzepakowego naświetlanego promieniowaniem UV (6 h, 12 W, 254 nm); wyniki uzyskano stosując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HS-SPME/GC/FID); włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, faza stacjonarna 50/30 μm ; kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

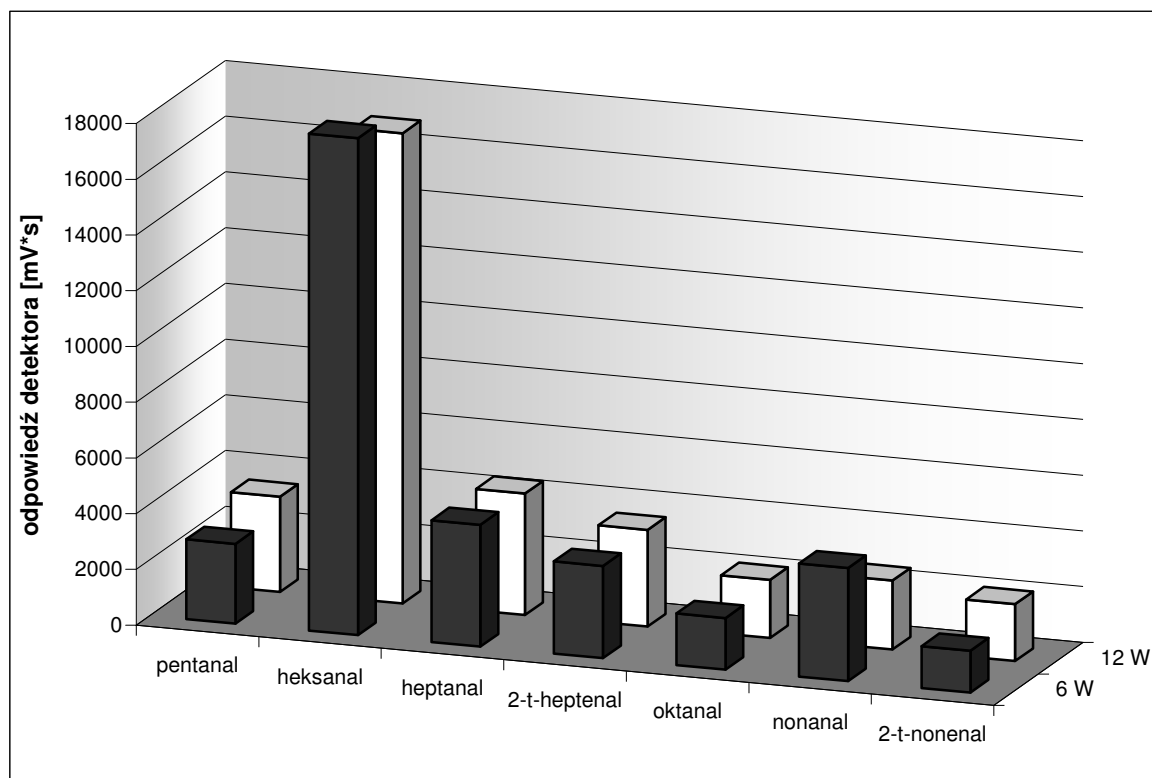
Oznaczono również natężenie promieniowania świetlnego w zależności od odległości próbki oleju od źródła światła. Zgodnie z przewidywaniami, wraz ze zwiększającą się odległością natężenie promieniowania maleje (Rys. 49).



Rys. 49. Zależność pomiędzy odległością od źródła światła a intensywnością promieniowania UV wyznaczona przy pomocy miernika natężenia światła

6.5.4 Wpływ mocy świetlówek na przebieg procesu utleniania olejów roślinnych

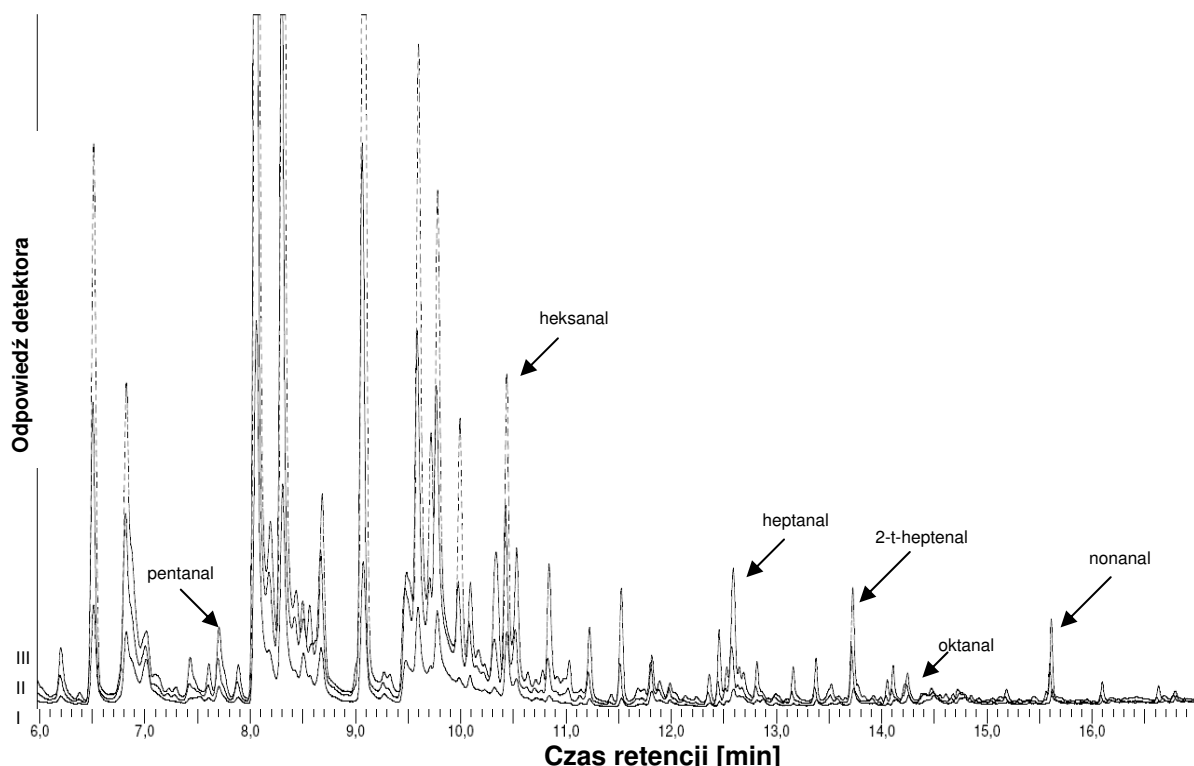
W celu dopełnienia badań sprawdzono również wpływ mocy naświetlania na dynamikę powstawania lotnych produktów utleniania olejów. W tym wypadku próbki oleju naświetlano w takich samych warunkach lampami o mocy 6 i 12 W. Jak się spodziewano lepsze rezultaty, czyli szybsze utlenienie próbki oleju osiągnięto stosując świetłówki o mocy 12 W (Rys. 50).



Rys. 50. Wpływ mocy świetlówek UV na powierzchnię pików wybranych markerów utleniania na przykładzie rafinowanego oleju rzepakowego naświetlanego promieniowaniem UV (6 h, 12 W, 254 nm); wyniki uzyskano stosując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HS-SPME/GC/FID); włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, faza stacjonarna 50/30 μm ; kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

6.5.5 Analiza próbek rzeczywistych

Stężenie produktów utleniania wzrasta wraz z czasem oddziaływania promieniowania UV na badaną próbkę oleju. Zjawisko to doskonale ilustruje rysunek 51, na którym widoczne są nałożone na siebie trzy chromatogramy uzyskane dla tego samego oleju utlenianego w tych samych warunkach, ale przez różny okres czasu. Analizie poddano próbki pobrane po 1, 3 i 6 godzinach procesu utleniania. Wyraźny wzrost powierzchni pików zaobserwowano dla heksanal i nonanal – związków wytypowanych jako główne markery procesu fotoutleniania.



Rys. 51. Chromatogramy lotnych produktów utleniania rafinowanego oleju rzepakowego (olej Kujawski uzyskany bezpośredni z ZT Kruszwica) po 1 h (I), 3 h (II) i 6 h (III) naświetlania promieniowaniem UV (kuweta A, odległość pomiędzy powierzchnią oleju i lampą UV 9 cm, warunki naświetlania: 254 nm i 12 W); wyniki uzyskano stosując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HS-SPME/GC/FID); włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, faza stacjonarna 50/30 μm ; kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

W wyniku tego etapu ustalono optymalne parametry dla procesu naświetlania próbek oleju promieniowaniem ultrafioletowym, które pełni rolę czynnika przyspieszającego proces utleniania oleju (Tab. 22).

Tab. 22. Optymalne warunki etapu naświetlania olejów roślinnych promieniowaniem UV jako sposobu przyspieszonego utleniania

<i>Parametr</i>	<i>Wartość optymalna</i>
Powierzchnia naświetlania	20 cm ²
Grubość filmu	0,5 cm
Stosunek powierzchni do objętości naświetlanej próbki	2 cm ² / ml
Odległość od źródła światła	3,5 cm
Maksimum emisji fali świetlnej	254 nm
Moc promieniowania UV	12 W

Przy zastosowaniu opracowanej procedury analitycznej można oznaczyć zawartość pentanal, heksanal, heptanal, *trans*-hept-2-enal, oktanal, nonanal oraz *trans*-non-2-enal – charakterystycznych produktów utleniania olejów roślinnych. Stosując zoptymalizowane warunki procesu naświetlania promieniowaniem UV można skrócić etap utleniania olejów do 6 godzin, co umożliwi określenie stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych w ciągu jednego dnia pracy laboratorium.

6.5.6 Powtarzalność metodyki UV-HS-SPME/GC-FID

Po dobraniu optymalnych parametrów wszystkich etapów prezentowanej metodyki analitycznej zbadano jej powtarzalność w stosunku do wybranych analitów – markerów procesu fotoutleniania olejów roślinnych. W tym celu przeprowadzono badania na próbkach rafinowanego oleju rzepakowego uzyskanego bezpośrednio z zakładu produkcyjnego (ZT Kruszwica S.A.), które poddano procesowi fotoutleniania w zoptymalizowanych warunkach (kuweta B, odległość od źródła światła 3,5 cm, długość fali 254 nm, moc 12 W), naświetlając je promieniowaniem UV przez 30 min i przez 2 godziny. Izolacji i oznaczenia wytypowanych markerów procesu utleniania z matrycy próbki oleju dokonano stosując wcześniej opracowaną i zoptymalizowaną metodę HS-SPME/GC/FID. Uzyskane wyniki dla poszczególnych substancji wzorcowych przedstawiono w tabeli 23. Miarą powtarzalności, która charakteryzuje rozrzut uzyskanych wyników wokół wartości średniej, jest współczynnik zmienności wyrażony wzorem $CV = RSD \times 100\% = (SD / \text{średnia}) \times 100\%$. Średnią i odchylenie standardowe obliczono na podstawie wyników uzyskanych dla kolejnych 10 powtórzeń analizowanych próbek.

Tab. 23 Współczynniki zmienności dla metody UV/Hs-SPME/GC/FID obliczone dla wytypowanych markerów procesu utleniania; czas naświetlania promieniowaniem UV 30 min i 120 min

Nazwa	CV [%]	
	30 min UV	120 min UV
pentanal	14,5	11,5
heksanal	10,7	15,2
heptanal	13,2	6,9
2-t-heptenal	7,6	13,3
oktanal	9,0	12,1
nonanal	9,7	16,1
2-t-nonenal	17,5	10,0

Powtarzalność metodyki dla próbek rzeczywistych jest mniejsza niż w przypadku powtarzalności obliczonej dla roztworów wzorcowych, jednakże w dalszym ciągu są to wartości na zadowalającym poziomie i mieszczące się w granicach dopuszczalnych dla technik analizy fazy nadpowierzchniowej.

6.6 Związki lotne zidentyfikowane w oleju słonecznikowym i rzepakowym

W celu identyfikacji związków lotnych występujących w olejach roślinnych (rzepakowym i słonecznikowym) na różnych etapach utleniania zastosowano chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas. Anality rozdzielano w kolumnie chromatograficznej Stabilwax DA (Restek) zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.4.5. Celem identyfikacji związków lotnych analizie poddano oleje rafinowane świeże, naświetlane promieniowaniem UV (254 nm, 12 W) oraz poddane działaniu podwyższonej temperatury (80 °C). Wykryte związki zidentyfikowano poprzez porównanie uzyskanego widma masowego z widmami dostępnymi w bibliotece NIST. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 24.

Część zidentyfikowanych związków została już zidentyfikowana wcześniej, co potwierdzają doniesienia literaturowe dotyczące składu lotnej frakcji olejów roślinnych świeżych jak i utlenionych [Choe i Min 2006; Doleschall i in. 2001; Doleschall i in. 2003; Jeleń i in. 2000; Jeleń i in. 2007; Kalua i in. 2006; Kanavouras i in. 2005; Kawa i in. 2007; Keszler i in. 2000; Lampi i in. 1997]. Zamieszczone w tabeli znaki (+, -, +, ++, +++, +++) pokazują względne różnice w ilościach poszczególnych związków obecnych w badanych próbkach (mierzonych jako pola powierzchni pików).

Oleje utlenione pod wpływem działania promieniowania UV różniły się składem lotnej frakcji w porównaniu z olejami utlenianymi pod wpływem podwyższonej temperatury. Heksanal był związkiem, który powstawał we wszystkich badanych próbkach bez względu na sposób w jaki były utlenione. Najbogatszym składem frakcji lotnej charakteryzował się nierafinowany olej rzepakowy, w którym zaobserwowano powstawanie heksanalu w dużych ilościach już po 15 min naświetlania promieniowaniem UV.

Wyniki przeprowadzonego doświadczenia dowiodły, że technika naświetlania promieniowaniem UV jest skuteczną metodą przyspieszonego utleniania, a jej połączenie z techniką SPME i chromatografią gazową umożliwia ocenę stabilności olejów roślinnych zarówno rafinowanych jak i nierafinowanych.

Tab. 24. Związki lotne zidentyfikowane w fazie nadpowierzchniowej nad próbkami olejów roślinnych (0 – olej świeży nie utleniony; 15 UV olej po 15 min naświetlania promieniowaniem UV, 120 UV – olej po 120 min naświetlania promieniowaniem UV, 24 h T – olej po 24 godzinach przechowywania w temperaturze 80 °C); +-: najmniejsze pole powierzchni pików, ++++: największe pole powierzchni pików

RT	Nazwa	Oleje roślinne											
		słonecznikowy				rzepakowy				rzepakowy nierafinowany			
		0	15 UV	120 UV	24h T	0	15 UV	120 UV	24h T	0	15 UV	120 UV	24h T
1,23	metylo-prop-2-en			+			+	+				+	
1,25	etanal			+++		++							
1,28	penten		+	+			++	++			++	+	
1,32	metylo-but-2-en										+	+	
1,35	heksan									++		+	+
1,44	2-metylo-pent-1-en		+	++		+		+				++	+
1,50	heptan									++			
1,56	3-metylo-but-2-en-1-ol							+				+	+
1,66	aldehyd octowy				+			+++	+++	+++	+++	++	++++
1,76	hepten			+				++			+	+	
1,87	siarczek dimetylu									+++	++	++	+
1,91	heksa-2,4-di-en							+				+	+
2,05	oktan							+		++		++	+
2,13	propanal							+	+			+	++
2,45	okten	+ -	+ -	+				+			+++	+	
2,79	prop-2-enal				++++					++++		++++	++++
4,17	etanol									++++	++	++	++
4,70	3-etylo-1-H-pirol								+++				
5,50	pentanal				+			+ -	+			++++	+
8,45	2-metylo-propanol									+++	+++		
8,47	Heksanal			++	++++			+	+++		+++	++	+++
10,46	trans-pent-2-enal								+				++
10,64	penten-3-ol				+ -				++				+++
12,06	2-metylo-butanol				+ -					+	+	+	++
13,33	pentanol								+	++++	+++	+++	++
15,47	heksanol									+++	++	++	+
15,65	3-metylo-penten									+	+	+	
16,50	nonanal											+++	++
17,33	kwasy octowy				+++			+++	+++	++++	++++	+++	+++
17,92	trans,trans-hepta-2,4-dien-al								++				+
17,98	kwasy mrówkowy				++				+++				++
18,34	kwasy propionowy				+				++++				++++
18,97	aldehyd benzoowy				+ -				++				+
19,86	2-(2-etoksyetoksy-)etanol				+++	++	+++	+++	++	+++	++	+	++
20,24	butyrolakton				+++	+				+++	++	+++	++
20,72	5-metylo-2(5H)furanon												++++
22,33	skwalen			+	++								
24,03	heksa-1,5-dien-3-ol									++	++	+	+
25,22	pentadekanal	++	+	+						+	+	+	
25,46	tetradekan-2-ol	+	+	+	+			+ -					
25,65	2-dietylamino-propiofenon	+	+	+	++								
27,34	tetradekanal	+	+	+	+			+					
27,56	heksadekanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28,36	kwasy tridekanowy	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
30,76	eikozanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32,04	kwasy tetradekany	+	+	+	+			+	++	+	+	+	+
33,32	kwasy heksadekany		+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
33,52	kwasy heptadekany	++	++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+

6.7 Stabilność oksydacyjna olejów rzepakowych i słonecznikowych wyznaczona na podstawie opracowanej procedury analitycznej (UV/HS-SPME/GC/FID)

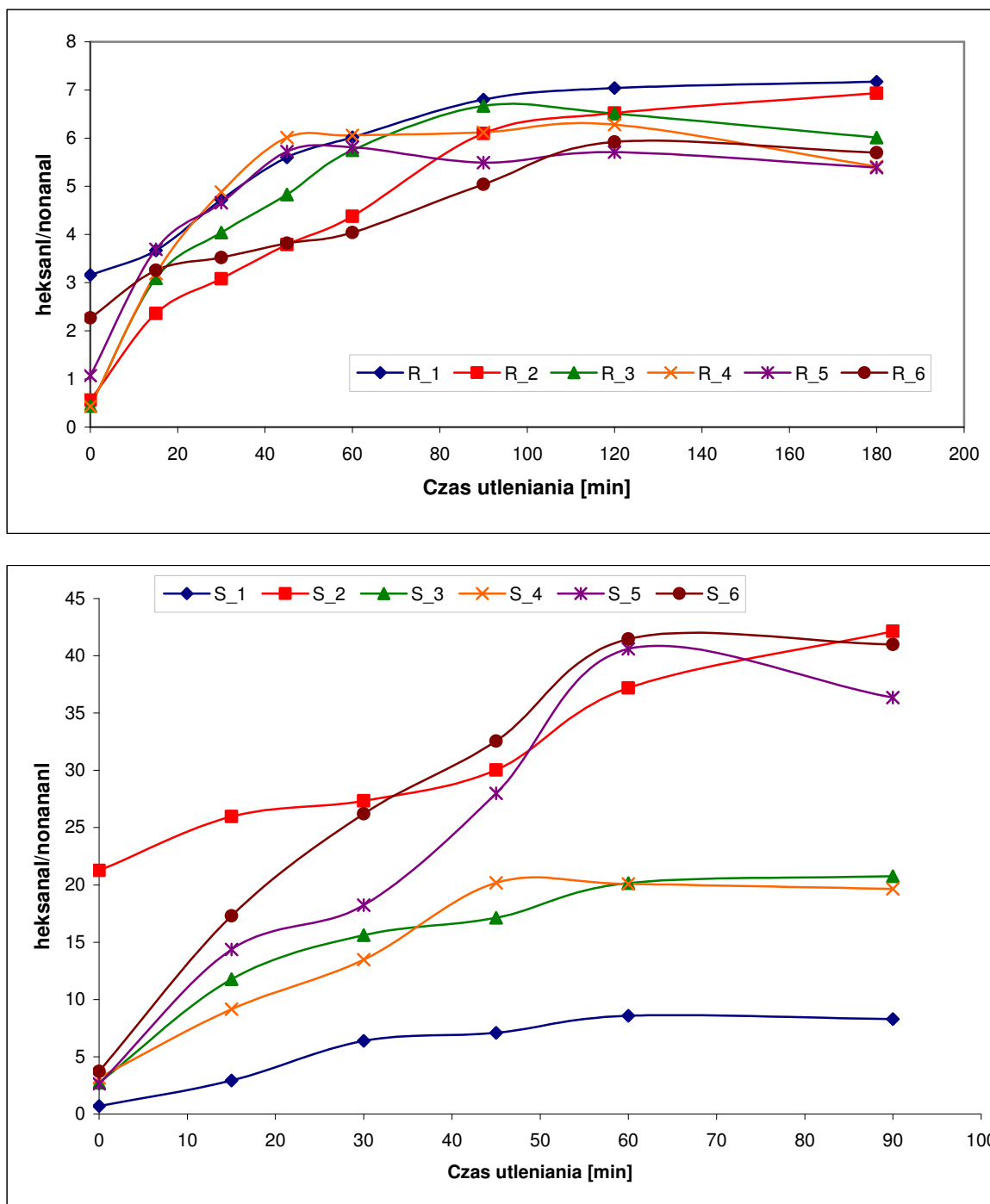
Dla opracowanych warunków procesu utleniania, izolacji, identyfikacji i oznaczania lotnych produktów procesu utleniania olejów roślinnych przeprowadzono analizy na kolejnej grupie olejów (rzepakowych i słonecznikowych, Tab. 25).

Tab. 25 Rafinowane oleje słonecznikowe i rzepakowe stosowane w badaniach

Nr próbki	Typ oleju	Kraj pochodzenia
S_1	słonecznikowy	Niemcy
S_2		Ukraina
S_3		Polska
S_4		Ukraina
S_5		Włochy
S_6		Austria
R_1	rzepakowy	Polska
R_2		Polska
R_3		Polska
R_4		Polska
R_5		Polska
R_6		Austria

Okazało się, że dla optymalnych warunków prezentowanej metodyki analitycznej najlepszymi markerami procesu utleniania są heksanal i nonanal. Dlatego stosunek tych związków w jednostce czasu naświetlania próbki posłużył do wykreślenia krzywych kinetycznych procesu utleniania olejów roślinnych i wyznaczenia na ich podstawie okresów indukcji dla badanych próbek olejów.

Uzyskane wyniki w formie wykresów ilustrujących przebieg procesu utleniania przedstawiono na rysunku 52. Poniższe krzywe, zarówno dla olejów słonecznikowych jak i rzepakowych, mają bardzo podobne charakterystyki, co świadczy o zbliżonej stabilności oksydacyjnej przebadanej grupy olejów.



Rys. 52. Zależność stosunku powierzchni pików (heksanal/nonanal) od czasu naświetlania promieniowaniem UV w zoptymalizowanych warunkach w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (A) i słonecznikowych (B); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 25

Wniosek ten został potwierdzony wynikami uzyskanymi po oznaczeniu liczby nadtlencowej (Rys. 53) oraz wynikami z testu Rancimat przeprowadzonego dla wybranej grupy olejów roślinnych. W celu porównania okresy indukcji wyznaczone na podstawie wspomnianych powyżej trzech metod dla badanych olejów przedstawiono w tabeli 26.

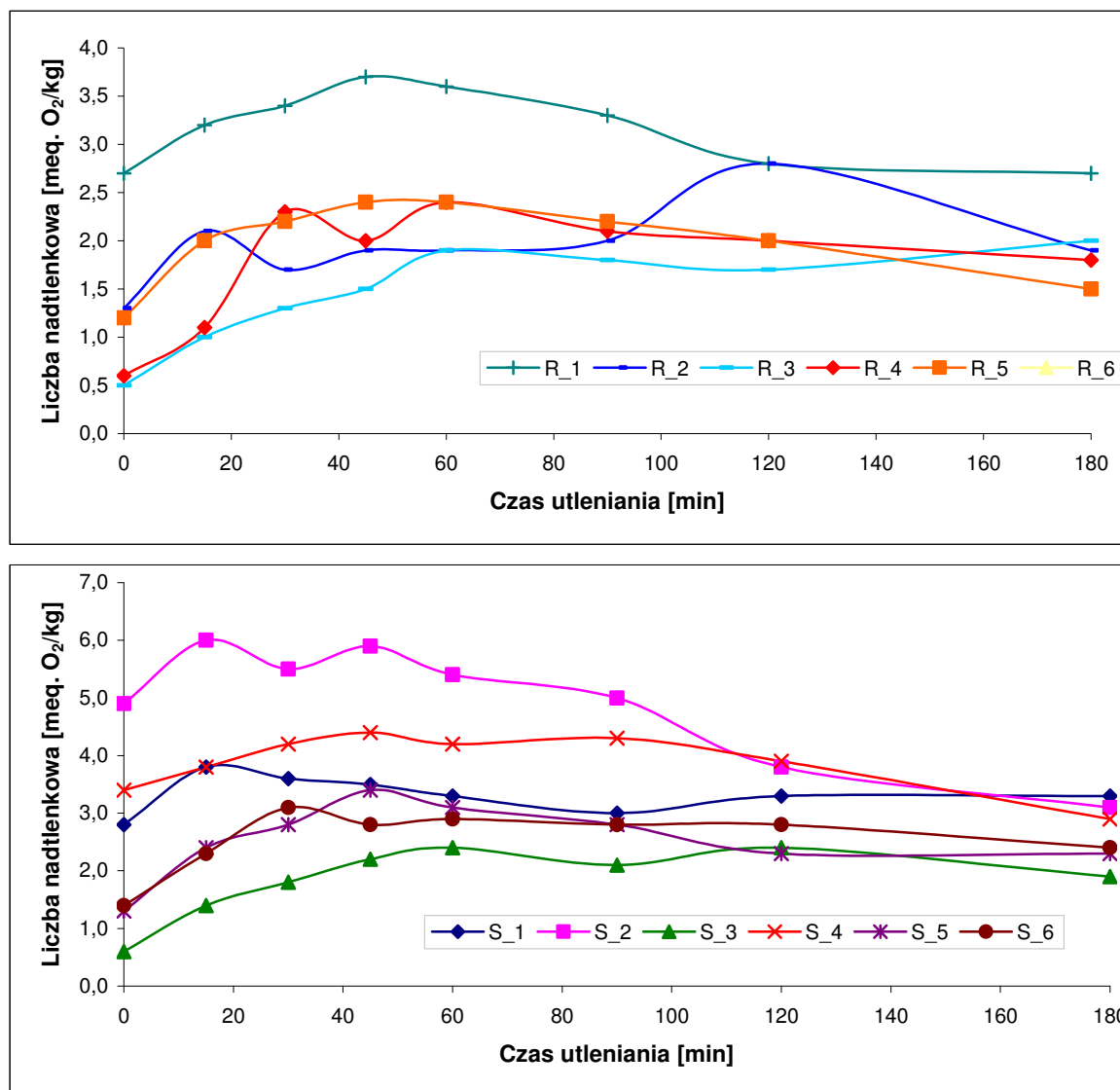
Tab. 26 Okresy indukcji wyznaczone metodą Rancimat, przy pomocy liczby nadtlencowej i nowo opracowanej procedury HS-SPME/GC/FID dla wybranych próbek olejów roślinnych

<i>Nr próbki</i>	<i>Okres indukcji [h]</i>		
	Rancimat	UV/HS-SPME/GC/FID	UV/PV
S_1	2,31	0,50	0,32
S_2	3,37	0,88	0,38
S_3	3,40	0,65	0,53
S_4	2,90	0,62	0,50
S_5	3,46	0,62	0,60
S_6	3,62	0,67	0,40
R_1	5,34	1,17	0,47
R_2	5,46	1,22	0,47
R_3	5,38	0,98	0,63
R_4	6,10	0,50	0,53
R_5	5,08	0,60	0,37
R_6	5,87	1,17	0,40

Wartości okresów indukcji wyznaczone na podstawie metody UV/HS-SPME/GC/FID są porównywalne z wartością okresów indukcji wyznaczonych na podstawie pomiaru liczby nadtlencowej dla większości badanych próbek, jednocześnie są one 4-5-krotnie mniejsze od wartości wyznaczonych przy pomocy aparatu Rancimat. Pomimo różnic w wartościach bezwzględnych dla okresów indukcji, oznaczonych trzema różnymi metodami, można zauważyć bardzo dobrą korelację pomiędzy tymi metodami (Rys. 54).

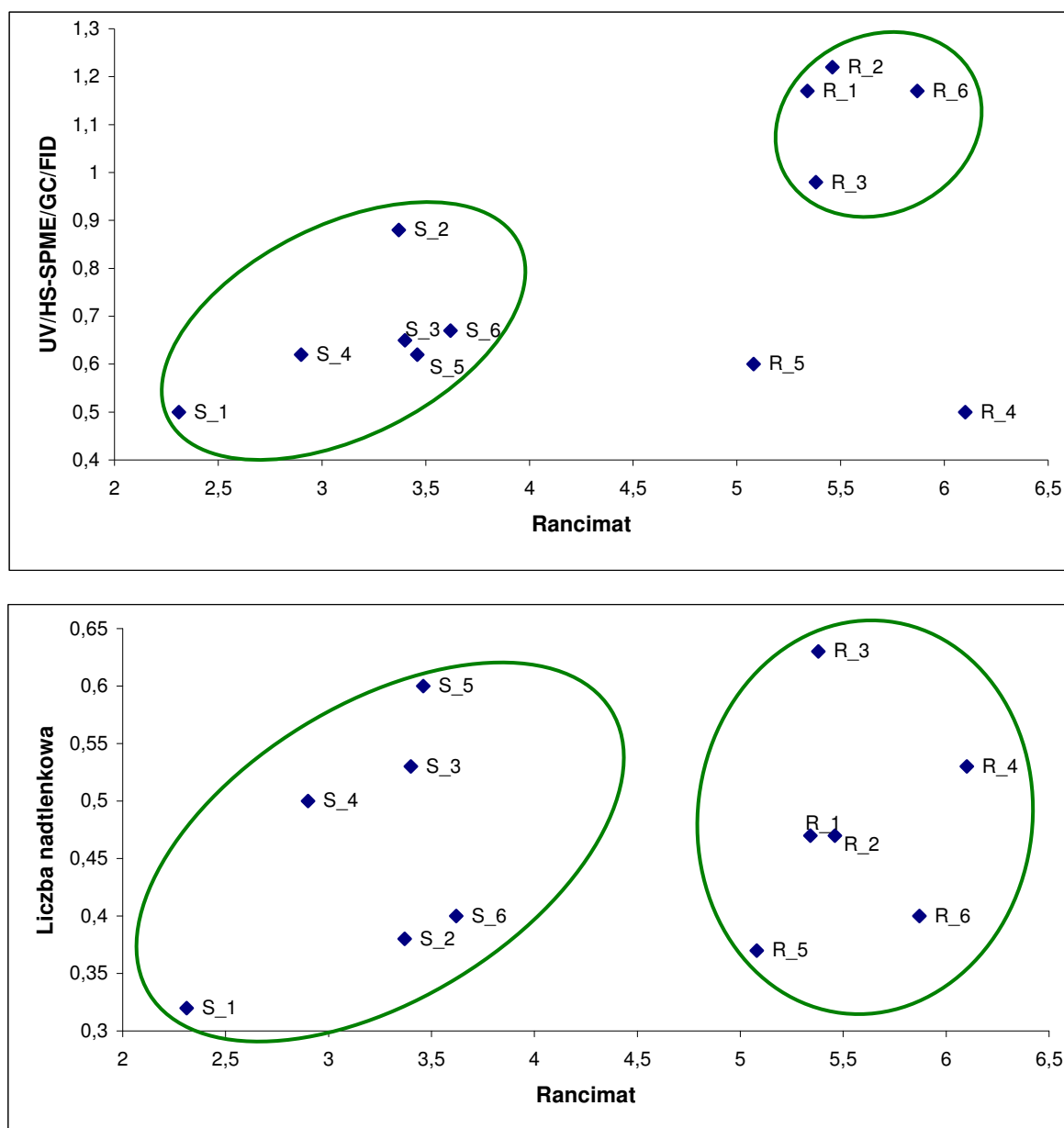
Skrócenie okresów indukcji w przypadku procedury UV/HS-SPME/GC/FID związane jest z jednej strony ze zmniejszeniem o połowę grubości filmu próbki oleju w porównaniu z wcześniejszymi badaniami (rodział III.6.4.2), a z drugiej strony ze zwiększeniem intensywności naświetlania badanych próbek przez znaczne zmniejszenie odległości między źródłem promieniowania UV a powierzchnią oleju z 18 cm do 3,5 cm.

Opracowana procedura analityczna może być z powodzeniem wykorzystywana w ocenie stabilności olejów roślinnych, zarówno wymiennie lub jako uzupełnienie metody wykorzystującej aparat Rancimat.



Rys. 53. Zależność wartości liczby nadtlenkowej od czasu naświetlania promieniowaniem UV w zoptymalizowanych warunkach w próbkach rafinowanych olejów rzepakowych (A) i słonecznikowych (B); numery próbek zgodne z opisem w Tab. 25

Korelację pomiędzy metodą Rancimat a nowo opracowaną procedurą UV/HS-SPME/GC/FID przedstawiono na rysunku 54 A. Można zauważyć wyraźne rozgraniczenie między wynikami uzyskanymi dla olejów słonecznikowych i rzepakowych. Dodatkowo oleje rzepakowe R_4 i R_5 wyraźnie odbiegają od pozostałych olejów tego gatunku. Podobne zależności zaobserwowano pomiędzy wynikami uzyskanymi przy pomocy aparatu Rancimat oraz wartościami liczby nadtlenkowej (Rys. 54 B). W tym wypadku nie zauważono odchylenia od grupy wyników dla próbek R_4 i R_5, natomiast dostrzeżono niewielki rozrzut dla próbek z grupy olejów słonecznikowych (próbka S_1).



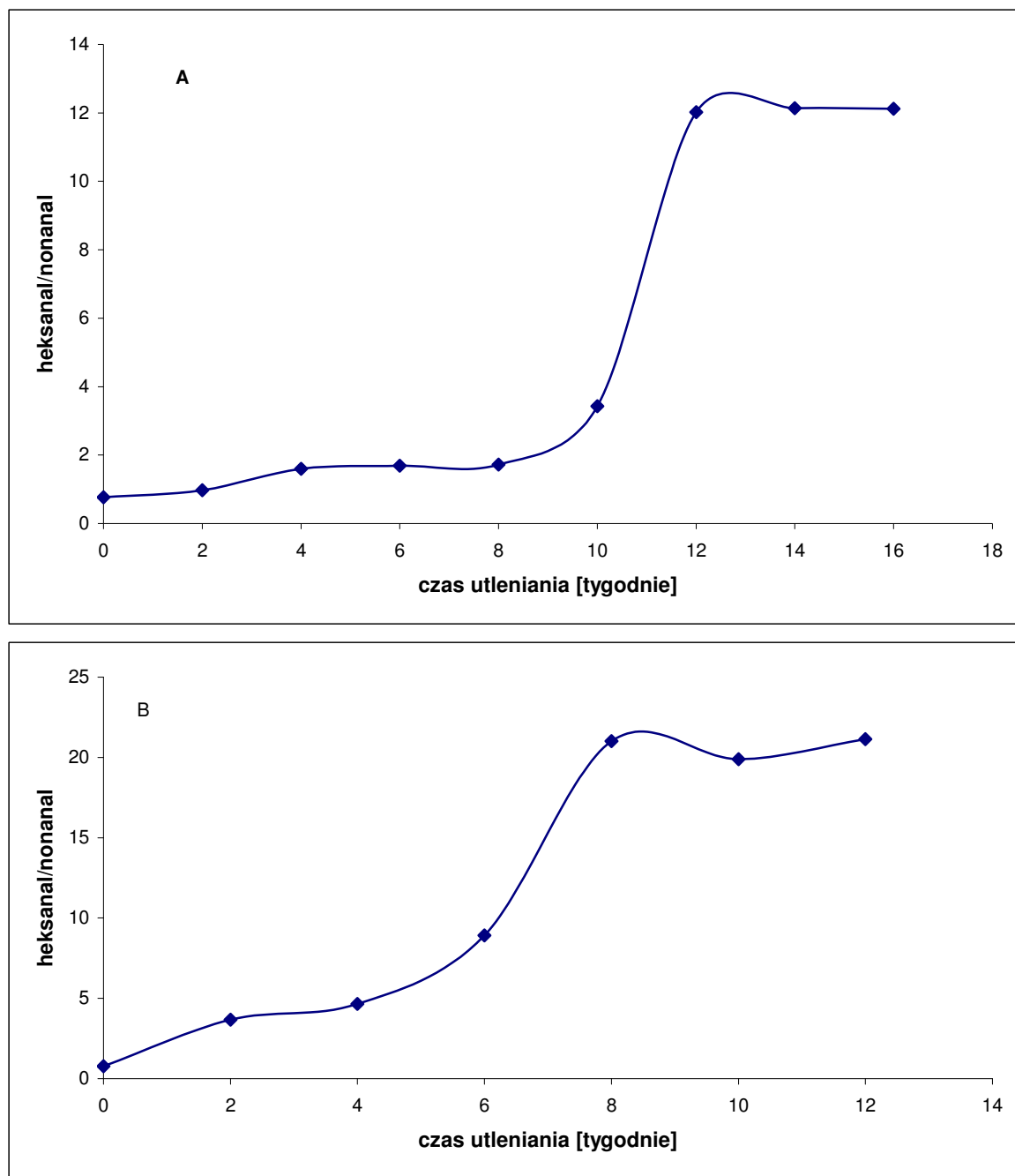
Rys. 54 Korelacja pomiędzy metodą Rancimat a UV/HS-SPME/GC/FID (A) oraz liczbą nadtlenkową (B) na przykładzie olejów słonecznikowych i rzepakowych; numery próbek zgodnie z opisem w Tab. 25.

W przypadku nowo opracowanej metodyki UV/HS-SPME/GC/FID obserwowano bardzo szybko postępujący proces utleniania w granicach jednej godziny, dlatego do dalszych badań zdecydowano się zwiększyć dystans pomiędzy źródłem promieniowania UV i powierzchnią próbki na etapie przyspieszonego utleniania z 3,5 do 9 cm. Zwiększenie odległości jest równoznaczne z osłabieniem natężenia światła, a więc ze zmniejszeniem energii przekazywanej próbce oleju.

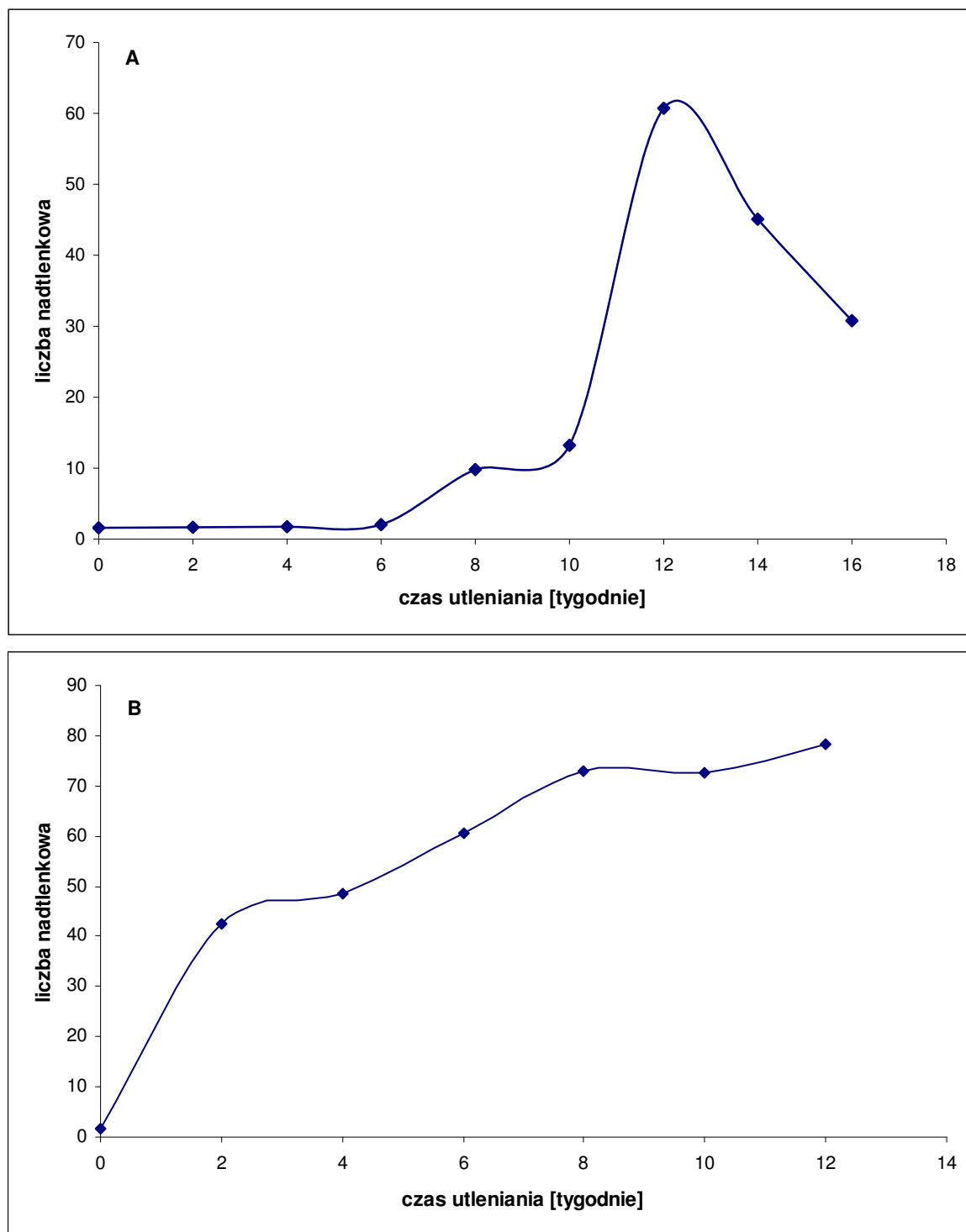
6.8 Korelacja metodyki UV-HS-SPME/GC-FID z testem przechowalniczym

Ostatnim etapem badań było skorelowanie opracowanej metodyki przyspieszonego oznaczania stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych z tzw. testem normalnym (przechowalniczym), podczas którego próbki oleju przechowywane były w warunkach normalnych w temperaturze pokojowej z dostępem i bez dostępu promieniowania słonecznego i badane okresowo poprzez oznaczenie liczby nadtlenkowej. Uzyskane próbki na różnym etapie utleniania przebadano z zastosowaniem opracowanej metody HS-SPME/GC/FID oraz oznaczono w próbkach liczbę nadtlenkową. Uzyskane wyniki w formie krzywych utleniania przedstawiono na rysunku 55.

Jak wynika z rysunków 55 i 56 olej przechowywany w ciemni charakteryzuje się wartością okresu indukcji 9,5 tygodnia. Natomiast olej przechowywany na parapecie okiennym narażony na działanie światła słonecznego i sztucznego w okresie październik-styczeń, uległ utlenianiu prawie dwukrotnie szybciej a jego okres indukcji wynosi 5 tygodni. Wyniki uzyskane na podstawie analizy liczby nadtlenkowej (Rys. 56) dla badanych próbek oleju są zgodne z wynikami uzyskanymi na podstawie badań przeprowadzonych przy pomocy opracowanej metodyki, co potwierdza poprawność metodyki i jej dobrą korelację z aktualnie stosowanymi metodami. Dla próbek oleju przechowywanego w ciemności okres indukcji wyznaczony na podstawie wartości liczby nadtlenkowej wynosi 9,75 tygodnia, czyli jest identyczny jak okres indukcji wyznaczony na podstawie zawartości heksanal i nonanal w badanych próbkach. W przypadku oleju przechowywanego w warunkach dostępu światła słonecznego proces utleniania zaczął się gwałtownie od początku trwania eksperymentu. Na wyniki eksperymentu miało wpływ nie tylko nasłonecznienie, ale też wahania temperatury wywołane działaniem promieniowania słonecznego w dzień i jego brakiem w nocy. Na podstawie wykresu zależności liczby nadtlenkowej od czasu przechowywania oleju wystawionego na działanie światła słonecznego bardzo trudno jest wyznaczyć graficznie okres indukcji z uwagi na bardzo szybko przebiegający proces utleniania.

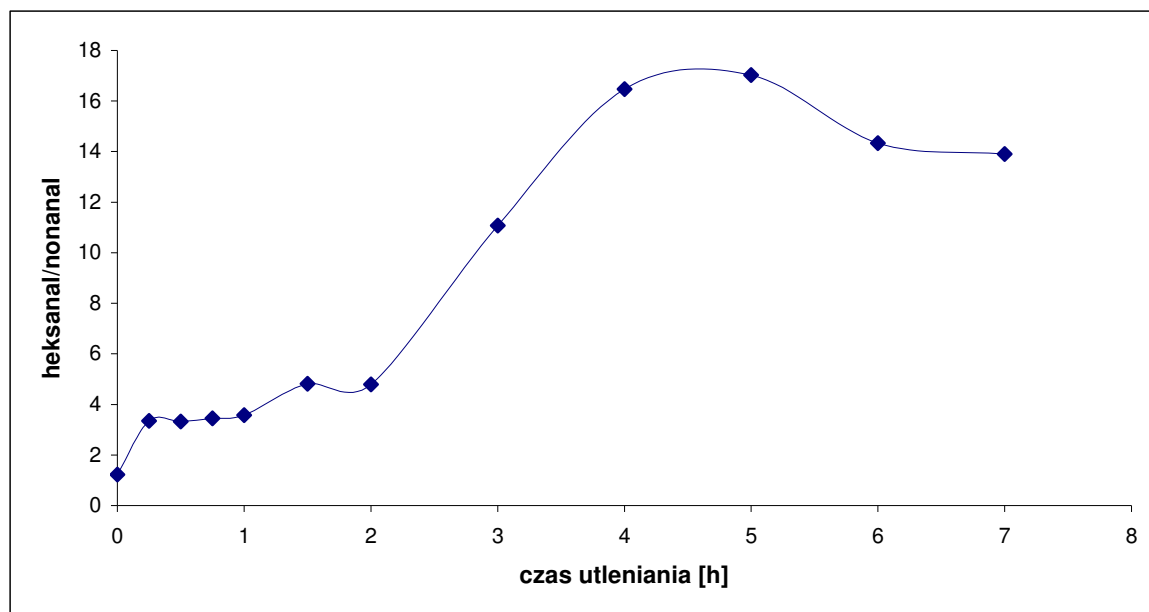


Rys. 55 Krzywe utleniania uzyskane dla rafinowanego oleju rzepakowego w teście przechowalniczym w ciemni (A) i pod wpływem światła (B). Heksanal i nonanal zidentyfikowane metodą HS-SPME/GC/FID



Rys. 56 Krzywe utleniania uzyskane dla rafinowanego oleju rzepakowego w teście przechowalniczym w ciemni (A) i pod wpływem światła (B). Zależność liczby nadtlenkowej od czasu utleniania

Próbki tego samego oleju poddano również działaniu promieniowania UV w teście przyspieszonego utleniania, aby porównać i skorelować opracowaną metodykę badawczą. Próbki oleju były utleniane w zoptymalizowanych wcześniej warunkach w czasie 0 do 4 godzin i pobierane co 30 min do badań celem oznaczenia markerów procesu utleniania. Uzyskane w tym teście wyniki przedstawiono na rysunku 57.



Rys. 57 Krzywa utleniania uzyskana dla rafinowanego oleju rzepakowego w teście przyspieszonego utleniania pod wpływem promieniowania UV. Heksanal i nonanal zidentyfikowane metodą HS-SPME/GC/FID

W wyniku przyspieszonego utleniania poprzez intensywne naświetlanie promieniowaniem UV zaobserwowano gwałtowny przyrost charakterystycznych produktów utleniania w badanej próbce. Okres indukcji badanego oleju wynosi 2,5 godzin. Zachodzi więc prosta korelacja między przechowywaniem na słońcu (5 tygodni), a pod działaniem promieniowania UV (2,5 godziny). Wystarczy zamienić godziny na tygodnie oraz pomnożyć przez dwa aby uzyskać przewidywany okres indukcji. Po kolejnym pomnożeniu przez dwa uzyskuje się czas przechowywania oleju w ciemności (10 tygodni).

Opracowana procedura analityczna dzięki dobrej korelacji z testem przechowalniczym umożliwia w sposób szybki wyznaczenie okresu trwałości (przydatności do celów spożywczych) badanych próbek oleju.

6.9 Zastosowanie opracowanej metodyki w analizie próbek olejów roślinnych

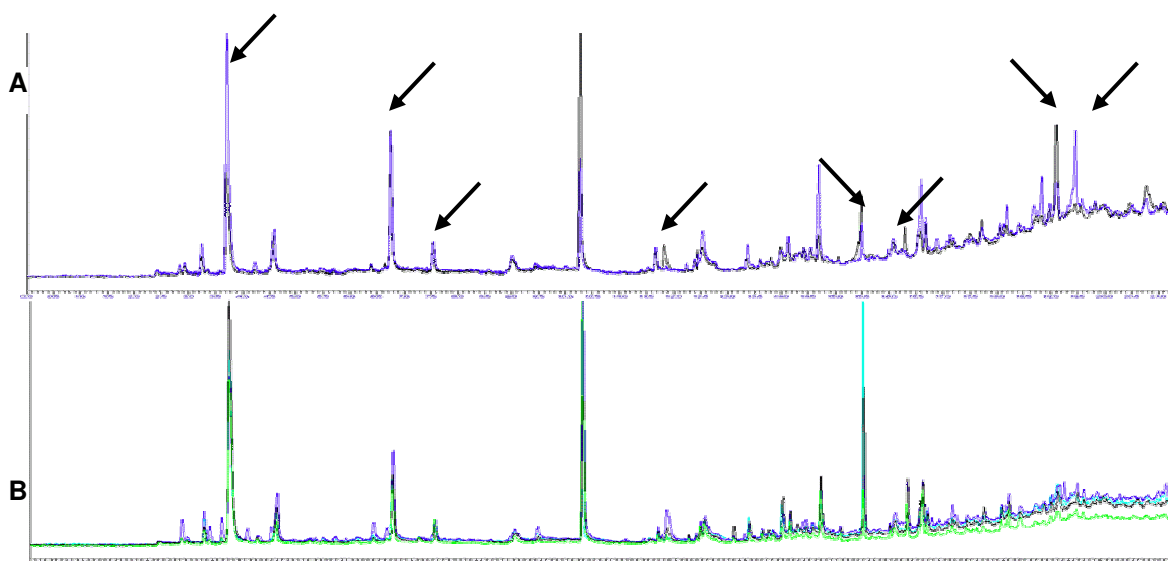
6.9.1 Rewersja zapachu w oleju palmowym

Na świecie rocznie uzyskuje się 160 mln ton olejów roślinnych z czego olej palmowy stanowi 48 mln ton (30 % światowej produkcji tłuszczów). Głównymi producentami i eksporterami tego tłuszczu są Malezja i Indonezja [Berger 2008b]. Olej palmowy pozyskiwany z miąższu owocu palmy oleistej jest tłuszczem stałym w temperaturze pokojowej.

W Polsce w Zakładach Tłuszczowych w Kruszwicy produkuje się rocznie 48 tys ton tego oleju. Olej palmowy w swoim składzie zawiera głównie kwas palmitynowy (44%) oraz oleinowy (40 %) [Lidefelt 2007]. Tłuszcz po rafinacji stosowany jest w przemyśle spożywczym (margaryny, tłuszcz smaźalniczy, sosy, kremy, masa czekoladowa, słodycze) oraz w kosmetyce (mydła, emulsje) [Berger 2008a].

Pomimo szerokiej możliwości zastosowań tego tłuszczu, zakłady produkcyjne od wielu lat próbują rozwiązać problem dotyczący rewersji nieprzyjemnego „plastikowego” zapachu po procesie rafinacji tego oleju. Zjawisko to uniemożliwia stosowanie oleju palmowego w wielu produktach spożywczych, w wyniku powstawania nieprzyjemnego zapachu takich produktów.

W celu sprawdzenia możliwości zastosowania opracowanej procedury analitycznej w innych badaniach tłuszczowych, w tym w badaniach nad rewersją zapachu w oleju palmowym, dokonano analizy 6 olejów palmowych różnej jakości dostarczonych przez ZT Kruszwica zakład produkcyjny w Gdańsku. Próbkę oleju zostały wcześniej poddane rutynowej analizie sensorycznej, na podstawie której zostały sklasyfikowane jako dobre (spełniające wymagania sensoryczne) lub jako złe (nie spełniające wymagań). W próbkach takich oznaczono zawartość związków we frakcji lotnej stosując opracowaną procedurę HS-SPME/GC/FID. Przed przystąpieniem do analiz procedurę analityczną lekko zmodyfikowano z uwagi na analizowaną próbkę. Jak wcześniej wspomniano olej palmowy w temperaturze pokojowej jest tłuszczem stałym dlatego proces ekstrakcji przeprowadzono w temperaturze 50 °C. Wydłużono również etap termostatowania próbki z 10 na 15 min. W wyniku analiz uzyskano 6 chromatogramów (Rys. 58).



Rys. 58 Chromatogram oleju palmowego dobrej (A) i złej (B) jakości; wyniki uzyskano stosując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączoną z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HS-SPME/GC/FID); włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, faza stacjonarna 50/30 μm ; kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Zarówno w próbkach oleju dobrej jak i złej jakości zidentyfikowano te same związki jednak oleje w zależności od jakości różniły się zawartością (stężeniem) niektórych analitów. Wytypowano 8 związków mogących mieć wpływ na nieprzyjemny zapach (tzw. rewersję zapachu) w olejach palmowych złej jakości (Tab. 27).

Tab. 27 Średnie pola powierzchni pików dla związków wytypowanych jako potencjalne markery rewersji zapachu w oleju palmowym

Czas retencji RT [min]	Nazwa	Olej palmowy (średnie pole powierzchni) [mV*s]	
		dobry	zły
3,72	akroleina	7136	12197
6,75	n.z.	4425	2857
7,55	pentanal	939	491
11,68	n.z.	535	271
15,50	nonanal	1031	2830
16,31	<i>trans</i> -non-2-enal	614	1218
19,11	n.z.	2504	172
19,46	n.z.	1383	253

n.z. – nie zidentyfikowano

Cztery spośród wytypowanych substancji (akroleina, pentanal, nonanal i *trans*-non-2-enal) zidentyfikowano na podstawie porównania ich czasów retencji z czasami retencji związków wzorcowych. W próbkach olejów złej jakości obserwuje się mniejszą zawartość pentanal

w porównaniu z próbkami olejów dobrej jakości, przy jednoczesnym znaczącym wzroście zawartości akroleiny, nonanal i *trans*-non-2-enalu.

Wyniki wstępnych badań z zastosowaniem nowo opracowanej procedury w analizie rewersji zapachu w oleju palmowym są obiecujące, wymagają jednak dopracowania etapu ekstrakcji/izolacji analitów (dobór odpowiedniego rodzaju włókna ekstrakcyjnego oraz temperatury i czasu ekstrakcji), a także przebadania większej ilości próbek, aby potwierdzić zauważone tendencje. Dalszym etapem badań będzie identyfikacja kolejnych związków markerowych. Uzyskane w wyniku proponowanego toku analiz dane mogą być bardzo przydatne dla przemysłu, wskazując jakie związki należy monitorować w trakcie etapów rafinacji, a następnie przechowywania oleju palmowego.

6.9.2 Identyfikacja odmian gatunkowych nasion rzepaku

W ramach prac prowadzonych przy współpracy z naukowcami z Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej oraz Zakładów Tłuszczowych w Kruszwicy przeprowadzono wstępne badania dotyczące identyfikacji składników olejów uzyskanych z różnych odmian gatunkowych nasion rzepaku ozimego podwójnie ulepszonego. Identyfikacji dokonano na podstawie profilu związków lotnych wyizolowanych z próbek olejów oraz na podstawie analizy sensorycznej i stabilności oksydacyjnej – testu przyspieszonego utleniania z wykorzystaniem promieniowania UV i technik: PV, A_nV, HS-SPME/GC.

Nasiona ośmiu odmian gatunkowych rzepaku (Tab. 28) poddano tłoczeniu korzystając z ręcznej prasy, uzyskany olej dwukrotnie odwirowano (20 min, 4 100 obr/min; 20 min, 13 000 obr/min) i przefiltrowano. Próbki otrzymanych olejów zamrożono do czasu przeprowadzenia badań. Nasiona oraz uzyskany z nich olej poddano wstępnej charakterystyce w ZT Kruszwica, oznaczając skład kwasów tłuszczowych oraz parametry fizyko-chemiczne nasion (Tab. 28).

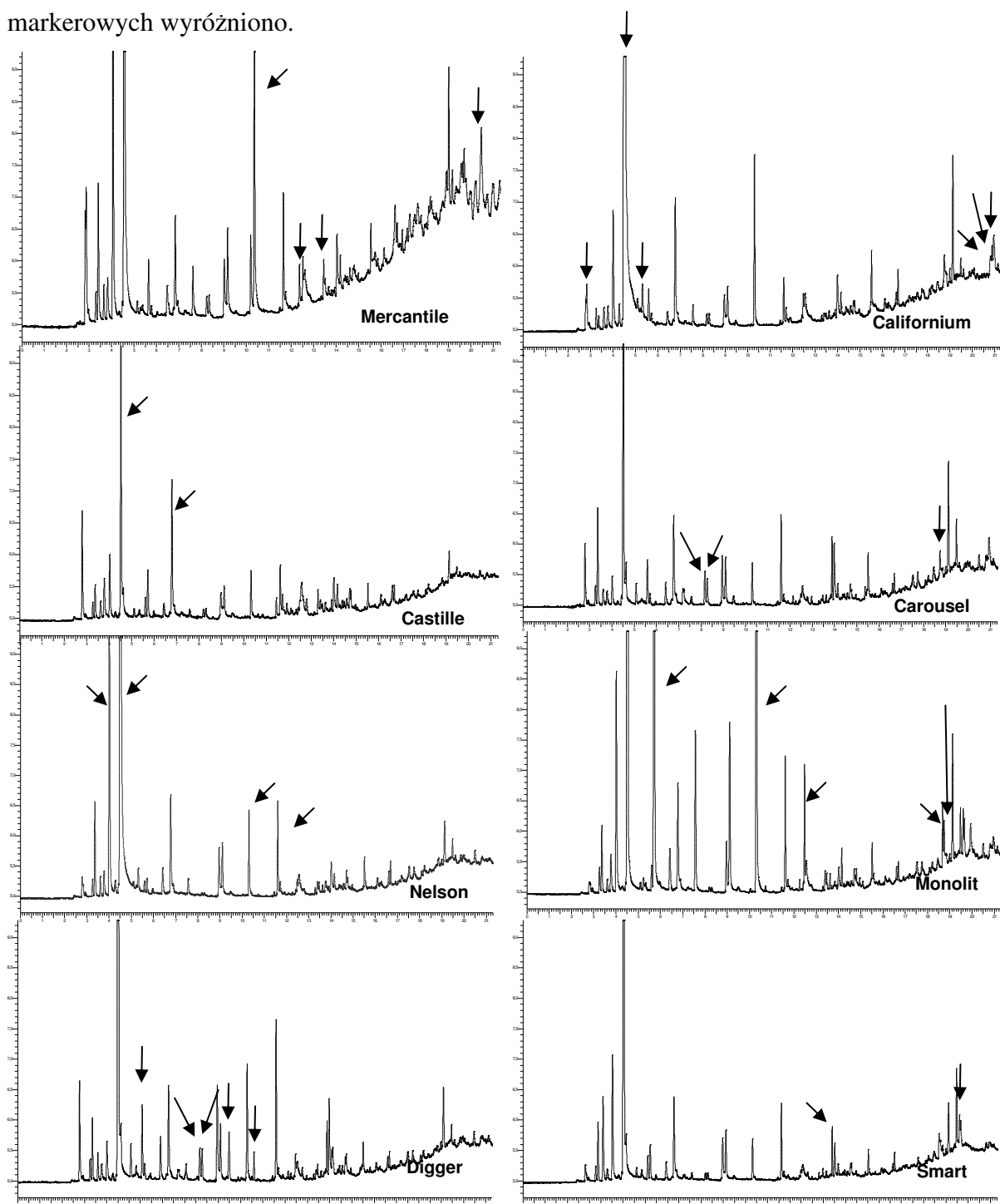
Tab. 28 Charakterystyka odmian gatunkowych nasion rzepaku

Odmiana	Californium	Nelson	Digger	Castille	Carousel	Smart	Monolit	Mercantile
Producent	Monsanto	Syngenta	KVS	Monsanto	Monsanto	Syngenta	HR Strzelce	ZT Kruszwica
Wilgotność [%]	8,5	6,6	7,6	8	7,4	6,8	7,4	4,9
Wytłoczony olej [%]	43,63	46,92	40,45	44,5	42,62	46,52	45,56	b.d
Zawartość oleju [%]	47,68	50,24	43,78	48,37	46,03	49,91	49,20	b.d.
Skład kwasów tłuszczowych [%]								
C 12:0	0,02	0,02	0	0	0	0	0	0
C 14:0	0,06	0,06	0	0	0	0	0	0,05
C 15:0	0,02	0,02	0	0	0	0	0	0
C 16:0	4,4	4,63	4,63	4,49	5,07	4,33	5,12	4,75
C 16:1	0,23	0,2	0,23	0,19	0,24	0,2	0,23	0,20
C 18:0	1,8	1,64	1,51	1,95	1,94	1,91	2,17	1,79
C 18:1	61,89	65,96	56,8	63,48	62,23	66,57	63,41	60,89
C 18:2	18,98	17,29	23,93	17,11	19,56	16,05	18,43	19,40
C 18:3	9,86	7,78	10,01	10	8,39	8,63	7,9	9,24
C 20:0	0,66	0,6	0,66	0,66	0,69	0,65	0,72	0,61
C 20:1	1,46	1,3	1,43	1,36	1,18	1,18	1,07	1,55
C 22:0	0,39	0,34	0,52	0,39	0,39	0,35	0,37	0,35
C 22:1	0,23	0,13	0,11	0,25	0,14	0	0,13	0,75
C 24:0	0,08	0,08	0,17	0,12	0,16	0,14	0,17	b.d.
nasycone SAFA	7,44	7,41	7,49	7,61	8,25	7,37	8,56	7,55
jednonienasycone MUFA	63,81	67,6	58,57	65,27	63,8	67,95	64,84	62,77
wielonienasycone PUFA	28,83	25,07	33,95	27,12	27,95	24,68	26,6	28,64
Omega-6 / Omega-3	1,9	2,2	2,4	1,7	2,3	1,9	2,3	2,1

b.d. – brak danych

Frację lotną świeżych nierafinowanych olejów analizowano stosując technikę SPME/GC, zgodnie z metodyką opisaną w rozdziałach III.4.3. i III.4.4. niniejszej rozprawy. Porównując uzyskane profile lotnej frakcji próbek olejów, zaobserwowano wyraźne różnice pomiędzy badanymi odmianami olejów. Przede wszystkim obserwowano różnice w ilości badanych związków lotnych (różne powierzchnie pików). Spośród szeregu związków lotnych występujących w fazie nadpowierzchniowej, wytypowano te, które potencjalnie umożliwiają rozróżnienie poszczególnych olejów. Na uzyskanych chromatogramach (Rys. 59) dla poszczególnych odmian gatunkowych zaznaczono strzałkami najbardziej charakterystyczne związki. Natomiast ich pola powierzchni i ich procentowy udział w fazie

nadpowierzchniowej zestawiono w tabeli 29. Powierzchnie pików wytypowanych związków markerowych wyróżniono.



Rys. 59 Chromatogramy oleju rzepakowego uzyskanego z różnych odmian nasion rzepaku; wyniki uzyskano stosując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (HS-SPME/GC/FID); włókno DVB/CAR/PDMS 2 cm długości, faza stacjonarna 50/30 μm ; kolumna kapilarna SPB-20, 30 m x 0,25 mm x 1 μm , (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Z chromatogramów wynika, że odmiana Castill charakteryzuje się dwoma głównymi pikami, propanol i 2-butanol, które stanowią odpowiednio 25 % i 12 % sumarycznego składu frakcji lotnej.

Z kolei izobutanol i heksanal mogą być potencjalnymi markerami umożliwiającymi odróżnienie odmiany Monilit od pozostałych odmian olejów rzepakowych. Związki te stanowią bowiem odpowiednio 24 % i 18 % sumarycznego składu frakcji lotnej badanego oleju. Innym markerem może także być heptanal, którego duże ilości w postaci wyraźnego, wysokiego i wąskiego piku zidentyfikowano jedynie w tej odmianie oleju.

Głównym markerem umożliwiającym odróżnienie oleju uzyskanego z nasion rzepaku odmiany Californium od pozostałych próbek może być propanol, który stanowi ponad 90 % całkowitej sumy związków lotnych we wspomnianej próbce oleju. Dodatkowymi markerami potwierdzającymi mogą być jeszcze nie zidentyfikowane związki o czasach retencji 20,81 min i 20,86 min, które nie występują w innych badanych odmianach.

Odmianę Nelson charakteryzują dwie wyraźne pary pików na chromatogramie. Jedną parę tworzy propanol i niezidentyfikowany związek o czasie retencji 4,01 min. Występuje ona jednak również w odmianach Mercantille i Monolit. Drugą parę stanowią heksanal i propionian izobutyli.

Również charakterystyczny układ pików w formie dubletu utworzonego przez związek o czasie retencji 8,18 min i pentanol posiada olej uzyskany z odmiany Digger. Dodatkowym markerem tej odmiany może być niezidentyfikowany związek o czasie retencji 5,60 min.

Identyczny dublet jak dla oleju z odmiany Digger występuje również na chromatogramie dla oleju z odmiany Carousel. Ponadto można identyfikować tę odmianę również po pikie o czasie retencji 18,75 min, który występuje jeszcze we frakcji lotnej oleju odmiany Monolit.

W przypadku odmiany Smart zauważono dwa potencjalne markery w postaci niezidentyfikowanych związków o czasach retencji odpowiednio 13,89 min i 19,59.

Odmiana Mercantile, z której uzyskuje się większość dostępnego na rynku polskim spożywczego oleju rzepakowego, posiada bardzo bogatą frakcję związków lotnych. Spośród tych związków wytypowano cztery jako potencjalne markery odmianowe. Głównym jest heksanal stanowiący 86 % sumarycznej frakcji lotnej, a także trzy niezidentyfikowane związki o czasach retencji 12,36 min, 13,39 min i 20,48 min.

Tab. 29 Związki wytypowane jako charakterystyczne dla olejów uzyskanych z różnych odmian gatunkowych nasion rzepaku

Związek	RT	Mercantil		Castille		Nelson		Digger		Californium		Carousel		Monolit		Smart	
		pow	%	pow	%	pow	%	pow	%	pow	%	pow	%	pow	%	pow	%
	2,79	3412	1,89	4259	8,77	397	0,13	4048	2,56	932	0,16	2118	2,93	167	0,06	450	0,38
	2,84	5682	3,14	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	133	0,08	1915	0,32	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
	3,26	1214	0,67	637	1,31	702	0,22	923	0,58	907	0,15	902	1,25	1113	0,42	621	0,52
	3,36	5714	3,16	1357	2,80	3640	1,15	2499	1,58	544	0,09	3867	5,34	2780	1,05	2409	2,01
	3,61	1431	0,79	794	1,64	853	0,27	1159	0,73	1096	0,18	637	0,88	573	0,22	3806	3,18
propanal	3,78	2167	1,20	1909	3,93	1251	0,40	730	0,46	1078	0,18	396	0,55	1947	0,74	435	0,36
	4,01	17258	9,55	2907	5,99	16837	5,33	1995	1,26	5321	0,89	1368	1,89	10260	3,88	5814	4,86
propanol	4,51	57410	31,75	12085	24,90	264067	83,60	91025	57,56	544482	91,24	19867	27,45	85060	32,15	75215	62,82
	4,64	n.w.	n.w.	1131	2,33	n.w.	n.w.	3126	1,98	n.w.	n.w.	2206	3,05	n.w.	n.w.	1714	1,43
	5,09	516	0,29	n.w.	n.w.	154	0,05	1498	0,95	440	0,07	918	1,27	280	0,11	396	0,33
	5,32	193	0,11	n.w.	n.w.	952	0,30	298	0,19	1440	0,24	n.w.	n.w.	231	0,09	259	0,22
	5,60	2435	1,35	828	1,71	463	0,15	3264	2,06	1455	0,24	2088	2,89	1057	0,40	1108	0,93
izobutanol	5,71	179	0,10	2135	4,40	625	0,20	752	0,48	381	0,06	441	0,61	62488	23,62	1600	1,34
	6,42	1117	0,62	225	0,46	1383	0,44	2006	1,27	472	0,08	1057	1,46	2251	0,85	836	0,70
2-butanol	6,78	4801	2,66	5751	11,85	4290	1,36	4111	2,60	5408	0,91	3853	5,32	4846	1,83	3624	3,03
pentanal	7,57	2227	1,23	147	0,30	692	0,22	706	0,45	886	0,15	334	0,46	7464	2,82	241	0,20
	8,18	888	0,49	285	0,59	n.w.	n.w.	1655	1,05	506	0,08	1654	2,29	n.w.	n.w.	266	0,22
pentanol	8,28	961	0,53	363	0,75	n.w.	n.w.	1581	1,00	521	0,09	1197	1,65	119	0,04	149	0,12
	8,96	2185	1,21	852	1,76	2008	0,64	4950	3,13	1196	0,20	2055	2,84	2424	0,92	1749	1,46

	9,11	3318	1,84	1075	2,21	2145	0,68	2725	1,72	1471	0,25	2006	2,77	808	0,31	2070	1,73
	9,48	3783	2,09	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	2520	1,59	n.w.	n.w.	263	0,36	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
heksanal	10,31	15556	8,60	1953	4,02	3268	1,03	4547	2,88	6600	1,11	1650	2,28	48558	18,35	1610	1,34
	10,60	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	1173	0,74	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	159	0,06	n.w.	n.w.
propionian izobutyly	11,60	4360	2,41	1915	3,95	3332	1,05	5724	3,62	1588	0,27	3143	4,34	4927	1,86	2629	2,20
	12,36	1329	0,74	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
heptanal	12,48	1330	0,74	185	0,38	326	0,10	787	0,50	503	0,08	231	0,32	3860	1,46	n.w.	n.w.
	12,56	1842	1,02	1046	2,16	703	0,22	708	0,45	n.w.	n.w.	659	0,91	1262	0,48	451	0,38
	13,39	1410	0,78	366	0,75	490	0,16	399	0,25	116	0,02	n.w.	n.w.	760	0,29	n.w.	n.w.
	13,89	194	0,11	350	0,72	139	0,04	1710	1,08	222	0,04	1978	2,73	n.w.	n.w.	1586	1,32
	13,99	2785	1,54	1720	3,54	1433	0,45	3614	2,29	2068	0,35	2654	3,67	1164	0,44	1268	1,06
oktanal	14,15	1012	0,56	916	1,89	564	0,18	1196	0,76	746	0,13	578	0,80	1182	0,45	479	0,40
nonanal	15,51	1157	0,64	753	1,55	945	0,30	909	0,57	1903	0,32	1655	2,29	1582	0,60	862	0,72
	16,61	3600	1,99	655	1,35	634	0,20	543	0,34	488	0,08	378	0,52	497	0,19	289	0,24
	17,13	1033	0,57	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	132	0,02	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
	17,26	1557	0,86	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
	18,19	1182	0,65	298	0,61	364	0,12	475	0,30	176	0,03	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
	18,70	141	0,08	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	1945	0,74	459	0,38
	18,75	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	928	0,16	855	1,18	1312	0,50	n.w.	n.w.
	18,86	2064	1,14	n.w.	n.w.	105	0,03	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	203	0,17
	19,99	5693	3,15	n.w.	n.w.	160	0,05	250	0,16	435	0,07	226	0,31	230	0,09	177	0,15
	19,12	1579	0,87	1236	2,55	1868	0,59	2871	1,82	4736	0,79	5123	7,08	5084	1,92	2085	1,74

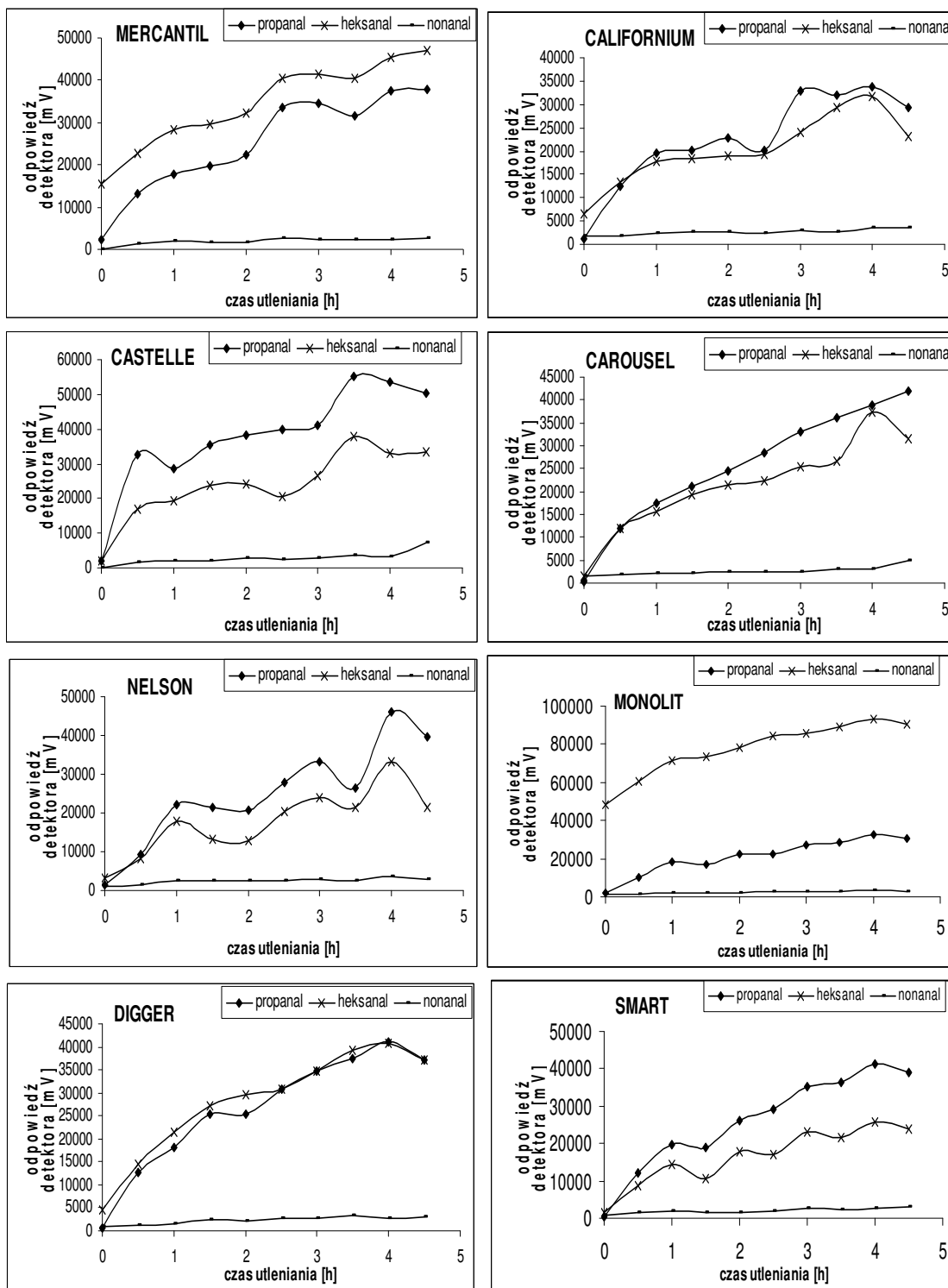
19,48	1679	0,93	175	0,36	640	0,20	616	0,39	530	0,09	1496	2,07	1544	0,58	2591	2,16
19,59	n.w.	n.w.	116	0,24	n.w.	n.w.	110	0,07	263	0,04	100	0,14	1615	0,61	1140	0,95
19,67	1216	0,67	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	1273	0,48	956	0,80
19,96	186	0,10	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	413	0,57	1687	0,64	n.w.	n.w.
20,07	3369	1,86	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	123	0,08	176	0,03	180	0,25	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
20,48	6888	3,81	114	0,23	421	0,13	514	0,33	n.w.	n.w.	781	1,08	628	0,24	n.w.	n.w.
20,76	1504	0,83	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	154	0,10	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
20,81	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	937	0,16	585	0,81	344	0,13	178	0,15
20,86	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	1209	0,20	441	0,61	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
20,95	224	0,12	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	2430	0,41	2014	2,78	901	0,34	n.w.	n.w.
21,14	1021	0,56	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	146	0,02	n.w.	n.w.	217	0,08	n.w.	n.w.

pow. – powierzchnia pod pikiem

% - procentowy udział powierzchni piku danego związku w sumarycznej powierzchni pików związków lotnych

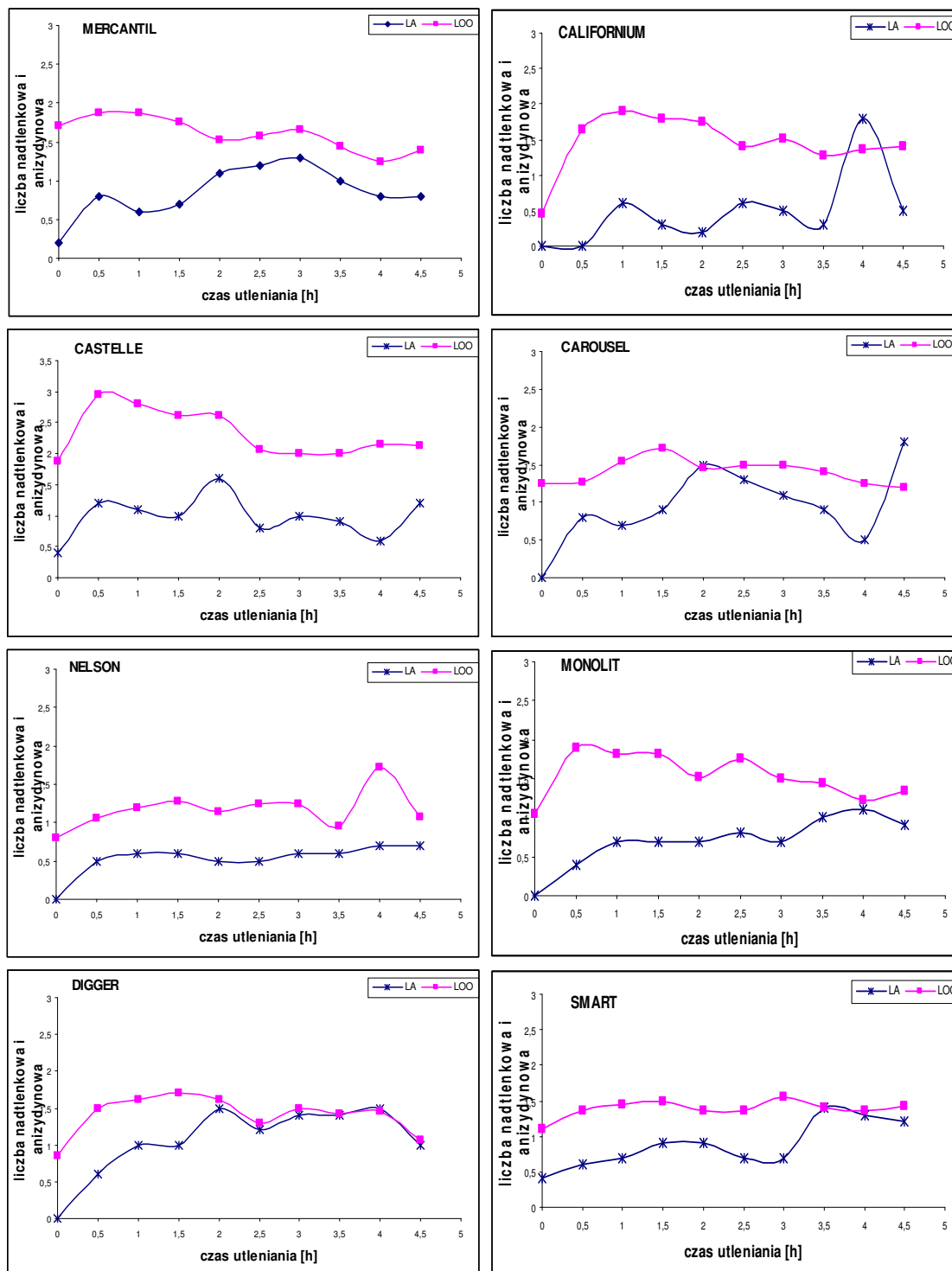
n.w. – nie wykryto

Uzyskane próbki olejów rzepakowych poddano procesowi przyspieszonego starzenia z wykorzystaniem opracowanej w pracy techniki UV. Na różnych etapach utlenienia, podobnie jak w przypadku wcześniejszych próbek olejów, oznaczano przyrost substancji wskaźnikowych w funkcji czasu utleniania.



Rys. 60. Kinetyka utleniania olejów rzepakowych uzyskanych z różnych odmian nasion rzepaku.

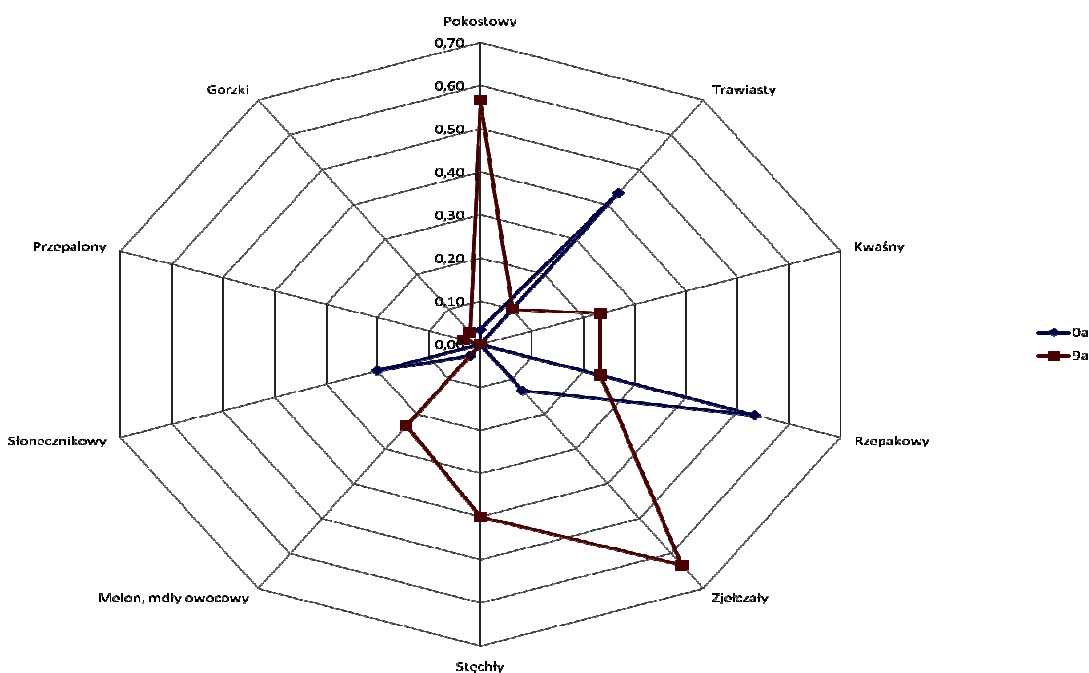
Porównano stabilność oksydacyjną olejów stosując technikę HS-SPME/GC oraz metody tradycyjne (oznaczenie liczby nadtenkowej i anizydynowej). Na rysunku 60 przedstawiono krzywe utleniania dla trzech związków markerowych (propanal, heksanal i nonanal) w badanych olejach. Dla większości olejów zarówno propanal jak i heksanal wykazują bardzo podobną charakterystykę przyrostu w funkcji czasu utleniania. Zdecydowanie mniejszą dynamikę wzrostu stężenia podczas utleniania zaobserwowano dla nonanal. Do wyznaczenia okresów indukcji dla badanych olejów wystarczyłaby więc jedynie krzywa obrazująca zmiany stężenia heksanal w czasie utleniania. Nie ma wtedy potrzeby ani konieczności wyznaczania stosunku stężeń heksanal do nonanal, jak to przeprowadzano w innych doświadczeniach w niniejszej rozprawie.



Rys. 61. Zależność liczby nadtlenkowej i anizydynowej od czasu utleniania olejów rzepakowych uzyskanych z różnych odmian nasion rzepaku.

Podobnie, jak w przypadku oznaczeń wykonanych dla próbek różnych olejów rzepakowych i słonecznikowych (rozdział III.6.7.) praktycznie nie zaobserwowano zmian w wartościach liczby nadtlenkowej podczas utleniania (Rys. 61), natomiast zaobserwowano wyraźny wzrost zawartości wytypowanych markerów w fazie nadpowierzchniowej próbki.

Ponadto, analiza sensoryczna przeprowadzona przez zespół z Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, wyraźnie wskazała na znaczące pogorszenie zapachu w trakcie procesu utleniania. Głównymi wyczuwanymi po czterech godzinach utleniania dyskryptorami były zapachy zjełczały i pokostowy, a typowe dla olejów świeżych zapachy rzepakowy i trawiasty były praktycznie niewyczuwalne (Rys. 62).



Rys. 62. Profilogram zmian sensorycznych w oleju rzepakowym na podstawie wytypowanych deskryptorów. Wyniki opracowane przez dr inż. R. Tylingo z Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej

Uzyskane wyniki dowodzą, iż stosowane do tej pory metody oceny stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych często są niedostatecznie czułe aby zilustrować przemiany zachodzące w olejach. Zmiany te mogą być natomiast łatwo wykryte poprzez przeprowadzenie analizy instrumentalnej z zastosowaniem nowo opracowanej procedury analitycznej opartej o technikę SPME i metody chromatograficzne lub poddanie próbki czułej ale subiektywnej analizie sensorycznej z zastosowaniem ludzkiego nosa jako detektora. Ponadto opracowane procedury mogą być łatwo modyfikowane poprzez zmianę warunków pracy i dostosowane ich do oznaczania także innych analitów.

7 Podsumowanie i wnioski

Celem pracy było opracowanie nowych procedur analitycznych umożliwiających ocenę stabilności oksydatywnej olejów roślinnych na podstawie zależności stężenia wytypowanych markerów procesu utleniania w funkcji czasu utleniania przy zastosowaniu promieniowania ultrafioletowego (UV), jako czynnika przyspieszającego proces utleniania, technik mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) oraz statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej (HSA), jako technik przygotowania próbki oraz kapilarnej chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią mas (MS) i detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID), jako technik oznaczeń końcowych.

W rezultacie przeprowadzonych badań określono optymalne warunki procesu utleniania z zastosowaniem promieniowania UV, dobrano optymalne warunki etapu izolacji lotnych analitów z utlenionych próbek olejów roślinnych oraz określono warunki rozdzielania chromatograficznego.

Dla zoptymalizowanych procedur analitycznych, wykorzystujących wytypowane związki markerowe, wyznaczono następujące parametry walidacyjne: zakresy liniowości, granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) oraz powtarzalność metod wyrażoną w procentach jako współczynnik zmienności (CV).

Korzystając z opracowanych procedur przeprowadzono analizy różnych gatunków olejów roślinnych, dla których zidentyfikowano związki lotne obecne w fazie nadpowierzchniowej oraz wyznaczono okresy indukcji, które następnie porównano z okresami indukcji wyznaczonymi na podstawie metod stosowanych do tej pory w przemyśle (test Rancimat, test termostatowy Schaala, test przechowalniczy, test z zastosowaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC oraz metody manostatycznej, a także wyznaczono wartości liczb nadtlenkowej, anizydynowej i wskaźnika TOTOX na różnych etapach utlenienia próbek olejów).

W wyniku realizacji zadań badawczych nasunęły się następujące wnioski i spostrzeżenia:

- Stwierdzono, że naświetlanie olejów promieniowaniem UV (254 nm, 12 W) doskonale nadaje się, jako metoda przyspieszonego utleniania olejów roślinnych.
- Naświetlanie promieniowaniem UV w zdecydowanie lepszy sposób odzwierciedla naturalny proces starzenia się oleju w warunkach przechowalniczych (magazyny, półki sklepowe, kuchnie w gospodarstwach domowych) niż sposoby wykorzystujące działanie na próbkę oleju podwyższoną temperaturą.

- Optymalne warunki procesu przyspieszonego utleniania pod wpływem działania promieniowania UV osiągnięto dla próbek oleju o grubości filmu 5 mm, dla których stosunek powierzchni do objętości naświetlanej próbki wynosił $2 \text{ cm}^2 \text{ ml}^{-1}$, a odległość pomiędzy źródłem światła a powierzchnia próbki wynosiła 3,5 cm.
- Zoptymalizowana metoda UV umożliwia uzyskanie utlenionych próbek oleju w czasie krótszym niż 3 godziny, co jest szczególnie istotne z punktu widzenia praktyki przemysłowej.
- Zastosowanie bezrozpuszczalnikowych, próśrodkowiskowych technik przygotowania próbek do analiz (HSA i SPME) pozwoliło na wyizolowanie i oznaczenie (jakościowe i ilościowe) lotnych analitów (m.in. markerów procesu utleniania) z trudnych próbek jadalnych olejów roślinnych, zarówno rafinowanych jak i nierafinowanych z zadowalającą czułością i powtarzalnością (wartości CV < 10 %).
- Dzięki połączeniu zastosowanych technik izolacji/ekstrakcji analitów z dozownikiem z podziałem/bez podziału strumienia (split/splitless) możliwe było zastosowanie na etapie końcowym oznaczeń kapilarnej chromatografii gazowej – techniki powszechnie stosowanej w laboratoriach przemysłowych.
- Proponowane procedury są szybkie i możliwe do wykonania z wykorzystaniem aparatury stosowanej w laboratoriach przemysłowych, co znacznie ułatwi i skróci procedurę ich wdrożenia do praktyki przemysłowej.
- Koszt wykonania pojedynczej analizy jest niski a powtarzalność metody w porównaniu do istniejących procedur jest zdecydowanie lepsza.
- W wyniku analizy chromatograficznej lotnej frakcji olejów roślinnych uzyskiwano chromatogramy, na podstawie których można stwierdzić obecność kilkudziesięciu związków o bardzo szerokim zakresie pól powierzchni. Ustalone warunki chromatograficzne pozwalają na zadowalające rozdzielenie większości związków w rozsądnym czasie trwania analizy (21 min).
- Wydajność i powtarzalność ekstrakcji w znacznym stopniu zależy od temperatury i czasu jej trwania. W odniesieniu do techniki HS-SPME optymalny czas ekstrakcji wyniósł 15 min w temperaturze 30 °C, natomiast dla techniki HSA optymalne warunki ekstrakcji to 20 min w 80 °C.

- Porównując obie opracowane procedury analityczne można zauważyć, że technika SPME jest zdecydowanie bardziej odpowiednia do oznaczania lotnych produktów procesu utleniania olejów roślinnych, gdyż przeprowadza się ją w warunkach zachowawczych, minimalizując niebezpieczeństwo rozkładu nietrwałych termicznie związków, do czego może dochodzić w przypadku stosowania techniki HSA z uwagi na wysoką temperaturę ekstrakcji.
- Procedura oparta na technice SPME charakteryzuje się zdecydowanie lepszą powtarzalnością wyników i niższymi wartościami granic wykrywalności i oznaczalności. Wartości LOD dla procedury z zastosowaniem SPME dla wytypowanych aldehydów wynosiły od 0,162 mg kg⁻¹ dla *trans*-non-2-enalu do 0,293 mg kg⁻¹ dla dekanalu, a wartości LOQ mieściły się w przedziale od 0,486 mg kg⁻¹ do 0,879 mg kg⁻¹, natomiast wartości LOD dla procedury z zastosowaniem HSA były o rząd wartości wyższe i wynosiły odpowiednio od 3,21 mg kg⁻¹ dla heksanal do 50,66 mg kg⁻¹ dla nonanal, a wartości LOQ mieściły się w przedziale od 9,62 mg kg⁻¹ do 151,97 mg kg⁻¹.
- Na podstawie przeprowadzonych badań wytypowano dwa aldehydy (heksanal i nonanal) jako główne związki markerowe procesu utleniania.
- Na podstawie stosunku stężeń obu markerów w badanej próbce i przyrostu tego stosunku w czasie utleniania wyznaczono krzywe kinetyczne utleniania dla poszczególnych badanych olejów roślinnych.
- Stwierdzono bardzo dobrą korelację opracowanej procedury UV/HS-SPME/GC/FID z metodą opartą na pomiarach z zastosowaniem aparatu Rancimat ($R^2 > 0,99$). Słabszą, ale nadal bardzo dobrą korelację zauważono również z wynikami uzyskanymi na podstawie oznaczenia wartości liczby nadtlenkowej ($R^2 > 0,82$).
- Badania potwierdziły również wcześniejsze doniesienia innych naukowców na temat bardzo dobrej korelacji pomiędzy testem stabilności oksydatywnej olejów roślinnych opartym na metodzie DSC oraz na metodzie manostatycznej. Również obie metody wykazują dobrą korelację z nowo opracowaną procedurą UV/HS-SPME/GC/FID ($R^2 > 0,85$).

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono możliwość zastosowania bezrozpuszczalnikowych technik ekstrakcji (statyczna analiza fazy nadpowierzchniowej HSA i mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej SPME) na etapie przygotowywania próbek, w celu określenia stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych. Techniki te w połączeniu z kapilarną chromatografią gazową umożliwiły znaczące uproszczenie etapów izolacji, wzbogacania i identyfikacji związków lotnych ekstrahowanych z trudnej i złożonej matrycy jaką jest olej roślinny.

W pierwszym etapie badań opracowano dwie procedury oznaczania związków lotnych, głównie aldehydów. Wyznaczono optymalne warunki przygotowywania próbki (temperaturę i czas termostatowania, ekstrakcji i desorpcji, ilość próbki) oraz warunki chromatograficzne (rodzaj kolumny, warunki pracy dozownika, pieca i detektorów). Dla opracowanych procedur wyznaczono również parametry walidacyjne (zakres pomiarowy, zakres liniowości, granice wykrywalności i oznaczalności oraz powtarzalność metod).

Kolejnym etapem było zastosowanie promieniowania ultrafioletowego jako czynnika przyspieszającego utlenianie i połączenie go z techniką HS-SPME/GC/FID i HSA/GC/FID w celu stworzenia nowej procedury przyspieszonego utleniania olejów roślinnych. Dobrano optymalne warunki procesu naświetlania (moc lamp, długość fali świetlnej, intensywność promieniowania, odległość powierzchni oleju od źródła promieniowania i grubość filmu naświetlanego oleju).

Opracowane procedury porównano następnie z metodami oceny stabilności oksydacyjnej oleju zalecanymi przez Polskie Normy i stosowanymi w krajowym przemyśle (oznaczenie liczby nadtlenkowej i anizydynowej, metoda Rancimat, termostatowy test Schaala, test przechowalniczy, metoda manostatyczna, test z zastosowaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC). Po pomyślnej weryfikacji opracowane procedury zastosowano do oznaczenia lotnych produktów utleniania w różnych gatunkach olejów roślinnych i do oceny ich stabilności oksydacyjnej. Stabilność oksydacyjną próbek oceniano na podstawie stosunku pól powierzchni dwóch związków markerowych – heksanalu i nonanalu w funkcji czasu utleniania (naświetlania promieniowaniem UV). Okres indukcji wyznaczano graficznie na podstawie uzyskanego wykresu.

Dodatkowo zbadano możliwość zastosowania opracowanej procedury HS-SPME/GC/FID w ocenie procesu rewersji zapachu w tłuszczu palmowym po jego rafinacji. Zidentyfikowano 5 związków, które mogą być bezpośrednio odpowiedzialne za powstawanie przykrego plastikowego zapachu dyskwalifikującego próbki oleju palmowego jako tłuszczu przeznaczonego na cele spożywcze. Procedurę UV/HS-SPME/GC/FID wykorzystano również w celu rozróżniania olejów rzepakowych uzyskanych z różnych odmian gatunkowych nasion rzepaku i oceny jego stabilności oksydacyjnej.

ABSTRACT

The thesis presents the possibility of using solventless extraction techniques in the stage of sample preparation to assess oxidation stability of edible oils. Those techniques in combination with capillary gas chromatography enable the significant simplification of isolation, enrichment and identification of volatile compounds extracted from difficult and complex matrix such as edible oils.

In the first step of research two procedures were developed in order to assess volatile compounds, mainly aldehydes. The optimal parameters of the sample preparation (sample volume, temperature and time of equilibrium, extraction and desorption) and the chromatographic conditions (type of capillary column, injector, oven and detector temperatures) were established.

Application of the ultraviolet irradiation as an accelerated oxidation factor together with HS-SPME/GC/FID and HSA/GC/FID techniques in order to prepare new methods of accelerated oxidation of edible oils was the next step of the laboratory studies. The optimal parameters of the UV irradiation (the power of the UV lamps, UV wave length, irradiation intensity, distance between oil surface and the light source, thickness of the oil film) were selected.

The developed procedures were next compared with the edible oil stability assessment methods recommended by the Polish Standards and with those applied in the national industry (peroxide and anisidine value, Rancimat test, Schaal oven test, shelf life test, manostatic method and DSC test). After verification, the developed procedures were applied in determination of volatile oxidation products of different kinds of vegetable oils. Their oxidative stability was calculated on the basis of the peak area ratio of two marker compounds (hexanal and nonanal) in the function of oxidation time. The induction period was determined graphically from the obtained graph.

Additionally, the possibility of application of the developed HS-SPME/GC/FID procedure to palm oil off-flavor reversion after refining was examined. Five compounds which could be directly responsible for off-flavor formation were identified. The UV/HS-SPME/GC/FID procedure was also used in distinction of rapeseed oils obtained from different variety of rape seeds and to assess their oxidative stability.

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje

1. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, "Nowe metody instrumentalne oceny jakości olejów jadalnych", *Tłuszcze Jadalne XLII*, 1/2, 72-92, 2007.
2. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, M. Lores, M. LLompart, M. Fernandez-Alvarez, K.Lipińska, "Investigation of edible oils oxidation stability using photooxidation and SPME/GC method for determination of volatile compounds – preliminary investigation", *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, **58** (3), 325-328, 2008.
3. B. Plutowska, **J. Gromadzka**, W. Wardencki, „Chromatografia gazowa z detekcją olfaktometryczną (GC-O) w analizie żywności. Część II: Metody i zastosowania”, *Analityka*, **3**, 24-28, 2008.
4. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, „Dobór optymalnych parametrów metody UV-HS-SPME/GC/FID do oceny stabilności oksydatywnej olejów roślinnych”, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **5** (60), 235-247, 2008.
5. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, „Analysis of volatile oxidation products in rapeseed oil” rozdział w “Advances in analysis and technology of rapeseed oil”., red. E Szłyk, str. 63-70, Wyd. Nauk. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń 2008.
6. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, „Techniki niechromatograficzne w analizie olejów roślinnych”, *Analityka* **3**, 29-32, 2009.
7. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “Opracowanie procedury oznaczania lotnych produktów utleniania olejów roślinnych techniką statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej”, *Rośliny Oleiste*, **XXX**, **1**, 103-118, 2009.
8. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “Comparison of oxidative stability of edible oils”, *Nauka Przyroda Technologie*, **3** (4), 1-10, 2009.
9. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, R. Pawłowicz, G. Muszyński, “Nowe techniki instrumentalne na tle tradycyjnych metod analizy stabilności oksydatywnej olejów roślinnych.”, *Tłuszcze Jadalne*, **XLIV**, 1/2, 71-80, 2009.
10. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “Selection of UV irradiation conditions for accelerated edible oil oxidation procedure”, rozdział w “Advances in research and technology of rapeseed oil”., red. E Szłyk, str. 11-19, Wyd. Nauk. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń 2009.
11. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “ Static headspace sampling and solid phase microextraction in edible oils stability assessment”, *Chromatographia*, **71**, 81-86, 2010.

12. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, "Trends in edible vegetable oils analysis. Part A: Determination of different components of edible oils", *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, przyjęto do druku.
13. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, "Trends in edible vegetable oils analysis. Part B: Application of different analytical techniques", *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, przyjęto do druku.
14. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, R. Pawłowicz, G. Muszyński, "Comparison the photoinduced and thermal oxidation of rapeseed and sunflower oils", *European Journal of Lipid Sciences and Technology*, w recenzji.

Komunikaty ustne

1. B. Plutowska, **J. Gromadzka**, W. Wardencki, „Zastosowanie techniki SPME-GC do oznaczania lotnych składników miodów”, IV Krajowe Sympozjum „Naturalne i Syntetyczne produkty zapachowe i kosmetyczne”, 20-22.06.2007 Łódź, Polska
2. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, „Nowe podejście do oceny jakości olejów jadalnych”, XXVIII Sesja Naukowa Komitetu Nauki o Żywności PAN „Żywność a jakość życia. Uwarunkowania technologiczne, higieniczne, żywieniowe i kulturowe.”, 20-22.09.2007 Olsztyn, Polska.
3. **J. Gromadzka**, Zastosowanie techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) do oznaczania lotnych związków zapachowych w roślinnych olejach jadalnych”, Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 24-25.09.2007 Gdańsk, Polska
4. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, „Zastosowanie analizy fazy nadpowierzchniowej do oceny stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych”, XXIX Konferencja Naukowa „Rośliny Oleiste”, 11-12.03.2008 Poznań, Polska
5. **J. Gromadzka**, „Opracowanie instrumentalnych metod oceny jakości organoleptycznej i stabilności oksydacyjnej wybranych tłuszczów roślinnych”, Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 22-23. 09. 2008, Gdańsk, Polska
6. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, A. Sienkiewicz, E. Boruszcak, M. Godlewska, “Application of UV-HS-SPME/GC/FID for the analysis of volatile oxidation products in rapeseed oil”, IX International Conference on Research and Technology – North European Olive Oil – Rapeseed Oil”, 25-27.09. 2008 Toruń, Polska
7. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “Analysis of volatile oxidation products in edible oils”, Challenges in Food Flavor Analysis. 06-07.04.2009 Poznań, Polska

8. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, R. Pawłowicz, G. Muszyński, “Metody tradycyjne a techniki instrumentalne w analizie stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych”, XVII Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Postępy w technologii tłuszczów roślinnych” 07-10.06.2009 Nowogród, Polska
9. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “Porównanie stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych z Polski, Finlandii i Hiszpanii”, XXXIX Sesja Komitetu Nauk o Żywności PAN “Postępy w wytwarzaniu i ocenie żywności”, 29.06-01.07.2009, Poznań, Polska
10. **J. Gromadzka**, “Zastosowanie technik instrumentalnych w analizie stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych”, Sesja Sprawozdawcza studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, 21-23. 09. 2009, Gdańsk, Polska
11. W. Wardencki, **J. Gromadzka**, M. Michulec, “A novel sample preparation procedures for assessment of canola oil quality”, World Congress on Oils and Fats & 28th ISF Congress, 27-30.09.2009, Sydney, Australia
12. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “Promieniowanie UV jako narzędzie w procesie przyspieszonego utleniania olejów roślinnych”, XXX Konferencja Naukowa „Rośliny Oleiste”, 16-17.03.2010 Poznań, Polska
13. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “Rewersja zapachu w oleju palmowym” XVIII Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Postępy w technologii tłuszczów roślinnych”, 26-29.05.2010 Lublin, Polska

Postery

1. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “The influence of UV radiation, temperature and time of storage on changes in rapeseed oil”, 13th International Symposium on Separation Sciences, 27-29.06.2007 Strbske Pleso, Republika Słowacka
2. **J. Gromadzka**, B. Plutowska, W. Wardencki, „Optimalization of HS-SPME/GC conditions for honey analysis”, 50 Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i 11 Międzynarodowa Konferencja Chemii Środowiska, 09-12.09.2007 Toruń, Polska
3. **J. Gromadzka**, M. Lores, W. Wardencki, K. Lipińska, M. Fernandez-Alvarez, „The application of HS-SPME technique for analysis of volatile compounds in vegetable oils.”, 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 7-9.11.2007 Praga, Republika Czeska
4. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, “Dobór optymalnych warunków do oceny stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych techniką HS-SPME/GC”, XIII Sesja Naukowa SMKN PTTŻ „Żywność współczesna – szanse i zagrożenia”, 28-29.05.2008, Łódź, Polska

5. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, "Comparison of head-space analysis (HSA) and solid-phase microextraction (SPME) for assessment of edible oils oxidation stability", 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, "Natural products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical interest, 3-8.08.2008 Ateny, Grecja
6. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, " Application of headspace solid phase microextraction gas chromatography for assessment of edible oils stability", 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, 02-04.09.2009, Siofok, Węgry
7. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, "Application of UV-HS-SPME/GC/FID/MS for analysis of volatile oxidation products in canola oil", World Congress on Oils and Fats & 28th ISF Congress, 27-30.09.2009, Sydney, Australia
8. **J. Gromadzka** "Zastosowanie techniki UV/HS-SPME/GC do oceny stabilności oksydacyjnej olejów jadalnych", Politechnika Gdańska – uniwersytet przedsiębiorczy XXI wieku, 24-26.05.2010, Gdańsk, Polska
9. **J. Gromadzka**, P. Biernacka, W. Wardencki, "Zastosowanie promieniowania UV w ocenie stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych", VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Analityka dla społeczeństwa XXI wieku, 4-9.07.2010, Kraków, Polska
10. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, "The application of the HS-SPME/GC technique in quality control of edible oils and fats", ExTech Advances in Extraction Technologies, 20-22.09.2010, Poznań, Polska

Wykłady, seminaria

1. **J. Gromadzka**, „Application of UV-HS-SPME/GC/FID to the analysis of volatile oxidation products in vegetable oils”, University of Applied Science, 15.09.2008, Seinajoki, Finlandia
2. **J. Gromadzka**, „Analiza fazy nadpowierzchniowej w oznaczaniu stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych”, 18.11.2008, Elstar Oils, Malbork, Polska
3. **J. Gromadzka**, „Nomenclature and classification of lipids”, International Project Week, 9-13.03.2009, University of Applied Science, Seinajoki, Finlandia
4. **J. Gromadzka**, „Chemistry and reaction of lipids”, International Project Week, 9-13.03.2009, University of Applied Science, Seinajoki, Finlandia
5. **J. Gromadzka**, „Instrumental methods of edible oils analysis”, International Project Week, 9-13.03.2009, University of Applied Science, Seinajoki, Finlandia

6. **J. Gromadzka**, „Volatile products of oils oxidation and headspace analysis”, International Project Week, 9-13.03.2009, University of Applied Science, Seinajoki, Finlandia
7. **J. Gromadzka**, „Solid phase microextraction as a tool to determine oils oxidative stability”, International Project Week, 9-13.03.2009, University of Applied Science, Seinajoki, Finlandia
8. **J. Gromadzka**, „Co drzemie w tłuszczach” 25.04.2009, Wykład podczas seminarium dla nauczycieli chemii w ramach programu „Za rękę z Einsteinem”, Politechnika Gdańska, Gdańsk, Polska
9. **J. Gromadzka**, „Rewersja zapachu w oleju palmowym”, 23.03.2010, wykład prezentowany podczas seminarium przemysłowego ZT Kruszwica S.A., Zakład Produkcyjny w Gdańsku, Polska
10. **J. Gromadzka**, „Flavour reversion sensitivity of rapeseed oils from different rapeseed varieties”, 20.04.2010, Warszawa, wykład prezentowany podczas seminarium przemysłowego Bunge R&D Meeting

Inne

1. J. Namieśnik, W. Wardencki, **J. Gromadzka**, „Jakość powietrza w województwie pomorskim – stan obecny i perspektywy.”. Redakcja i korekta materiałów konferencyjnych, I Pomorska Konferencja z cyklu JAKOŚĆ POWIETRZA, 25.06.2007, Gdańsk, Polska
2. W. Wardencki, **J. Gromadzka**, „I Pomorska Konferencja Jakość powietrza w województwie pomorskim – stan obecny i perspektywy.”. Sprawozdanie, *Analityka* **3**, 68-69, 2007
3. J. Namieśnik, W. Wardencki, **J. Gromadzka**, „Jakość powietrza w województwie pomorskim – stan obecny i perspektywy.”. Redakcja i korekta materiałów pokonferencyjnych, I Pomorska Konferencja z cyklu JAKOŚĆ POWIETRZA, 25.06.2007, Gdańsk, Polska
4. W. Wardencki, **J. Gromadzka**, „Tytułem wstępu: Jakość powietrza w województwie pomorskim – stan obecny i perspektywy.”, Materiały pokonferencyjne: I Pomorska Konferencja z cyklu JAKOŚĆ POWIETRZA, 25.06.2007, Gdańsk, Polska
5. **J. Gromadzka**, W. Wardencki, „Wykorzystanie techniki analizy fazy nadpowierzchniowej w analizie żywności” – Materiały do ćwiczeń, 8 str, www.pg.gda.pl/chem/Dydaktyka/Analityczna
6. J. Namieśnik, W. Wardencki, **J. Gromadzka**, Redakcja i korekta materiałów konferencyjnych, II Pomorska Konferencja z cyklu JAKOŚĆ POWIETRZA, 23-24.04.2009, Gdańsk, Polska
7. J. Namieśnik, W. Wardencki, **J. Gromadzka**, Redakcja i korekta materiałów pokonferencyjnych, II Pomorska Konferencja z cyklu JAKOŚĆ POWIETRZA, 23-24.04.2009, Gdańsk, Polska
8. P. Biernacka, **J. Gromadzka**, II Pomorska Konferencja z cyklu JAKOŚĆ POWIETRZA, Sprawozdanie, *Analityka* **3**, 2009

9. W. Wardencki, P. Biernacka, **J. Gromadzka**, „Tytułem wstępu – Jakość powietrza a jakość życia”, Materiały Pokonferencyjne, II Pomorska Konferencja z cyklu JAKOŚĆ POWIETRZA, 23-24.04.2009, Gdańsk, Polska

Przyznane granty, stypendia, wyróżnienia

1. **Projekt badawczy własny nr 312 056 31** finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Opracowanie instrumentalnych metod oceny jakości organoleptycznej wybranych półproduktów i produktów spożywczych”
2. Stypendium od firmy Elstar Oils umożliwiające uczestnictwo w międzynarodowej konferencji.
3. Stypendium za wyróżniający się dorobek naukowy z Własnego Funduszu Stypendialnego Rektora PG za okres III-VII. 2008r.
4. Stypendium za wyróżniający się dorobek naukowy z Własnego Funduszu Stypendialnego Rektora PG za okres X. 2008 - VII. 2009r
5. Stypendium za wyróżniający się dorobek naukowy z Własnego Funduszu Stypendialnego Rektora PG za okres XII. 2009 - VII. 2010r
6. Stypendium za wyniki w nauce przyznane 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”, 1.12.2008-30.07.2009
7. **Projekt badawczy promotorski nr 312 227 936** finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Nowe procedury oznaczania stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych z wykorzystaniem chromatografii gazowej”.
8. Stypendium naukowe i projekt badawczy „Ocena stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych z zastosowaniem promieniowania UV oraz techniki SPME/GC” w ramach programu **Ventures nr 2009-3/3** przyznane na okres 01.07.2009-30.10.2010 przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, Priorytet 1. Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Działanie 1.2 Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki
9. Stypendium naukowe przyznane na okres 01.10.2009-30.07.2010 ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach projektu pt. **Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii**”, nr umowy **POKL.04.01.02-00-368/09** realizowanym przez Politechnikę Gdańską w ramach Priorytetu IV Szkolnictwo wyższe i nauka, Działanie 4.1 Wzmocnienie i rozwój potencjału dydaktycznego

uczelni oraz zwiększenie liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki opartej na wiedzy, Poddziałanie 4.1.1. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki od 01.10.2009 do 30.09.2015.

Staże krajowe i zagraniczne:

1. Finlandia, Seinajoki University of Applied Science, scientific consultation, 16-19.06.2008
2. Finlandia, Seinajoki University of Applied Science, scientific consultation, 15.08.-15.09.2008
3. Finlandia, Seinajoki University of Applied Science, scientific consultation, 09-13.03.2009

LITERATURA

1. van Aardt M., Duncan S.E., Long T.E., O'Keefe S.F., Marcy J.E., Sims S.R. (2004). Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: thermogravimetric analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(3), 587-591.
2. Akoh C.C., Min D.B. (2008) Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Wyd. CRC Press, USA, 2008.
3. Al-Alawi A., van de Voort F.R., Sedman J., Ghetler A. (2006). Automated FTIR analysis of free fatty acids or moisture in edible oils. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 11(1), 23-29.
4. Alasalvar C., Shahidi F., Ohshima T., Wanasundara U., Yurttas H.C., Liyanapathirana C.M., Rodrigues F.B. (2003). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 2. Lipid characteristics and oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(13), 3797-3805.
5. Albi T., Lanzon A., Guinda A., Leon M., Perez-Camino M.C. (1997). Microwave and conventional heating effects on thermoxidative degradation of edible fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(10), 3795-3798.
6. Allouche Y., Jimenez A., Gaforio J.J., Uceda M., Beltran G. (2007). How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(23), 9646-9654.
7. Angelo A.J.St., Vercellotti J.R., Legengre M.G., Vinnelt C.H., Kuan J.W., Janies C., Duppy H.P. (1987). Chemical and instrumental analysis of warmed-over flavor in beef. *Journal of Food Science* 52, 1163-1168.
8. Angiuli M., Ferrari C., Lepori L., Matteoli E., Salvetti G., Tombari E., Banti A., Minnaja N. (2006). On testing quality and traceability of virgin olive oil by calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 84(1), 105-112.
9. Anwar F., Bhanger M.I., Kazi T.G. (2003) Relationship between Rancimat and Active Oxygen Method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80(2), 151-155.
10. Aparicio R., Aparicio-Ruíz R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 881(2000), 93-104.
11. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M. (2007). Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 596, 330-337.
12. Arthur C., Pawliszyn J. (1990). Solid-Phase microextraction with Thermal Desorption using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry* 62, 2145-2148.
13. Baeten V., Pierna J.A.F., Dardenne P., Meurens M., Garcia-Gonzalez D.L., Aparicio-Ruiz R. (2005). Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-Raman and FT-MIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(16), 6201-6206.
14. Barte S.D., Kim H.J., Min D.B. (2007). Effects of antioxidants on the oxidative stability of oils containing arachidonic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84, 363-368.
15. Belitz H-D., Grosch W., Schieberle P. (2009). Food Chemistry, Wyd. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.
16. Belsito E.L., Carbone C., di Gioia M.L., Leggio A., Liguori A., Perri F., Siciliano C., Viscomi M.C., (2007). Comparison of the volatile constituents in cold-pressed bergamot oil and a volatile oil isolated by vacuum distillation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7847-7851.
17. Bendini A., Valli E., Cerretani L., Chiavaro E., Lercker G. (2009). Study on the effect of heating of virgin olive oil blended with mildly deodorized olive oil: focus on the hydrolytic and oxidative state. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(21), 10055-10062.
18. Benitez-Sanchez P.L., Leon-Camacho M., Aparicio R. (2003). A comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *European Food Research and Technology*, 218, 13-19.
19. Berger K.G. (2008a). Palm Oil & Palm Kernel Oil Applications, Wyd. Malaysian Palm Oil Council, Selangor, Malaysia, 2008.
20. Berger K.G. (2008b). Malaysian Palm Oil. Fact Sheets, Wyd. Malaysian Palm Oil Council, Selangor, Malaysia, 2008.
21. Bester E., Butinar B., Bucar-Miklavcic M., Golob T. (2008). Chemical changes in extra virgin olive oils from Slovenian Istra after thermal treatment. *Food Chemistry* 108, 446-454.
22. Biswas S., Heindselmen K., Wohltjen H., Staff Ch. (2004). Differentiation of vegetable oils and determination of sunflower oil oxidation using a surface acoustic wave sensing device. *Food Control* 15, 19-26.

23. Blanch G.P., Villen J., Herraiz M. (1998). Rapid analysis of free erythrodiol and uvaol in olive oils by coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1027-1030.
24. Bonoli M., Bendini A., Cerretani L., Lercker G., Toschi T.G. (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(23), 7026-7032.
25. Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry* 108, 253-262.
26. Broadbent C.J., Pike O.A. (2003). Oil stability index correlated with sensory determination of oxidative stability in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80(1), 59-63.
27. Byrdwell W.C., Neff W.E., List G.R. (2001). Triacylglycerol analysis of potential margarine base stocks by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and flame ionization detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(1), 446-457.
28. Camel V. (2002). Extraction techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372, 39-40.
29. Capote F.P., Jimenez J.R., de Castro M.D.L. (2007). Sequential (step-by-step) detection, identification and quantitation of extra virgin olive oil adulteration by chemometric treatment of chromatographic profiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 1859-1865.
30. Carrasco_Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Lercker G., Fernandez-Gutierrez A. (2007). Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(12), 4771-4780.
31. Caruso D., Colombo R., Patelli R., Giavarini F., Galli G. (2000). Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(4), 1182-1185.
32. Casella I.G., Contursi M. (2004). Quantitative analysis of acrolein in heated vegetable oils by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5816-5821.
33. Catharino R.R., Haddad R., Cabrini L.G., Cunha I.B.S., Sawaya A.C.H.F., Eberlin M.N. (2005). Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, quality, adulteration and aging. *Analytical Chemistry* 77, 7429-7433.
34. 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 Chemistry*, 88, 151-157.
35. Cecchi T., Passamonti P., Cecchi P. (2010). Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without an oxygen scavenger. *Food Chemistry* 120, 730-735.
36. Chiavaro E., Barnaba C., Vittadini E., Rodriguez-Estrada M.T., Cerretani L., Bendini A. (2009). Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part II. Effect on thermal properties. *Food Chemistry* 115, 1393-13400.
37. Chiou R.Y.-Y., Liu C-P., Hou C-J., Liu C-D. (1995). Comparison of fatty acid composition and oxidative stability of peanut oils prepared from spring and fall crops of peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(3), 676-679.
38. Choe E., Min D.B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5, 169-186.
39. Choe E., Min D.B. (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Sciences* 72(5), 77-86
40. Christy A.A., Egeberg P.K., Ostensen E.T. (2003). Simultaneous quantitative determination of isolated *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in oils and fats by chemometric analysis of the infrared profiles. *Vibrational Spectroscopy* 33, 37-48.
41. Comandini P., Verardo V., Maiocchi P., Caboni M.F. (2009). Accelerated oxidation: Comparative study of a new reactor with oxidation stability instrument. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 933-940.
42. Contini M., Esti M. (2006). Effect of the matrix volatile composition in the headspace solid-phase microextraction analysis of extra virgin olive oil. *Food Chemistry* 94, 143-150.
43. Coppin E.A., Pike O.A. (2001). Oil stability index correlated with sensory determination of oxidative stability in light-exposed soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78(1), 13-18.
44. Cortes J.M., Sanchez R., Villen J., Vazquez A. (2006) Analysis of unsaponifiable compounds of edible oils by automated on-line coupling reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 6963-6968.
45. Cross C.K. (1970). Oil stability: a DSC alternative for the active oxygen method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 47, 229-230.

46. Daniels R.L., Kim H.J., Min D.B. (2006). Hydrogenation and interesterification effects on the oxidative stability and melting point of soybean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(16), 6011-6015.
47. Deiana M., Rosa A., Cao C.F., Pirisi F.M., Bandino G., Dessi M.A. (2002). Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: importance of α -tocopherol concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(15), 4342-4346.
48. Destailats F., Cruz-Hernandez C. (2007). Fast analysis by gas-liquid chromatography. Perspective on the resolution of complex fatty acid compositions. *Journal of Chromatography A*, 1169, 175-178.
49. Doleschall F., Kemeny Z., Recseg K., Kovari K. (2001). Monitoring of Lipid Degradation Products by Solid-Phase Microextraction. *Journal of Microcolumn Separations*, 13(6), 215-220.
50. Doleschall F., Kemeny Z., Recseg K., Kovari K. (2002). A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 14-18.
51. Doleschall F., Recseg K., Kemeny Z., Kovari K. (2003). Comparison of differently coated SPME fibres applied for monitoring volatile substances in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 333 - 338
52. Drozdowski B. (1988). Lipidy, w: Chemia Żywności (Sikorski Z.E., Drozdowski B., Samotus B., Pałasiński M.). Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1988.
53. Farhoosh R. (2007). The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84, 205-209.
54. Farhoosh R., Kenari R.E., Poorazrang H. (2009). Frying stability of canola oil blended with palm olein, olive and corn oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 71-76.
55. Farhoosh R., Pazhouhanmehr S. (2009). Relative contribution of compositional parameters to the primary and secondary oxidation of canola oil. *Food Chemistry* 114, 1002-1006.
56. Ferrari C., Angiuli M., Tombari E., Righetti M.C., Matteoli E., Salvetti G. (2007). Promoting calorimetry for olive oil authentication. *Thermochimica Acta* 459, 58-63.
57. Frankel E.N. (1993). Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70(8), 767-772.
58. Frankel E.N., Huang S.-W., Kanner J., German J.B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 42(5), 1054-1059.
59. Frankel E.N., Huang S.-W., Aeschbach R. (1997). Antioxidant activity of green teas in different lipid system. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74(10), 1309-1315.
60. Garcia-Martinez M.C., Marque-Ruiz G., Fontecha J., Gordon M.H. (2009). Volatile oxidation compounds in a conjugated linoleic acid-rich oil. *Food Chemistry* 113, 926-931.
61. Gawęcki J., Czarnocińska J. (1997). Rola tłuszczu w żywieniu i ochronie zdrowia., str 57-73 w Prawda o tłuszczach red. Gawęcki J., Wyd. Instytut Danone, Warszawa 1997.
62. Giacometti J., Milosevic A., Milin C. (2002). Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 976, 47-54.
63. Giuffrida F., Destailats F., Egart M.H., Hug B., Golay P-A., Skibsted L.H., Dionisi F. (2007). Activity and thermal stability of antioxidants by differential scanning calorimetry and electron spin resonance spectroscopy. *Food Chemistry* 101, 1108-1114.
64. Gliszczyńska-Świągło A., Sikorska E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A* 1048, 195-198.
65. Godlewki J. (1997). Generacja i detekcja promieniowania optycznego. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1997.
66. Gomes T., Caponio F. (1999). Effort to improve the quantitative determination of oxidation and hydrolysis compound classes in edible vegetable oils. *Journal of Chromatography A* 844, 77-86.
67. Gomez-Alonso S., Salvador M.D., Fregapane G. (2002). Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(23), 6812-6817.
68. Gomez-Ariza J.L., Arias-Borrego A., Garcia-Barrera T., Beltran R. (2006). Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication. *Talanta* 70, 859-869.
69. Gordon M.H., Mursi E. (1994). A comparison of oil stability based on the Metrohm Rancimat with storage at 20 °C. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71(6), 640-651.
70. Gordon M.H., Mursi E., Rossell J.B. (1994). Assessment of thin-film oxidation with ultraviolet irradiation for predicting the oxidative stability of edible oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71(12), 1309-1313.
71. Gromadzka J., Wardencki W., Lores M., LLompart M., Fernandez-Alvarez M., Lipińska K. (2008a). Investigation of edible oils oxidation stability using photooxidation and SPME/GC method for

- determination of volatile compounds – preliminary investigation. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58(3), 325-328
72. Gromadzka J., Wardencki W. (2008b). Analysis of volatile oxidation products in rapeseed oil. str. 63-70 w *Advances in analysis and technology of rapeseed oil*. red. E.Szłyk, Wyd. Nauk. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 2008.
 73. Gromadzka J., Wardencki W. (2010). Static headspace sampling and solid-phase microextraction in edible oils stability assessment. *Chromatographia*, 71, 81-86.
 74. Guillen M.D., Cabo N. (1999). Usefulness of the frequency data of the fourier transform infrared spectra to evaluate the degree of oxidation of edible oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2), 709-719.
 75. Guo L., Xie M-Y., Yan A-P., Wan Y-Q., Wu Y-M. (2006). Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 1881-1887.
 76. Gutierrez F., Fernandez J.L. (2002). Determinat parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of “extra” quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(3), 571-577.
 77. Haddada F. M., Manai H., Daoud D., Fernandez X., Lizzani-Cuvelier L., Zarrouk M. (2007). Profiles of volatile compounds from some monovarietal Tunisian virgin olive oils. Comparison with French PDO. *Food Chemistry* 103, 467-476.
 78. Haddad R., Milagre H.M.S., Catharino R.R., Eberlin M.N. (2008). Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Analytical Chemistry* 80, 2744-2750.
 79. Haiyan Z., Bedgood Jr. D.R., Bishop A.G., Prenzler P.D., Robards K.R. (2007). Endogenous biphenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food Chemistry* 100, 1544-1551.
 80. Harwood J., Aparicio R. (2000). Handbook of olive oil. Wyd. Aspen Publ., MD, 2000.
 81. Hassel R.L. (1976). Thermal analysis: an alternative method of measuring oil stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 53,179-181.
 82. Hendl O., Howell J.A., Lowery J., Jones W. (2001). A rapid and simple metod for determination of iodine values using derivative Fourier transform infrared measurements. *Analytica Chimica Acta* 427, 75-81.
 83. Heś M., Korczak J., Nogala-Kalucka M., Jędrusek-Golińska A., Gramza A. (2001). Przydatność przyspieszonych metod badania trwałości stabilizowanego oleju rzepakowego. *Rośliny Oleiste*, 22, 517-526.
 84. Hidalgo F.J., Gomez G., Navarro J.L., Zamora R. (2002). Oil stability prediction by high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5825-5831.
 85. Hilali M., Charrouf Z., El Aziz Soulhi A., Hachimi L., Guillaume D. (2007). Detection of argan oil adulteration Rusing quantitative campesterol GC-Analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(8), 761-764.
 86. Hrcirik K., Fritsche S. (2005). Relation between the endogenous antioxidant system and the quality of extra virgin olive oil under accelerated storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6), 2103-2110.
 87. Huang Sh-W., Frankel E.N. (1997). Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(8), 3033-3038.
 88. Janssen H-G., Boers W., Steenbergen H., Horsten R., Floter E. (2003). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography x gas chromatography: Evaluation of the applicability for the analysis of edible oils and fats. *Journal of Chromatography A* 1000, 385-400.
 89. 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.
 90. 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(2000), 2360-2367.
 91. Jia M, Kim H.J., Min D.B. (2007). Effects of soybean oil and oxidized soybean oil on the stability of β -carotene. *Food Chemistry*, 103, 695-700.
 92. Jimenez A., Beltran G., Aguilera M.P (2004). Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils. *Journal of Chromatography A*, 1028, 321-324.
 93. Jimenez A., Aguilera M.P., Beltran G., Uceda M. (2006). Application of solid-phase microextraction to virgin olive oil quality control. *Journal of Chromatography A*, 1121, 140-144.
 94. Johnson G.L., Machado R.M., Freidl K.G., Achenbach M.L., Clark P.J., Reidy S.K. (2002). Evaluation of Raman spectroscopy for determining *cis* and *trans* isomers in partially hydrogenated soybean oil. *Organic Process Research & Development* 6, 637-644.
 95. Kalua C.M., Bedgood D.R. Jr., Prenzler P.D. (2006). Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 556, 407-414.

96. Kanavouras A., Kiritsakis A., Hernandez R.J. (2005). Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction. *Food Chemistry*, 90, 69-79.
97. Kardash-Strochkova E., Tur'yan Y.I., Kuselman I. (2001). Redox-potentiometric determination of peroxide value in edible oils without titration. *Talanta* 54, 411-416.
98. Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(2000), 35-62.
99. Katragadda H.R., Fullana A., Sidhu S., Carbonell-Barrachina A.A. (2010). Emissions of volatile aldehydes from heated cooking oils. *Food Chemistry* 120, 59-65.
100. Kaufman M., Wiesman Z. (2007). Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10405-10413.
101. Kawai Y., Takeda S., Terao J. (2007). Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 20, 99-107.
102. O'Keefe S.F., Proudfoot F.G., Ackman R.G. (1995). Lipid oxidation in meats of omega-3 fatty acid-enriched broiler chickens. *Food Research International* 28, 417-424.
103. Keszler A., Kriska T., Nemeth A. (2000). Mechanism of volatile compound production during storage of sunflower oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(12), 5981-5985
104. Keszler A., Heberger K. (1998). Identification of volatile compounds in sunflower oil by headspace SPME and ion-trap GC/MS. *Journal of High Resolution Chromatography* 21, 368-370.
105. Keszler A., Heberger K., Gude M. (1998). Quantitative Analysis of Aliphatic Aldehydes by Headspace SPME Sampling and Ion-Trap GC-MS. *Chromatographia*, 48(1/2), 127-132.
106. Khallouki F., Mannica L., Viel S., Owen R.W. (2008). Thermal stability and long-chain fatty acid positional distribution on glycerol of argan oil. *Food Chemistry* 110, 57-61.
107. Kim H.J., Hahm T.S., Min D.B. (2007a). Hydroperoxide as a prooxidant in the oxidative stability of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84, 349-355.
108. Kim H.J., Lee H.O., Min D.B. (2007b). Effects and prooxidant mechanisms of oxidized α -tocopherol on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science* 72(4), 223-230.
109. Kodali D.R. (2005). Oxidative stability measurement of high-stability oils by pressure differential scanning calorimeter (PDSC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7649-7653.
110. Kolb B. (1999). Headspace sampling with capillary columns. *Journal of Chromatography A*, 842, 163-205.
111. Konieczka P. (2003). Sposoby wyznaczania granicy wykrywalności i oznaczalności. *Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 10(7), 639-654.
112. Konieczka P. (2003). Walidacja metodyk analitycznych. *Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 10(10), 1071-1099.
113. Korczak J., Janitz W., Heć M., Nogala-Kałużka M., Gogolewski M. (1999). Stabilizacja oleju rzepakowego przy wykorzystaniu naturalnych przeciwutleniaczy. *Rośliny Oleiste* 20, 569-579.
114. Koski A., Psomiadou E., Tsimidou M., Hopia A., Kefalas P., Wahala K., Heinonen M. (2002). Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *European Food Research and Technology* 214, 294-298.
115. Lampi A.-M., Piironen V., Hopia A., Koivistoinen P. (1997). Characterization of the oxidation of rapeseed and butter oil triacylglycerols by four analytical methods. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30, 807-813.
116. Lankmayr E., Mocak J., Seret K., Balla B., Wenzl T., Bandoniene D., Gfrerer M., Wagner S. (2004). Chemometrical classification of pumpkin seed oils using UV-Vis, NIR and FTIR spectra. *Journal of biochemical and biophysical methods* 61, 95-106.
117. Lauridsen J., Schultz A. (1993). Antioxidants: improving the shelf life of food products. *Food Marketing & Technology* 19, 6-10.
118. Leclercq S., Reineccius G.A., Milo C. (2007). Effect of type of oil and addition of δ -tocopherol on model flavor compound stability during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(22), 9189-9194.
119. Lee J.M., Chung H., Chang P.-S., Lee J.H. (2007). Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry* 103, 662-669.
120. Lee J.M., Kim D.-H., Chang P.-S., Lee J.H. (2007). Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) analysis of oxidized volatiles from free fatty acids (FFA) and application for measuring hydrogen donating antioxidant activity. *Food Chemistry* 105, 414-420.
121. Lee J.M., Chang P.-Sh., Lee J.H. (2010). Effects of photosensitisation and autooxidation on the changes of volatile compounds and headspace oxygen in elaidic *trans* fatty acid and oleic *cis* fatty acid. *Food Chemistry* 119, 88-94.
122. Lee S.-H., Min D.B. (1990) Effects, quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(8), 1630-1634.
123. Lidfeldt J.-O. (2007). Vegetable oils and fats. Handbook, Wyd. AAK AB, Karlshamn, Sweden 2007.

124. Liescheski P.B. (1996). Supercritical fluid extraction coupled to infrared spectroscopy for iodine number analysis of edible oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 823-828.
125. Lisa M., Holcapek M., Rezanka T., Kabatova N. (2007). High-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detection characterization of $\Delta 5$ -polyenoic fatty acids in triacylglycerols from conifer seed oils. *Journal of Chromatography A*, 1146, 67-77.
126. List G.R., Evans C.D., Kwolek W.K., Warner K. Bound B.K. (1974). Oxidation and quality of soybean oil: A preliminary study of the anisidine test. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 51, 17-21.
127. Lizzani-Cuvelier L., Zarrouk M. (2007). Profiles of volatile compounds from some monovarietal Tunisian virgin olive oils. Comparison with French PDO. *Food Chemistry*, 103, 467-476.
128. van Loon W.A.M., Linszen J. P.H., Legger A., Posthumus M.A., Voragen A.G.J (2005). Identification and olfactometry of French fries flavour extracted at mouth conditions. *Food Chemistry*, 90(2005), 417-425.
129. Lopez-Lopez A., Montano A., Ruiz-Mendez M.V., Garrido-Fernandez A. (2008). Sterols, fatty acids and triterpenic alcohols in commercial table olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85, 253-262.
130. Lorenzo I.M., Pavon J.L.P., Laespada M.E.F., Pinto C.G., Cordero B.M. (2002a). Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 945, 221-230.
131. Lorenzo I.M., Pavon J.L.P., Laespada M.E.F., Pinto C.G., Cordero B.M., Henriques L.R., Peres M.F., Simoes M.P., Lopes P.S. (2002b). Application of headspace-mass spectrometry for differentiating sources of olive oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374, 1205-1211.
132. Małecka M. (1995). Składniki frakcji nieglicerydowej olejów roślinnych jako przeciwutleniacze. *Tuszcze Jadalne* 30(3), 123-130.
133. Mancebo-Campos V., Salvador M.D., Fregapane G. (2007). Comparative study of virgin olive oil behavior under Rancimat accelerated oxidation conditions and long-term room temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(20), 8231-8236.
134. del Mar Caja M., del Castillo M.L.R., Alvarez R.M., Herraiz M., Blanch G.P. (2000). Analysis of volatile compounds in edible oils using simultaneous distillation-solvent extraction and direct coupling of liquid chromatography with gas chromatography. *European Food Research and Technology* 211, 45-51.
135. Maszewska M., Krygier K. (2005). Badanie zależności występowania pierwotnych i wtórnych produktów utleniania w rafinowanym oleju rzepakowym i słonecznikowym. *Rośliny Oleiste* 26, 611-620.
136. Mateos R., Trujillo M., Perez-Camino M.C., Moreda W., Cert A. (2005). Relationship between oxidative stability, triacylglycerol composition and antioxidant content in olive oil matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(14), 5766-5771.
137. Mateos R., Uceda M., Aguilera M.P., Escuderos M.E., Maza G.B. (2006). Relationship of Rancimat method values at varying temperatures for virgin olive oils. *European Food Research and Technology* 223, 246-252.
138. Matthaus B., Guillaume D., Gharby S., Haddad A., Harhar H., Charrouf Z. (2010). Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chemistry* 120, 426-432.
139. Medina I., Satue-Gracia M.T., Frankel E.N. (1999a). Static headspace gas chromatographic analyses to determine oxidation of fish muscle lipids during thermal processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76(2), 231-236.
140. Medina I., Satue-Gracia M.T., German J.B., Frankel E.N. (1999b). Comparison of natural polyphenol antioxidants from extra virgin olive oil with synthetic antioxidant in tuna lipids during thermal oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(12), 4873-4879.
141. Mendez E., Sanhueza J., Speisky H., Valenzuela A. (1996). Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(8), 1033-1037.
142. Michulec M., Wardencki W. (2007). Validation of SPME-GC and HS-GC procedures for the determination of selected solvent residues in edible oil matrices. *Accreditation and Quality Assurance* 12, 94-104.
143. Michulec M., Wardencki W. (2005). Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography method for the determination of solvent residues in edible oils and pharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 1071, 119-124.
144. Michulec M., Wardencki W. (2004). Determination of Solvents Residues in Vegetable Oils and Pharmaceuticals by Headspace Analysis and Capillary Gas Chromatography. *Chromatographia*, 60, 273-277.
145. Mildner-Szkudlarz S., Jeleń H.H., Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E. (2003). Application of headspace—solid phase microextraction and multivariate analysis for plant oils differentiation. *Food Chemistry*, 83, 515-522.
146. Miraliakbari H., Shahidi F. (2008). Oxidative stability of tree nut oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(12), 4751-4759.

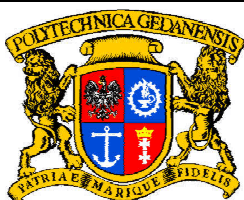
147. Moreno M.C.M.M., Olivares D.M., Lopez F.J.A., Adelantado J.V.G., Reig F.B. (1999). Determination of unsaturation grade and *trans* isomers generated during thermal oxidation of edible oils and fats by FTIR. *Journal of Molecular Structure* 482-483, 551-556.
148. Moser H.A., Evans C.D., Cowan J.C., Kwolek W.F. (1965). A light test to measure stability of edible oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 42, 30-33.
149. Muik B., Lendl B., Molina-Diaz A., Valcarcel M., Ayora-Canada M.J. (2007). Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 593, 54-67.
150. Naglic M., Smidovnik A. (1997). Use of capillary gas chromatography for determining the hydrogenation level of edible oils. *Journal of Chromatography A* 767, 335-339.
151. Nogala-Kałucka M., Muśnicki Cz., Kupezyk B., Jasińska-Stępnik A., Bartkowiak-Fludra E., Siger A. (2005). Preliminary studies of tocopherol content in seeds of open pollinated and hybrid varieties of winter rape. *Rośliny Oleiste*, 26, 561-570.
152. Noguera-Orti J.F., Villanueva-Camanas R.M., Raimis-Ramos G. (1999). Direct injection of edible oils as microemulsions in a micellar mobile phase applied to the liquid chromatographic determination of synthetic antioxidants. *Analytica Chimica Acta* 387, 127-134.
153. Nourou P.G., Georgiou C.A., Polissiou M.G. (1999). Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil peroxide value. *Analytica Chimica Acta* 389, 239-245.
154. Oro T., Bolini H.M.A., Arellano D.B., Block J.M. (2009). Physicochemical and sensory quality of crude brazilian pecan nut oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 971-976.
155. Pacheco-Palencia L.A., Mertens-Talcott S., Talcott S.T. (2008). Chemical composition, antioxidant properties and thermal stability of a phytochemical enriched oil from acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, doi: 10.1021/jf800161u.
156. Page B.D., Lacroix G. (2000). Analysis of volatile contaminants in vegetable oils by headspace solid-phase microextraction with carboxen-based fibres. *Journal of Chromatography A* 873, 79-94.
157. Pawliszyn J. (2003). Sample Preparation: Quo Vadis? *Analytical Chemistry*, 75, 2543 – 2558.
158. Pawliszyn J. (1997). Solid phase microextraction: theory and practice. New York: Wiley-VCH, 1997.
159. Pellegrini N., Visioli F., Buratti S., Brighenti F. (2001). Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(5), 2532-2538.
160. Pereira J.A., Casal S., Bento A., Oliveira M.B.P.P. (2002). Influence of olive storage period on oil quality of three Portuguese cultivars of *Olea europaea* *cobrancosa*, *madural* and *verdeal* transmontana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(22), 6335-6340.
161. Plutowska B., Wardencki W. (2007). Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101, 845-872.
162. Płatek T. (1995). Metoda określania stabilności oksydacyjnej olejów i tłuszczów w aparacie Rancimat. *Tłuszcze Jadalne*, 30, 25-34.
163. Poulli K.I., Mousdis G.A., Georgiou C.A. (2005). Classification of edible and lampante virgin olive oil based on synchronous fluorescence and total luminescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 542, 151-156.
164. Poulli K.I., Mousdis G.A., Georgiou C.A. (2009). Monitoring olive oil oxidation under thermal and UV stress through synchronous fluorescence spectroscopy and classical assays. *Food Chemistry* 117, 499-503
165. Povolo M, Contarini G. (2003). Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis of the volatile fraction of butter. *Journal of Chromatography A*, 985, 117-125.
166. PN-EN ISO 5509: 2001. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Przygotowanie estrów metyloowych kwasów tłuszczowych.
167. PN-EN ISO 5508:1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metyloowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
168. PN-EN ISO 660 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości.
169. PN-EN ISO 6886: 1997. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie stabilności oksydacyjnej. (Test przyspieszonego utleniania).
170. PN-EN ISO 6885: 2001. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby anizydowej.
171. PN-EN ISO 3960: 2005. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenującej.
172. PN-EN ISO 3961:1998. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby jodowej
173. Purcaro G., Morrisom P., Moret S., Conte L.S., Marriott P.J. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils using solid-phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161, 284-291.
174. Ravi R., Prakash M., Bhat K.K. (2005). Sensory odour profiling and physical characteristics of edible oil blends during frying. *Food Research International* 38, 59-68.

175. Richards A., Wijesundera C., Salisbury P. (2005). Evaluation of oxidative stability of canola oils by headspace analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82(12), 869-874.
176. Romanik G., Gilgenast E., Przyjazny A., Kamiński M. (2007). Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical methods* 70, 253-261.
177. Romero M.P., Tovar M.J., Girona J., Motilva M.J. (2002). Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. Cv. Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(19), 5349-5354.
178. Romero N., Robert P., Masson L., Ortiz J., Gonzalez K., Tapia K., Dobaganes C. (2007). Effect of α -tocopherol, α -tocotrienol and Rosa mosqueta shell extract on the performance of antioxidant-stripped canola oil (*Brassica* sp) at high temperature. *Food Chemistry* 104, 383-389.
179. Rotkiewicz D., Murawa D., Konopka I., Warmiński K. (2000). Glukozytolany nasion dwóch odmian rzepaku jarego traktowanego herbicydami. *Rośliny Oleiste*, 21, 271-277.
180. Rudzińska M., Muśnicki Cz., Wąsowicz E. (2003). Fitosterole i ich pochodne utlenione w nasionach rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste*, 24, 51-66.
181. Rudzińska M., Przybylski R., Wąsowicz E. (2009). Products formed during thermo-oxidative degradation of phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 651-662
182. Ruiz-Mendez M.V., Dobarganes M.C. (2007). Combination of chromatographic techniques for analysis of complex deodorizer distillates from an edible oil refining process. *Food Chemistry* 103, 1502-1507.
183. Saad B., Wai W.T., Lim B.P., Saleh M.I. (2006) Flow injection determination of peroxide value in edible oils using triiodide detector. *Analytica Chimica Acta* 565, 261-270.
184. Sabliov C.M., Fronczek C., Astete C.E., Khachatryan M., Khachatryan L., Leonardi C. (2009). Effects of temperature and UV light on degradation of α -tocopherol in free and dissolved form. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 895-902.
185. Santos J.C.O., Santos M.G.O., Dantas J.P., Conceicao M.M., Athaide-Filho P.F., Souza A.G. (2005). Comparative study of specific heat capacities of some vegetable oils obtained by DSC and microwave oven. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 79, 283-287.
186. Senorans F.J., Villen J., Tabera J., Herraiz M. (1998). Simplex optimization of the direct analysis of free sterols in sunflower oil by on-line coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(3), 1022-1026.
187. Senorans F.J., Tabera J., Herraiz M. (1996). Rapid separation of free sterols in edible oils by on-line coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(10), 3189-3192.
188. Shahidi F., Pegg R.B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids* 1, 177-186.
189. Shahidi F., Spurvey S.A. (1996). Oxidative stability of fresh and heat-processed dark and whit muscles of mackerel (*Scomber scombrus*). *Journal of Food Lipids* 3, 13-25.
190. Shahidi F., Wanasundara U.N. (2008). Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. str. 387-407 w *Food Lipids*, red. Akoh C.C., Min D.B., Wyd. CRC Press, USA, 2008.
191. Shaw A.D., di Kamillo A., Vlahov G., Jones A., Bianchi G., Rowland J., Kell D.B. (1997). Discrimination of variety and region of origin of extra virgin olive oils using ^{13}C NMR and multivariate calibration with variable reduction. *Analytica Chimica Acta* 348, 357-374.
192. Siger A., Nogala-Kałużka M., Lampart-Szczapa E., Hoffmann A. (2004). Zawartość związków fenolowych w nowych odmianach rzepaku. *Rośliny Oleiste* 25, 263-274.
193. Siger A., Nogala-Kałużka M., Lampart-Szczapa E., Hoffmann A. (2005). Antioxidant activity of phenolic compounds of selected cold-pressed and refined plant oils. *Rośliny Oleiste* 26, 549-559.
194. Sikorska E., Romaniuk A., Khmelinskii I.V., Herance R., Bourdelande J.L., Sikorski M., Koziół J. (2004). Characterization of edible oils using total luminescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence* 14(1), 25-35.
195. Sikorska E., Górecki T., Khmelinskii I.V., Sikorski M., Koziół J. (2005). Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry* 89, 217-225
196. Simon P., Kolman L. (2001). DSC study of oxidation induction periods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 64, 813-820.
197. Smith S.A., King R.E., Min D.B. (2007). Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. *Food Chemistry* 102, 1208-1213.
198. Snow N.H., Snack G.C. (2002). Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 21 (9+10), 608 – 617.
199. Spielmeyer A., Wagner A., Jahreis G. (2009). Influence of thermal treatment of rapeseed on the canolol content. *Food Chemistry* 112, 944-948.

200. Stashenko E.E., Martinez J.R. (2004). Derivatization and solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 553-561.
201. Stevenson D.G., Eller F.J., Wang L., Jane J-L., Wang T., Inglett G.E. (2007). Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(10), 4005-4013.
202. Sullivan J.C., Budge S.M., St-Onge M. (2009). Determining ethyl esters in fish oil with solid phase microextraction and GC-MS. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 743-748.
203. Supelco Bulletin 869A: SPME: Sample preparation for monitoring flavor compounds by capillary gas chromatography.
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/4524.Par.0001.File.tmp/4524.pdf>
204. Supelco Bulletin 923: SPME: Theory and optimization of conditions.
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/4547.Par.0001.File.tmp/4547.pdf>
205. Szlyk E., Szydłowska-Czerniak A., Kowalczyk-Marzec A. (2005). NIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of natural α -tocopherol in vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6980-6987.
206. Szukalska E. (2003). Wybrane zagadnienia utleniania tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, 38(2003), 42-58.
207. Tan C.P., Che Man Y.B., Selamat J., Yusoff M.S.A. (2002). Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. *Food Chemistry* 76, 385-389.
208. Tan C.P., Che Man Y.B. (1999). Differential scanning calorimetric analysis for monitoring the oxidation of heated oils. *Food Chemistry* 67, 177-184.
209. Thomaidis N.S., Georgiou C.A. (1999). Edible oil analysis by flow injection. *Laboratory Automation and Information Management* 34, 101-114.
210. Thomaidis N.S., Georgiou C.A. (2000). Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil iodine value. *Analytica Chimica Acta* 405, 239-245.
211. Tian K., Dasgupta P.K. (1999). Determination of oxidative stability of oils and fats. *Analytical Chemistry* 71(9), 1692-1698.
212. Tong P., Kaługa Y., Khoo C.S. (2006). Liquid chromatographic-mass spectrometric method for detection of estrogen in commercial oils and in fruit seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 150-156.
213. Tynek M., Hazuka Z., Pawłowicz R., Dudek M. (2001). Changes in the frying medium during deep-frying of food rich in proteins and carbohydrates. *Journal of Food Lipids* 8, 251-261.
214. Velasco J., Andersen M.L., Skibsted L.H. (2005). Electron spin resonance spin trapping for analysis of lipid oxidation in oils: inhibiting effect of the spin trap α -phenyl-*N*-tert-butyl nitron on lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5), 1328-1336.
215. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6572-6577.
216. Vigli G., Philippidis A., Spyros A., Dais P. (2003). Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(19), 5715-5722.
217. Villen J., Blanch G.P., del Castillo M.L.R., Herraiz M. (1998). Rapid and simultaneous analysis of free sterols, tocopherols and squalene in edible oils by coupled reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(4), 1419-1422.
218. van de Voort F.R., Sedman J., Sherazi S.T.H. (2008). Correcting for underlying absorption interferences in Fourier transform infrared *trans* analysis of edible oils using two-dimensional correlation techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1532-1537.
219. Wanasundara U.N., Shahidi F. (1995). Stability of edible oils as reflected in their propanal and hexanal contents. *Paper presented at the Canadian Section of American Oil Chemists' Society's Annual Meeting*, Guelph, ON, November 15-16 (1995).
220. Wang L., Lee F.S.C., Wang X., He Y. (2006). Feasibility study of quantifying and discriminating soybean oil adulteration in camellia oils by attenuated total reflectance MIR and fiber optic diffuse reflectance NIR. *Food Chemistry*, 95, 529-536.
221. Wardencki W., Michulec M., Curyło J. (2004). A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 703-717.
222. Warner K., Moser J. (2009). Frying stability of purified mid-oleic sunflower oil triacylglycerols with added pure tocopherols and tocopherol mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86, 1199-1207.
223. Warner K. (2005). Effects on the flavor and oxidative stability of stripped soybean and sunflower oils with added pure tocopherols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(26), 9906-9910.

224. Warner K., Frankel E.N., Mounis T.L. (1989). Flavor and oxidative stability of soybean, sunflower and low erucic acid rapeseed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 66(4), 558-564.
225. Webster L., Simpson P., Shanks A.M., Moffat C.F. (2000). The authentication of olive oil on the basis of hydrocarbon concentration and composition. *Analyst* 125, 97-104.
226. Wenzl T., Prettner E., Schweiger K., Wagner F. S. (2002). An improved method to discover adulteration of Styrian pumpkin seed oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 53, 193-202.
227. Wilkes J.G., Conte E.D., Kim Y., Holcomb M., Sutherland J.B., Miller D.W. (2000). Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A* 880, 3-33.
228. Wroniak M., Łukasik D., Maszewska M. (2006). Porównanie stabilności oksydacyjnej wybranych olejów tłoczonych na zimno z olejami rafinowanymi. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 1(46), 214-221.
229. Wroniak M., Łubian M. (2008). Ocena stabilności oksydacyjnej olejów rzepakowego i słonecznikowego tłoczonych na zimno z dodatkiem ekstraktu z oregano w teście Rancimat i termostatowym. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 4(59), 80-89.
230. Yang H., Irudayaraj J., Paradkar M.M. (2005). Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry* 93, 25-32.
231. Yang M-H., Lin H-J., Choong Y-M. (2002). A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. *Food Research International* 35, 627-633.
232. Yi O.-S., Meyer A.S., Frankel E.N. (1997). Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74(10), 1301-1307.
233. Yu X., van de Voort F.R., Sedman J. (2007). Determination of peroxide value of edible oils by FTIR spectroscopy with the use of the spectral reconstitution technique. *Talanta* 74, 241-246.
234. Zamora R., Alba V., Hidalgo F.J. (2001). Use of high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 89-94.
235. Zhang G., Ni Y., Churchill J., Kokot S. (2006a). Authentication of vegetable oils on the basis of their physico-chemical properties with the aid of chemometrics. *Talanta* 70, 293-300.
236. Zhang X., Julien-David D., Miesch M., Raul F., Geoffroy P., Aoude-Werner D., Ennahar S., Marchioni E. (2006b). Quantitative analysis of β -sitosterol oxides induced in vegetable oils by natural sunlight, artificially generated light and irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(15), 5410-5415.
237. Zhang Y., Yang L., Zu Y., Chen X., Wang F., Liu F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry* 118, 656-662.
238. Zhou S.N., Zhang X., Ouyang G., Es-haghi A., Pawliszyn J. (2007). On-fiber standardization technique for solid-coated solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* 79(3), 1221-1230.
239. Zunin P., Boggia R., Lanteri S., Leardi R., De Andreis R., Evangelisti F. (2004). Direct thermal extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of volatile compounds of extra-virgin olive oils. *Journal of Chromatography A*, 1023, 271-276.

ZAŁĄCZNIK – PROJEKT NORMY



Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)

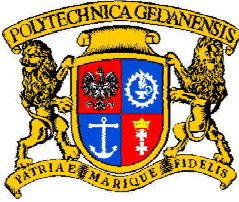
Indeks:

21.06.2010

Page 1/10

CONTENTS:

1	FIELD OF APPLICATION	2
2	DEFINITION	2
2.1	INDUCTION PERIOD (IP):.....	2
2.2	OXIDATIVE STABILITY (OS):.....	2
2.3	OXIDATION MARKERS (OM):	2
3	PRINCIPLE	2
4	APPARATUS/ INSTRUMENT DESCRIPTION	3
4.1	ULTRAVIOLET LAMP	3
4.2	SPME ASSEMBLY	3
4.2.1	<i>SPME fiber holder for manual use</i>	4
4.2.2	<i>SPME fused-silica fiber</i>	4
4.2.3	<i>SPME sampling stand holder & rod assembly</i>	5
4.2.4	<i>Aluminum heater block</i>	5
4.3	MAGNETIC STIRRER.....	5
4.4	GAS CHROMATOGRAPH	5
4.4.1	<i>Chromatographic capillary column</i>	5
4.5	AUTOMATED PIPETTE	5
5	LABORATORY GLASS, ACCESSORIES AND MATERIALS	6
5.1	QUARTZ CELL	6
5.2	VIALS 6	
5.3	SEPTA 6	
5.4	MEDICAL SYRINGE	6
5.5	MAGNETIC STIRRING BARS	6
6	INGREDIENTS	6
6.1	THE STANDARD SOLUTION OF PROPANAL, HEXANAL AND NONANAL	6
7	SAMPLE PRAPARATION	6
8	PROCEDURE	7
8.1	SAMPLE OXIDATION CONDITIONS	7
8.2	VOLATILE COMPOUNDS EXTRACTION/ISOLATION CONDITIONS	7
8.3	VOLATILE COMPOUNDS SEPARATION/DETECTION CONDITIONS.....	7
8.4	OXIDATION MARKERS IDENTIFICATION	7
9	DATA HANDLING	8
10	METHOD ACCURACY	9
10.1	METHOD REPEATABILITY	9
11	RESULTS REPORTING	9
12	BIBLIOGRAHY	10

Gdańsk University of Technology		
	Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)	Indeks:
		21.06.2010
		Page 2/10

1 FIELD OF APPLICATION

In the presented draft of Standard the method of determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion has been described. This standard should be applied only to not- refined, crude edible oils, especially rapeseed oil.

2 DEFINITION

For Standard necessity the below specified definitions should be applied.

2.1 Induction period (IP):

The period between the moment of low or zero concentration of oxidation markers in the sample and the moment when the concentration of oxidation markers rise violently.

2.2 Oxidative stability (OS):

The induction period, determined according to the procedure presented in this Standard. Oxidative stability should be expressed in hours.

2.3 Oxidation markers (OM):

Volatile aldehydes which are products of edible oil (mainly fatty acids) oxidation process. In this Standard there are propanal, hexanal and nonanal.

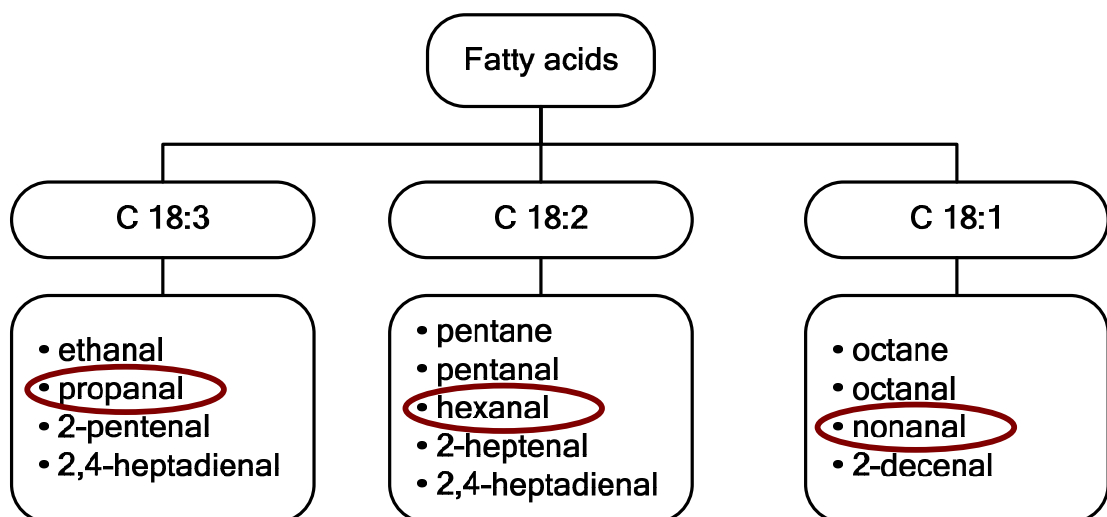



Figure 1. Origin of flavor and off-flavor compounds in oxidized edible oil sample.

3 PRINCIPLE

Oil sample is subjected to the process of accelerated oxidation under the influence of ultraviolet irradiation. Volatile compounds, which are formed during oxidation process, are

Gdańsk University of Technology		
	Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)	Indeks:
		21.06.2010
		Page 3/10

isolated from the headspace of the oil matrix by the use of solid phase microextraction (SPME) technique and then introduced into the gas chromatograph injector. During the chromatographic separation the increase of oxidation markers in the time of sample oxidation is determined. On the basis of this dependence induction period of investigated sample is set graphically.

4 APPARATUS/ INSTRUMENT DESCRIPTION

Usually applied laboratory equipment and apparatus.

4.1 Ultraviolet lamp

In order to accelerate oxidation of edible oils two low-pressure mercury ultraviolet lamps were used. The wavelength of irradiation was 254 nm (90% of the total emitting energy). The light intensity is 40 000 W/m²

4.2 SPME assembly

The SPME assembly (Fig.2) used in the method described in Standard is available on market from Sigma Aldrich Company which is the commercial representative of Supelco, the only producer of the SPME device and accessories.



Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)

Indeks:

21.06.2010

Page 4/10

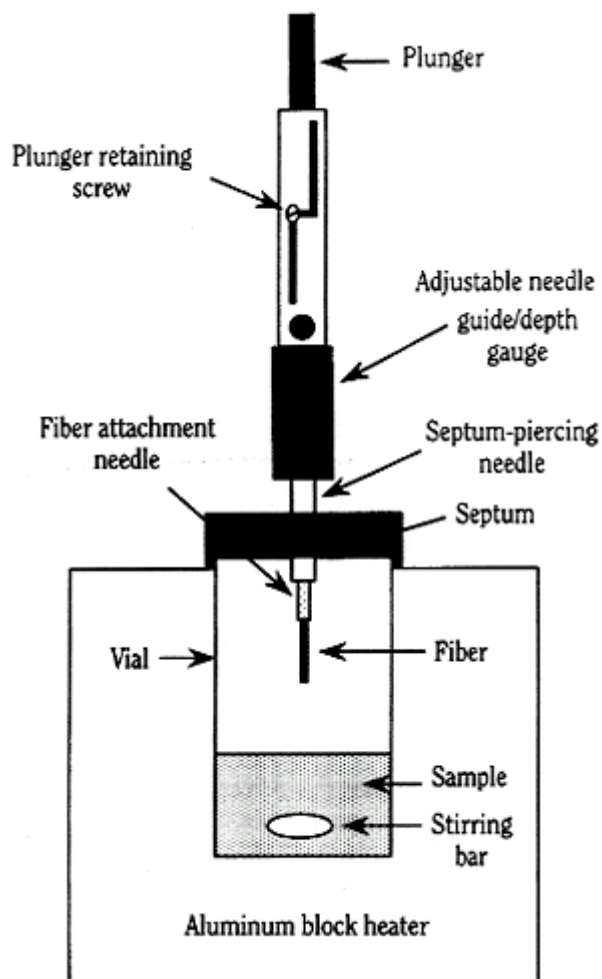


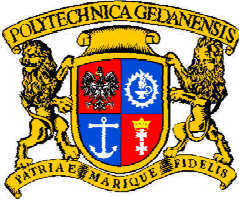
Figure 2. The diagram of the SPME assembly used in flavor reversion determination.

4.2.1 SPME fiber holder for manual use

The Supelco SPME fiber holder can be used manually with and GC having an appropriate, straight inlet liner. This holder is designed to be used with a reusable, replaceable Supelco SPME fiber. The holder consists of a stainless steel barrel, a black polymeric plunger, an adjustable depth gauge with needle guide and a stainless steel retaining nut.

4.2.2 SPME fused-silica fiber

The fiber attachment needle has a coated, fused silica extraction fiber secured at one end and a color-coded, threaded hub at the other. The hub color indicates the type of bonded phase coating on the fiber. In the determination of flavor reversion a 2 cm-50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS StableFlexTM fiber was used. Each new fiber before the first use should be conditioned according to the SPME Fiber Assembly data sheet.

Gdańsk University of Technology		
	Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)	Indeks:
		21.06.2010
		Page 5/10

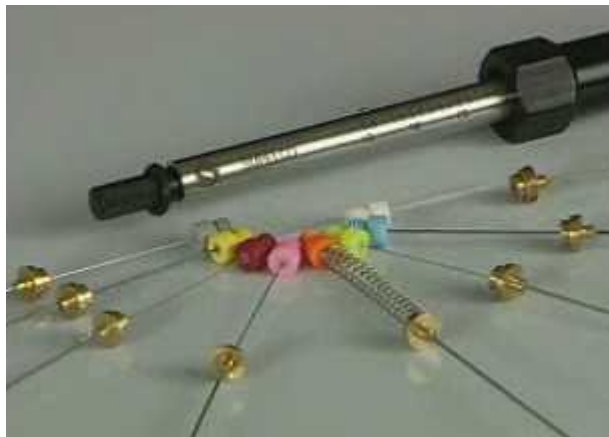


Figure 3. SPME fibers with the different type of bonded phase coating on the fiber

4.2.3 SPME sampling stand holder & rod assembly

4.2.4 Aluminum heater block

The heater block with cover made by aluminum should have 800 mm height, and a possibility of temperature regulation up to $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. It also should have the hole for a sample vial with 21 mm inner diameter and 70 mm height.

4.3 Magnetic stirrer

The magnetic stirrer should have a regulated stir speed in a range of 60-1150 rpm

4.4 Gas chromatograph

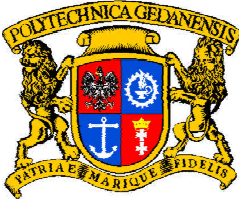
The analysis described in the Standard can be carry out in any GC instrument working with capillary column and flame ionization detector. The injection port of the GC apparatus should have a possibility of working in splitless mode and should contain an appropriate liner, especially liner designed for SPME use with a narrow I.D. between 0.75 mm and 1.0 mm.

4.4.1 Chromatographic capillary column

For the volatile compounds isolation and detection the capillary column with intermediate polarity was used. The best results were obtained on the SPB-20 capillary column (20% diphenyl/80% dimethylsiloxane phase), 30 m length, 0,25 mm i.d. and 1,0 μm of film thickness.

4.5 Automated pipette

Digital, adjustable, single channel pipette, 0.5-10 μL volume, accuracy: 1.0 %, precision: 0.8%

Gdańsk University of Technology		
	Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)	Indeks:
		21.06.2010
		Page 6/10

5 LABORATORY GLASS, ACCESSORIES AND MATERIALS

In the determination of flavor reversion the following accessories and materials have to be used.

5.1 Quartz cell

Reaction cells with covers in which samples of oil are oxidized should be made from materials which do not react with oil or its oxidation products and have a good UV light transmittance. The best material is the quartz glass. The cells have 5 mm height and inner dimensions 40 x 50 mm, the volume 10 mL.

5.2 Vials

Vials used in the SPME isolation step are 15 mL clear glass vials with screw open-top black phenolic cap with outer dimensions 21 x 70 mm.

5.3 Septa

PTFE/Silicone septa for 15 mL vial with open-top cap

5.4 Medical syringe

Single use medical syringe with 10 mL volume

5.5 Magnetic stirring bars

Magnetic stirring bars with dimensions 3 x 10 mm

6 INGREDIENTS

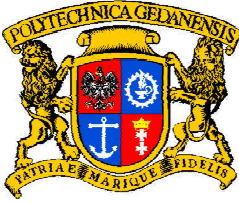
In order to identify oxidation markers standards compounds have to be prepared. All compounds should be a GC grade.

6.1 The standard solution of propanal, hexanal and nonanal

The solution of standards should be prepared in refined edible oil (rapeseed oil) free of volatile compounds. 2 μ L of each standard (propanal, heksanal and nonanal) should be added to 10 mL of oil in order to prepare a sample spike with standards.

7 SAMPLE PREPARATION

It is important, that laboratory should get a representative sample, which was not damaged or changed during transport and store.

Gdańsk University of Technology		
	Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)	Indeks:
		21.06.2010
		Page 7/10

Sample draw is not a part of the method described in this Standard. Recommended method of sample draw is presented in Standard ISO 5555 [1].

Sample should be stored in darkness at temperature of 4 °C.

In order to determine flavor reversion, sample should be taken by the syringe in required volume from the middle of precisely homogenate material.

8 PROCEDURE

8.1 Sample oxidation conditions

The oil sample in a volume of 10 mL each should be put to 10 quartz cells (5.1) and carefully closed by the cell cover, avoiding of the presence of air bubble with oil sample. Than samples should be put under UV irradiation (4.1) for a particular time (usually 4-5 h). Every 30 minutes one quartz cell with oil sample is removed from the UV irradiation lamp and than 8 mL of this sample is transfer to 15 mL vial (5.2), carefully closed by screw top-open cap and silicon septa (5.3) [2].

8.2 Volatile compounds extraction/isolation conditions

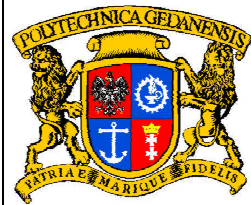
Oxidized sample prepared in the described procedure was than placed in heater block (4.2.4) at 30 °C for 10 minutes, following by 15 minutes of extraction/isolation of volatile fraction to the SPME fiber (4.2.2), which is carried at the same temperature [3].

8.3 Volatile compounds separation/detection conditions

After extraction/isolation step, the SPME fiber is introduced into the injection port of the GC apparatus and thermally desorbed for 4 minutes at 250 °C in splitless mode. Gas chromatographic separation is carried in the following conditions of oven temperature: initial temperature was 50 °C held for 1min, then ramped at 6 °C/min to 100 , again ramped at 15 °C /min to 250 °C and held for 2 min; the detector was kept at 250 °C. The carrier gas was helium with a flow rate of 1 mL/min and the gases for FID detector was air and hydrogen with a flow rate of 400 and 45 mL/min respectively [3].

8.4 Oxidation markers identification

The oxidation markers (propanal, hexanal and nonanal) are identified by the comparing of their retention time with retention time of standards.



**Determination of susceptibility
of crude rapeseed oil
on flavor reversion
(Ultraviolet Light Test)**

Indeks:

21.06.2010

Page 8/10

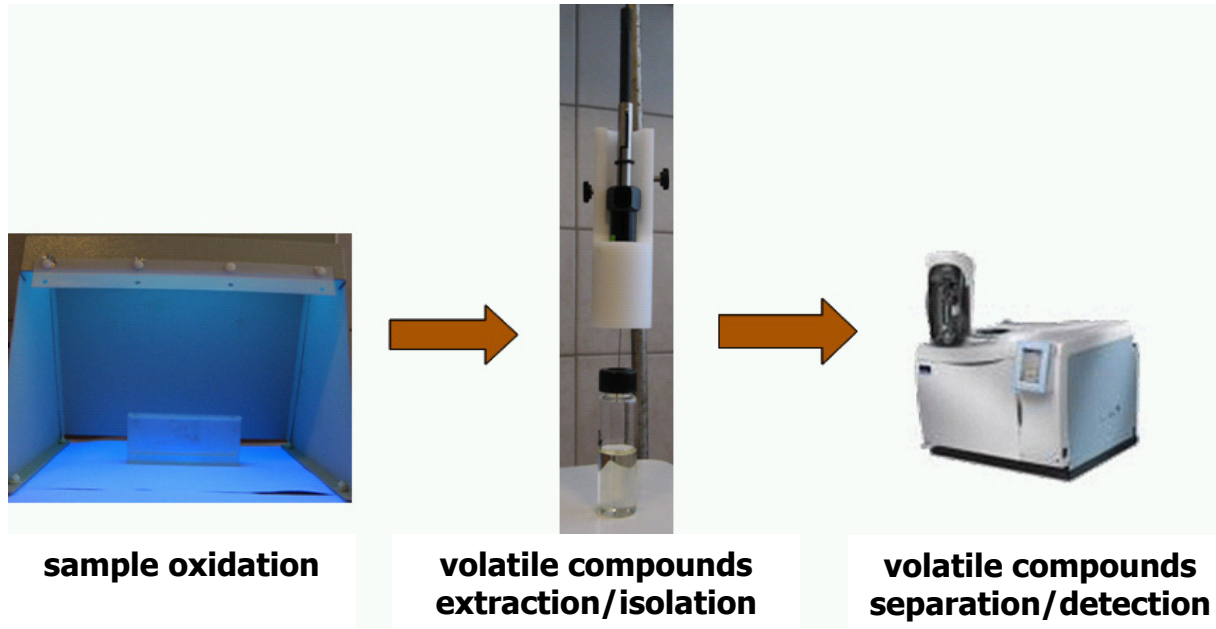
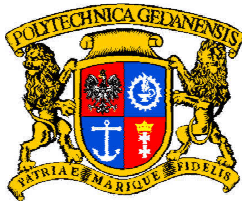


Figure.4 The diagram of the steps of described method used in determination of flavor reversion

9 DATA HANDLING

Then the peak area for selected markers is read out from chromatogram, and expressed as a function of oxidation time on the graph. The induction period was determined graphically according to the manner described below. On the obtained graph a curve should be drawn which is parallel to the base line and which get throughout the point after 1 h of measurement. Then an another curve was drawn as the tangent to an oxidation curve in its rising area. The time determined by the point where these two curves are crossing is the induction period (Fig.5.) [4]. The oxidative stability should be expressed in hours with accuracy of 0.1 h.



Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)

Indeks:

21.06.2010

Page 9/10

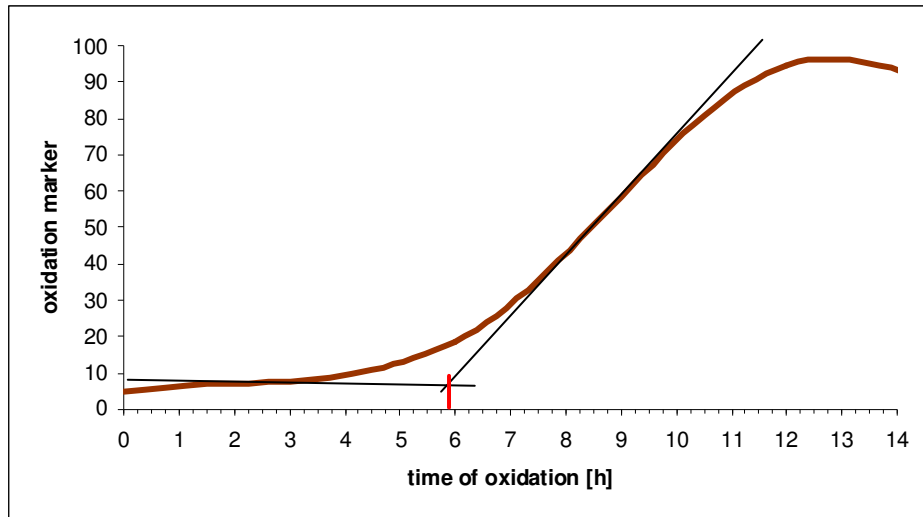


Figure 5. The example of the graphical determination of the induction period of oxidized oil on the basis of oil oxidation curve.

10 METHOD ACCURACY

The method accuracy was determined by analyzing different rapeseed oils. The established probability for calculation the RSD, LOD and LOQ values was 95 %.

10.1 Method repeatability

The method repeatability was expressed as the relative standard deviation (RSD) in percentage calculated for 10 separate measurements.

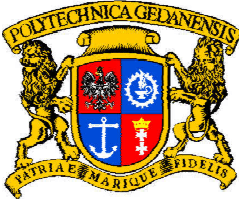
The absolute difference between two separate results for the same sample received from the same method, in the same laboratory, by the same analytical chemist with the use of the same equipment in the short time period should not be bigger than:

- 10 % for the results obtained for the sample oxidized for 30 min;
- 16 % for the results obtained for the sample oxidized for 120 min.

11 RESULTS REPORTING

The following data should be specified in thereport:

- the method according which the sample was drawn
- applied research method
- oxidative stability, expressed with accuracy of 0.1 h
- obtained results

Gdańsk University of Technology		
	Determination of susceptibility of crude rapeseed oil on flavor reversion (Ultraviolet Light Test)	Indeks:
		21.06.2010
		Page 10/10

The report should also contain all detailed information which are not specified in this Standard or which might have an influence for the results.

The report should also contain all information which are necessary to complete identification of the sample.

12 BIBLIOGRAHY

- [1] ISO 5555:1991, Animal and vegetable fats and oils – Sampling.
- [2] Gromadzka J., Wardencki W., „Analysis of volatile oxidation products in rapeseed oil.”, in Advances in analysis and technology of rapeseed oil. Monograph, ed. E. Szlyk, Toruń 2008, pp. 63-70.
- [3] Gromadzka J., Wardencki W., „Selection of the UV irradiation conditions for accelerated edible oil oxidation procedure”, in Advances in research and technology of rapeseed oil. Monograph – part II, ed. E.Szlyk, Toruń 2009, pp. 11-19.
- [4] Gromadzka J., Wardencki W., „Comparison of oxidative stability of edible oils”, Nauka, Przyroda, Technologie 3(4), 2009, pp.1-10.