



Sveučilište u Zagrebu



# ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA U HRANI

Katarina Sopko Stracenski

*Kemijski seminar I*

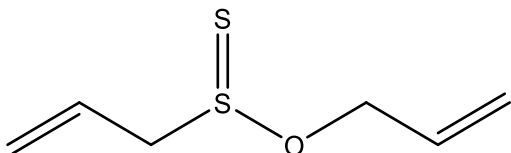
*Sveučilišni poslijediplomski studij Kemije, akad. god. 2022./2023.*

Prema radu: M. Starowicz, *Separations* **8** (2021) 158.

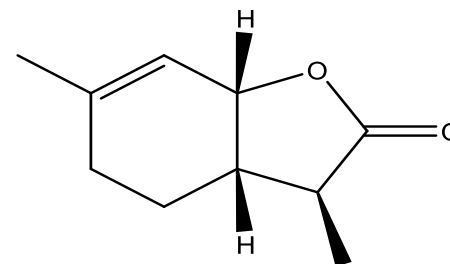
- **odoransi** - kemijski spojevi koji potiču osjet mirisa
- lakohlapljivi organski spojevi (engl. *volatile organic compounds*, VOCs),  $M_r < 300$ ; mirisna svojstva uzrokovana strukturom i fizikalnim osobinama (način vezanja na proteinske mirisne receptore u nosu)
- mirisan spoj: prisutan od koncentraciji većoj od njegova praga mirisa
- mirisni spojevi u hrani: često nizak prag mirisa ( $\text{ng L}^{-1}$  ili  $\text{ng kg}^{-1}$ ), kompleksna matrica → zahtjevna ekstrakcija, identifikacija i kvantifikacija
- nepoželjni mirisi (engl. *off odours*) - rezultat nepravilnog proizvodnog procesa, prirodne degradacije produkata ili nepravilnog skladištenja

- 12 000 identificiranih hlapljivih spojeva u hrani, 5% ima značajnu ulogu u formiranju arome → „općeniti” (Tablica 2.) i „individualni” odoransi

a)

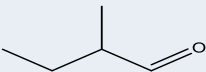
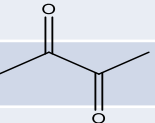
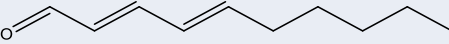
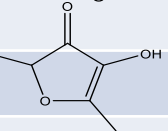
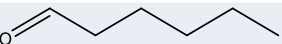
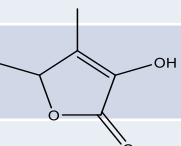
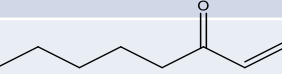
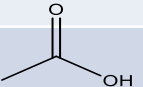
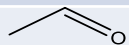
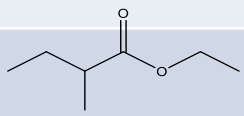
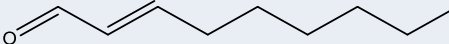
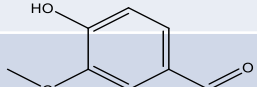
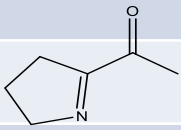
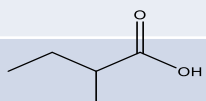
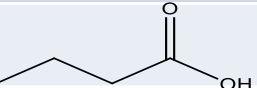


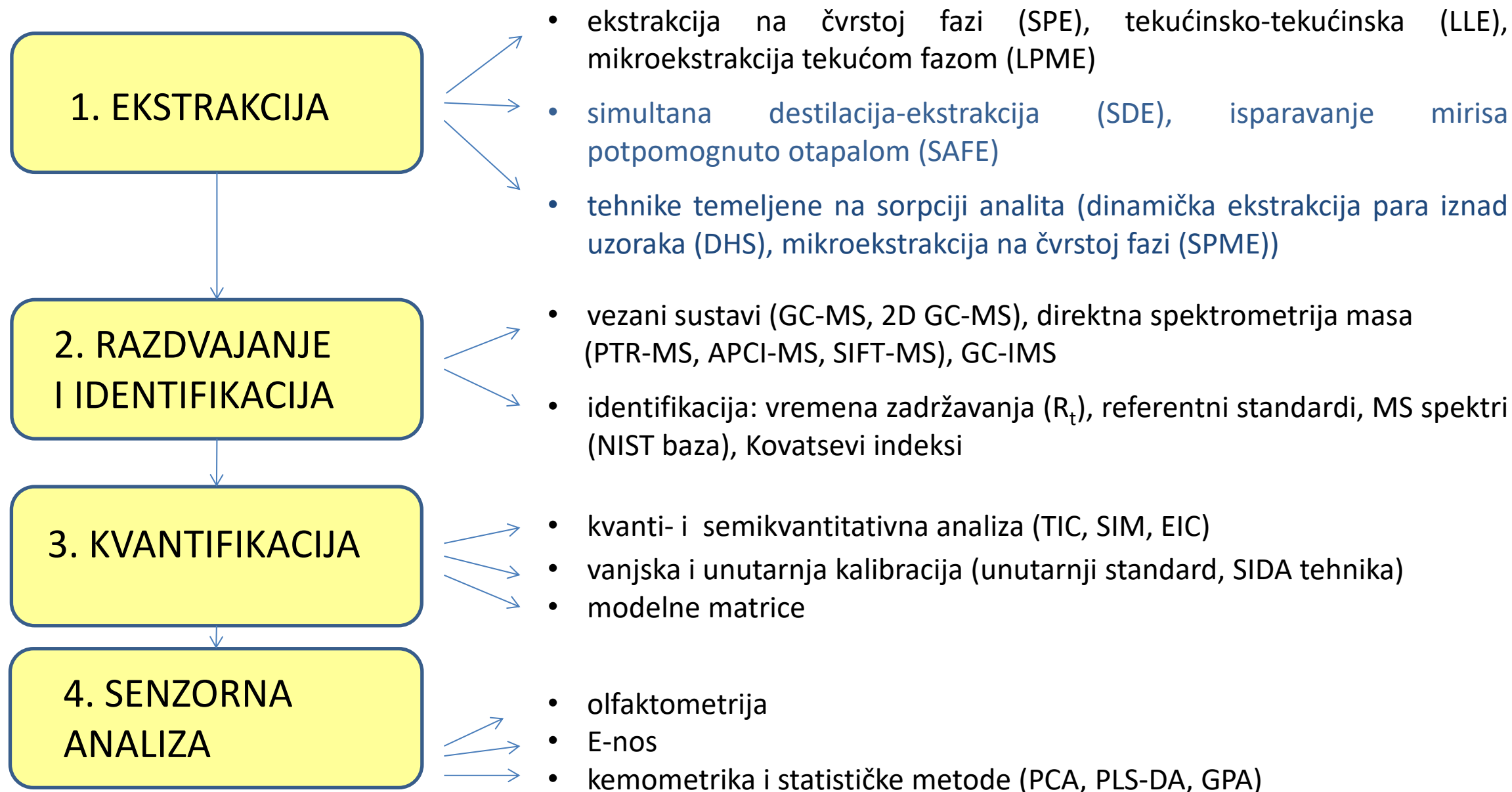
b)



Slika 1. Strukture alicina, odoransa karakterističnog za češnjak (a) i „vinskog laktone” (b)

- „mirisni kod/uzorak”: 3 - 40 spojeva (npr. konjak - 36 ključnih molekula, maslac – 3)
- doprinos pojedinog spoja aromi: koncentracija, prag mirisa, interakcije s matricom i drugim hlapljivim komponentama

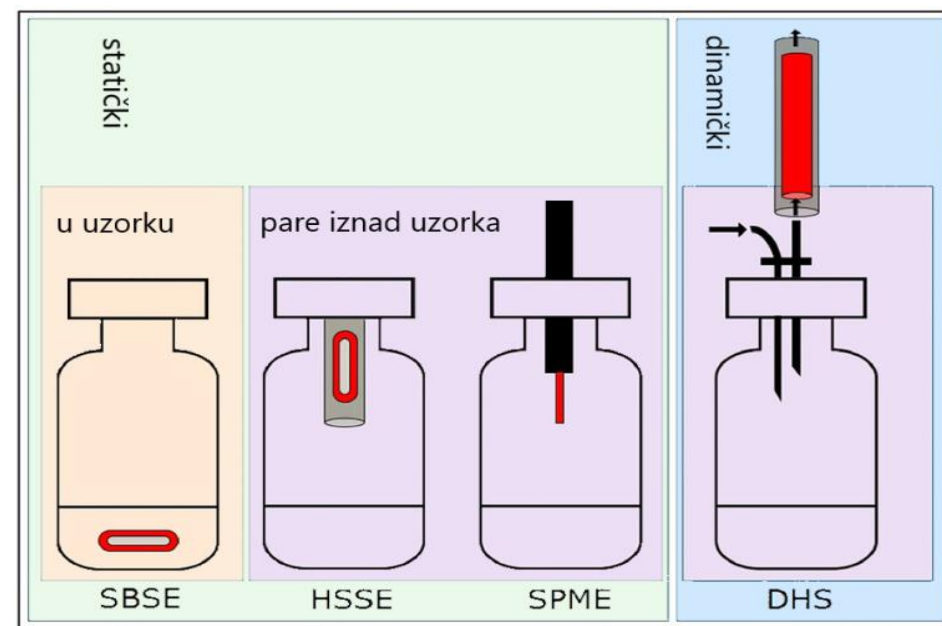
|    | Spoj                                              | Opis mirisa                          | Primjer                                                              | Struktura                                                                             |
|----|---------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | metional                                          | poput rajčice                        | rajčica, tropsko voće, meso, sir                                     |    |
| 2  | 2- i 3-metilbutanal                               | poput slada                          | eterična ulja naranče, limuna; prerađena hrana (pivo, sir, čokolada) |    |
| 3  | butan-2,3-dion                                    | poput maslaca                        | maslac, alkoholna pića, prirodna ulja                                |    |
| 4  | (2E,4E)-deka-2,4-dienal                           | masno, prženo                        | maslac, riba, čips, pečeni kikiriki, heljda                          |    |
| 5  | furaneol                                          | slatko, karamela, jagoda             | jagoda, ananas, rajčica                                              |    |
| 6  | heksanal                                          | poput trave, zeleno                  | različito voće i povrće                                              |    |
| 7  | sotolon                                           | curry, javorov sirup, karamela       | piskavica, ljekoviti ljupčac                                         |    |
| 8  | 1-okten-3-on                                      | plijesan                             | gljive, matičnjak, <i>off odour</i> u vinu                           |    |
| 9  | etanska kiselina                                  | ocat                                 | ocat                                                                 |    |
| 10 | etanal                                            | svjež, voćni                         | kava, kruh, zrelo voće                                               |    |
| 11 | etil 2- metil-butanoat,<br>etil 3- metil-butanoat | voćni                                | različito voće                                                       |    |
| 12 | (E)-2-nonenal                                     | karton, neugodan mastan miris, trava | masti i ulja, šparoge, kupina                                        |  |
| 13 | vanillin                                          | vanilija                             | sladoled, čokolada, karamela, kava                                   |  |
| 14 | 2-acetil-1-pirolin                                | pečeno, kokice                       | karakterističan miris kore bijelog kruha                             |  |
| 15 | 2- i 3-metilbutanska kiselina                     | sirast, miris znoja                  | voće (jabuka, marelice)                                              |  |
| 16 | butanska kiselina                                 | znojno                               | maslac, sirovo mlijeko, životinjske masti i biljna ulja              |  |



- ekološki prihvatljivije, bez upotrebe organskog otapala, manja količina uzorka
- analiza u otopini (*in liquid* tehnika) ili pare iznad uzorka (*headspace* tehnika)
- *statičke* i *dinamičke*

Tablica 3. Sorbensi korišteni u tehnikama ekstrakcije temeljenih na sorpciji analita koje se najčešće primjenjuju u analizi hrane

| Tehnika                                                                             |      | Sorbens                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------|
| Dinamička analiza para iznad uzorka                                                 | DHS  | Tenax TA                                                                   |
| Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi sa sorbentsom nanesenim na vlakno                  | SPME | divinilbenzen/karboksen/<br>polidimetilsiloksan<br>(50/30 µm DVB/CAR/PDMS) |
| Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi sa sorbentsom nanesenim na magnet                  | SBSE | polidimetilsiloksan (PDMS)                                                 |
| <i>headspace</i> Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi sa sorbentsom nanesenim na magnet | HSSE | polidimetilsiloksan (PDMS)                                                 |

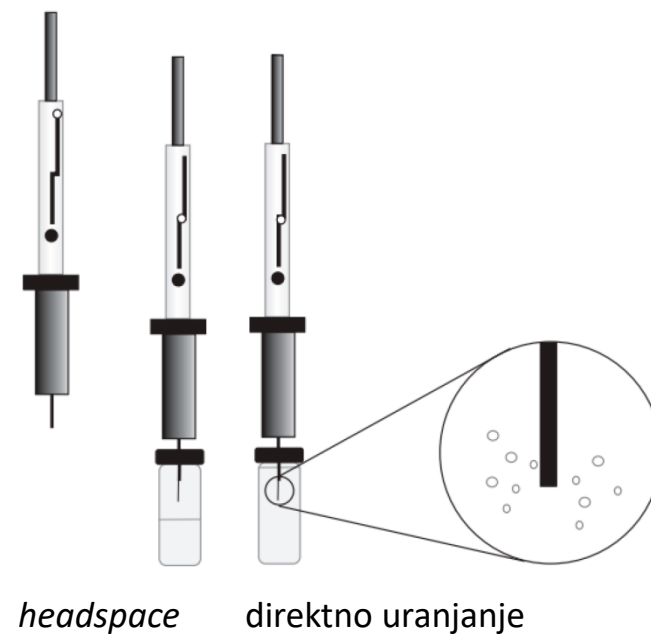


Slika 2. Shematski prikaz tehnika ekstrakcije temeljenih na sorpciji analita

(S. Louw, *Anal Sci Adv.* **2** (2021) 157–170.)

- J. Pawliszyn 1990.; sorpcija analita na sorbens nanesen na  $\text{SiO}_2$  vlakno → desorpcija u injektoru GC
- **prednosti:** jednostavna priprema uzorka, „zelena” tehnika, kraća analiza, automatizirana, širok raspon analita, objedinjuje uzorkovanje, ekstrakciju i transport analita do instrumenta
- **nedostaci:** profil hlapljivih spojeva ovisi o uvjetima ekstrakcije, afinitetu analita prema sorbensu i selektivnosti samog vlakna; nizak kapacitet sorpcije, degradacija vlakna, kratak period upotrebe (50-100x) → unutarnji standard

## ADSORPCIJA



## DESORPCIJA u GC injektoru

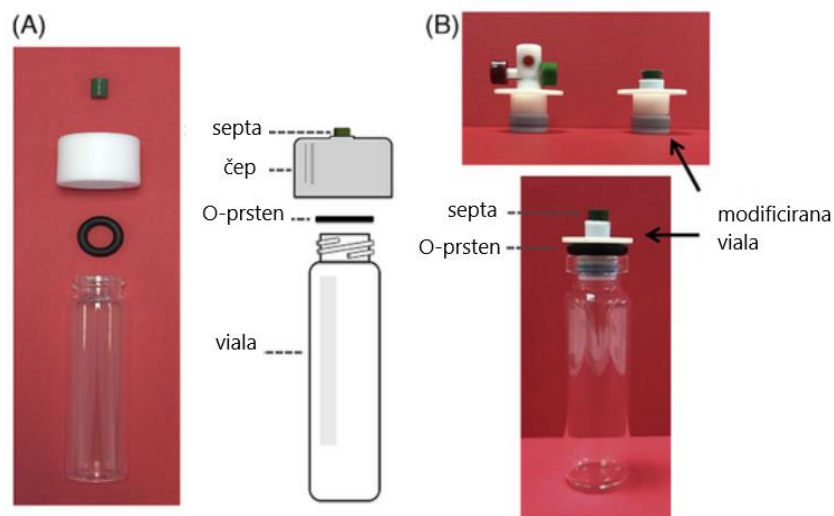


Slika 3. Shema SPME tehnike.

(M. Starowicz, *Separations* **8** (2021) 158.)

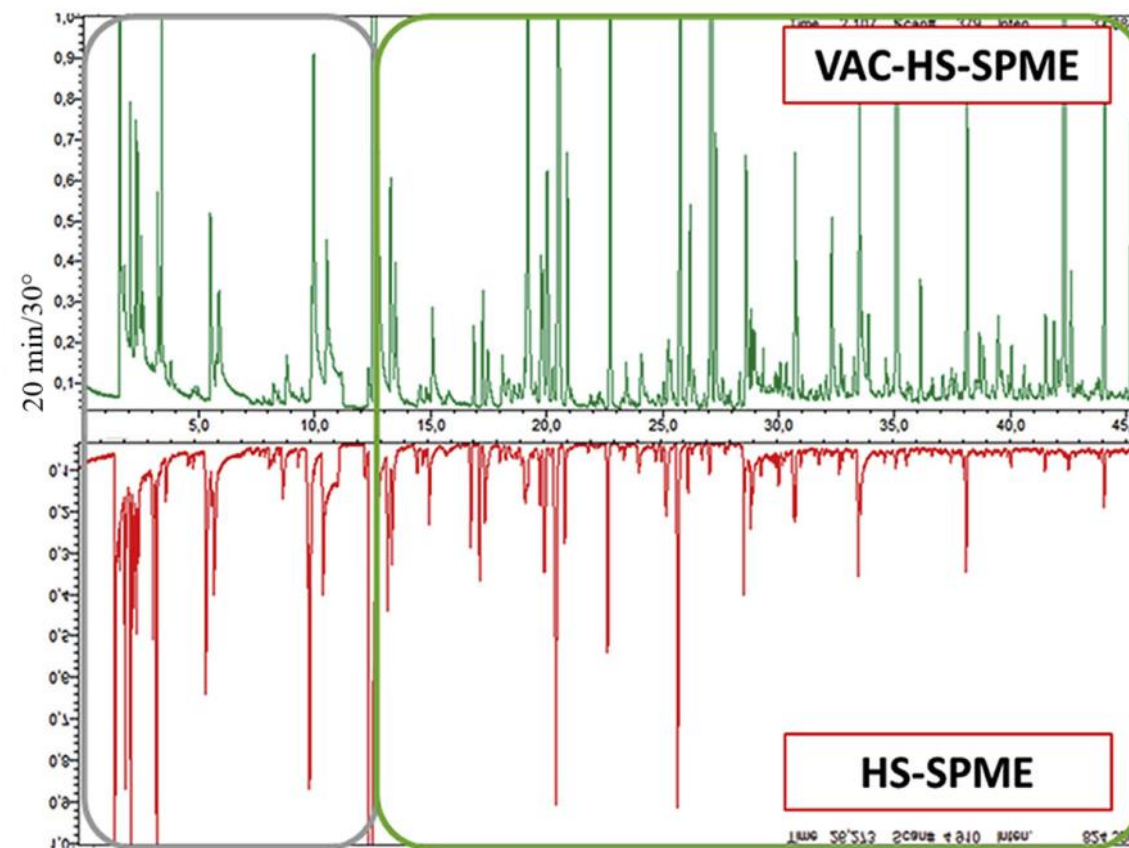
Napredna SPME rješenja:

- SPME Arrow (2015.) - deblji sloj sorbensa → veća osjetljivost
- HS-SPME potpomognut vakuumom (Vac-HS-SPME) → učinkovitija ekstrakcija djelomično hlapljivih spojeva



Slika 4. Primjeri izvedbi HS-SPME tehnike potpomognute vakuumom

(C. Diez-Simon i sur., *J. Chromatogr. A* **1624** (2020) 46119.)



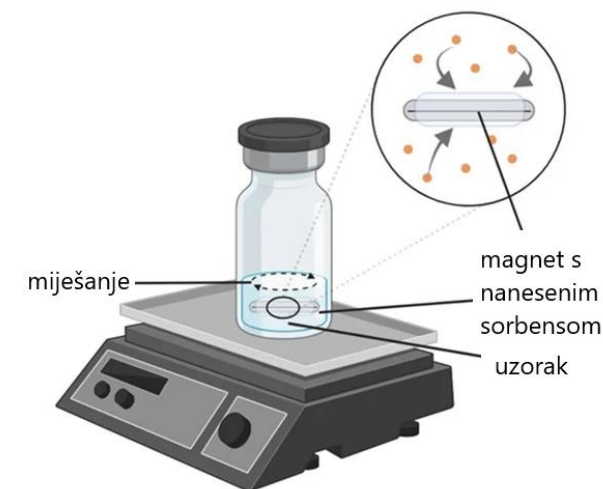
Slika 5. Spektri masa hlapljivih spojeva ekstrahiranih iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja tehnikama Vac-HS-SPME i HS-SPME

(S. Mascres i sur., *Anal. Chim. Acta* **1103** (2020), 106-114.)

- Baltussen i sur. 1999. g. → veća količina sorbensa, povećanje učinkovitost ekstrakcije na čvrstoj fazi, vrlo niska granica detekcije ( $\text{ng L}^{-1}$ )
- sorbens nanesen na magnetski mješač u uzorku (SBSE) ili iznad njega (*headspace* SBSE ili HSSE); analiza hlapljivih i djelomično hlapljivih spojeva nepolarnog do srednje polarnog karaktera na razini ultratragova

Tablica 4. Usporedba SPME i SBSE tehnike

|                             | SPME                                                               | SBSE                                                                                                             |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vrsta matrice               | tekućina, plin, krutina                                            | tekućina                                                                                                         |
| Debljina sorbensa           | 150 $\mu\text{m}$ (DVB/CAR/PDMS)                                   | 0,1 -5 mm (PDMS)                                                                                                 |
| Volumen uzorka /mL          | 0,5 - 20                                                           | 1 - 100                                                                                                          |
| Vrijeme analize /min        | 5 - 120                                                            | 10 - 240                                                                                                         |
| Iskorištenje i osjetljivost | nisko                                                              | dobro                                                                                                            |
| Prednosti                   | jednostavnost, „zelena“ tehnika, automatiziranost                  | veći kapacitet sorpcije, volumen uzorka i miješanje utječu na učinkovitost ekstrakcije , niska granica detekcije |
| Nedostatci                  | nepotpuna ekstrakcija, niži kapacitet sorpcije, degradacija vlakna | dulja ekstrakcija, dodatna desorpcijska jedinica, ponekad dodatna ekstrakcija, manji izbor dostupnih sorbensa    |



Slika 6. Shema SBSE tehnike

L. M. Rosendo i sur., *Processes* **11** (2023), 243

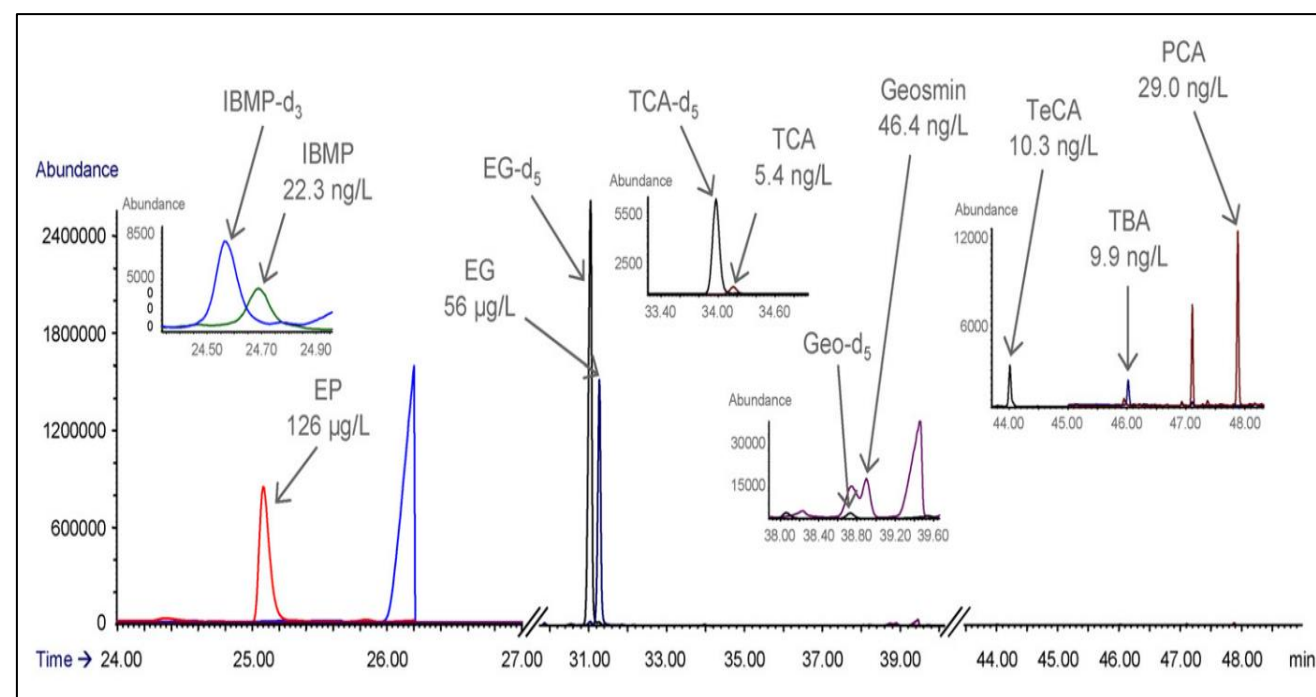
# Profiliranje nepoželjnih aroma u vinu tehnikama SBSE i GC-MS

10

(Franc i sur., *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3318-3327.)

- optimizacija metode (veličina magneta, V uzorka, vrijeme i brzina ekstrakcije, pH i razrjeđenje uzorka)
- SBSE: 10 ml vina, pH 10 + 20  $\mu\text{L}$  standarda (deuterirani analit)  $\rightarrow$  10 mm magnet, 1mm PDMS, 1h/900 rpm/RT
- GC-MS: 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25 mm HP-5MS, SIM način snimanja

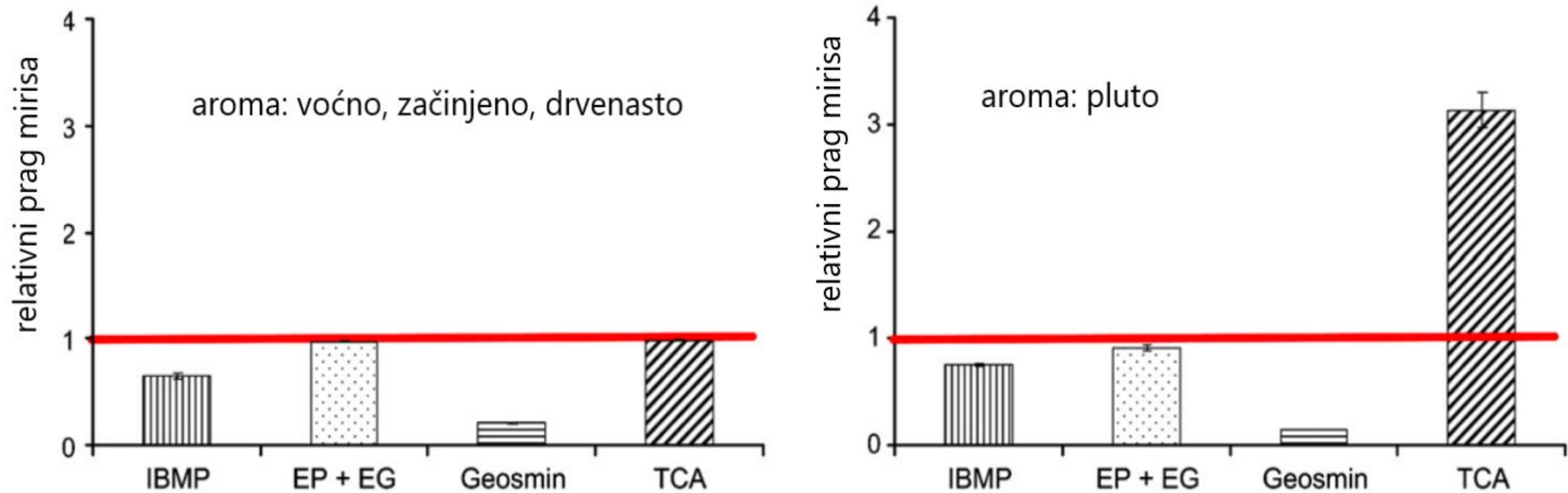
| Nepoželjan miris                   | Prag mirisa              |
|------------------------------------|--------------------------|
| 2-isobutil-3-metoksipirazin (IBMP) | 15 ng L <sup>-1</sup>    |
| 4-etilfenol (EP)                   | 430 $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| 4-etilgvajakol (EG)                | 33 $\mu\text{g L}^{-1}$  |
| geosmin (Geo)                      | 50 ng L <sup>-1</sup>    |
| 2,4,6-trikloroanizol (TCA)         | 3 ng L <sup>-1</sup>     |
| 2,3,4,6-tetrakloroanizol (TeCA)    | 35 ng L <sup>-1</sup>    |
| 2,4,6-tribromoanizol (TBA)         | 3 ng L <sup>-1</sup>     |
| 2,3,4,5,6-pentakloroanizol (PCA)   | 100 ng L <sup>-1</sup>   |



Slika 7. Kromatogram uzorka vina Bordeaux 2005 s dodanim ciljnim spojevima

Tablica 5. Nepoželjni mirisi u vinu

- dobra korelacija analitičkih i organoleptičkih rezultata: devijacije u aromi povezane s određenim nepoželjnim mirisima u koncentracijama iznad praga mirisa



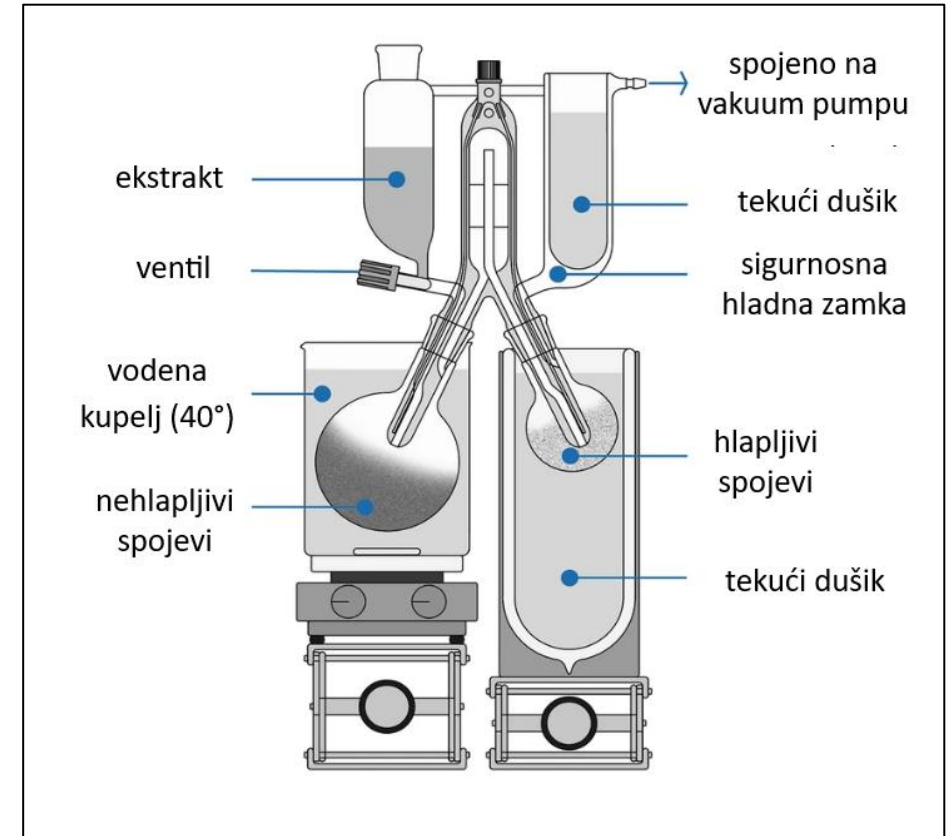
Slika 8. Usporedba koncentracija nepoželjnih aroma u dvije različite boce vina Bordeaux 1999 i pripadajući opis arome

- Likens-Nickerson aparatura (1964.): uobičajena metoda odvajanja hlapljivih spojeva iz vodenih matrica prije analize plinskim kromatografom; temeljena na kombinaciji hidrodestilacije i kontinuirane ekstrakcije organskim otapalom
- ekstrahira gotovo sve arome; nije prikladna za spojeve niske hlapljivosti ni visoko hlapljive; nedostatci: stvaranje nepoželjnih produkata



Slika 9. Likens-Nickerson aparatura

- Engel i sur. 1999. - destilacija hlapljivih komponenti pri nižim temperaturama ( $40^{\circ}$ -  $50^{\circ}$  ) i visokom vakuumu ( $10^{-2}$  –  $10^{-3}$  Pa)  
→ razdvajanje hlapljivih i nehlapljivih komponenti bez stvaranja nepoželjnih produkata
- dugotrajnija analiza, potrebna veća količina uzorka
- potvrda specifičnih molekula odgovornih za aromu
- SPME i SAFE - komplementarne tehnike, paralelna primjena kako bi se detektirao kompletan raspon hlapljivih spojeva u uzorku hrane

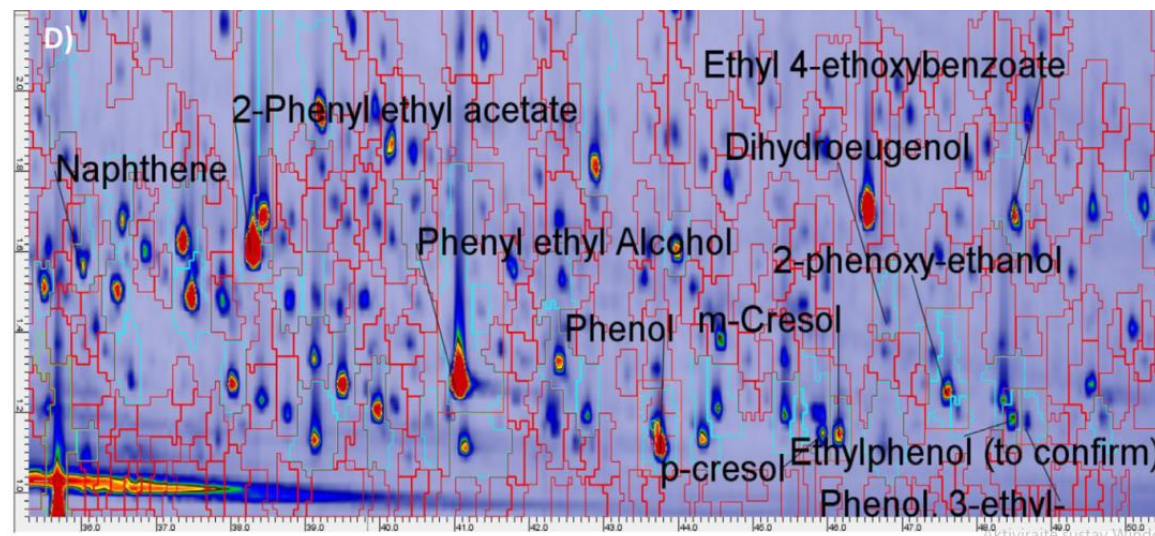
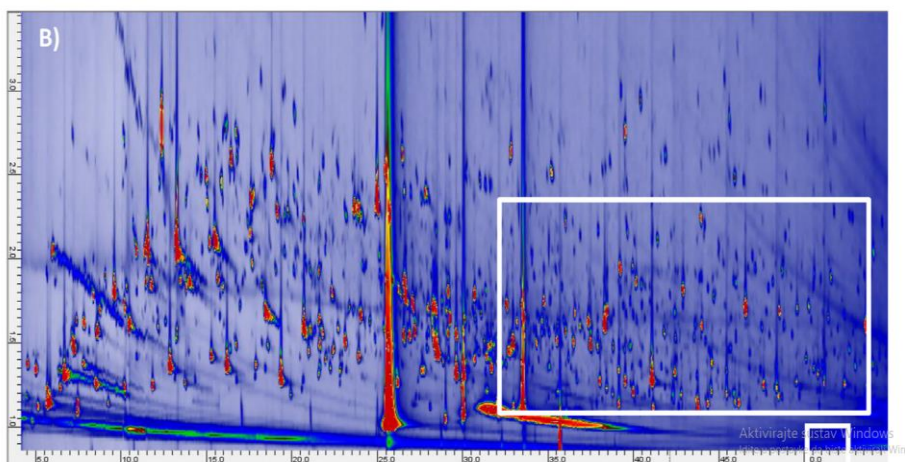
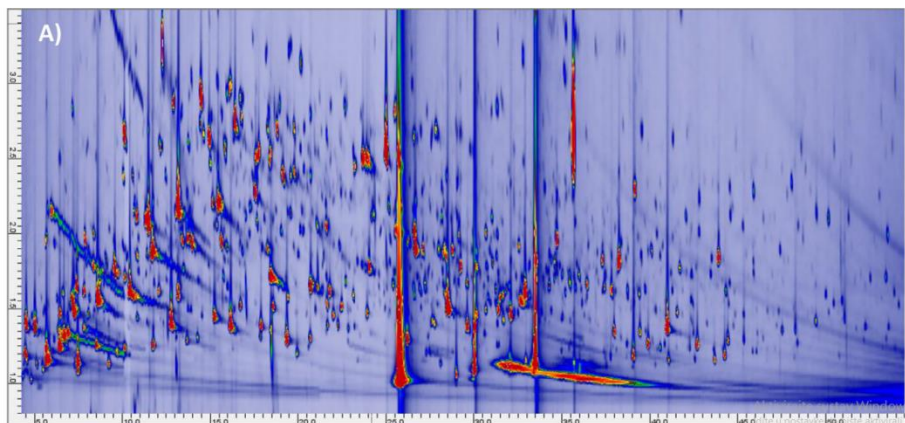


Slika 10. Shema SAFE tehnike

## Kemijska karakterizacija nepoželjnih mirisa u kakau

Perotti i sur., *Food. Chem.* **309** (2020) 125561.

- SPME: 1g praha, vlakno DVB/ CAR/PDMS 50/30, 40 min/80°/350 rpm
- 1. kolona: 100% PEG, 2. kolona: 86% PDMS, 7% fenil, 7% cianopropil
- kakao nepoželjnog okusa („smoky”): 56 hlapljivih spojeva u 7-125x većoj koncentraciji nego u uzorcima bez nepoželjnog okusa, 10-ak doprinosi dimljenom okusu (naftalen, fenoli, esteri i alkoholi)



Slika 11. GC×GC-ToF MS profil hlapljivih spojeva iz uzoraka kakaa bez nepoželjnih mirisa (A) i s nepoželjnim mirisima (B) te uvećano područje identificiranih aromatskih i fenolnih spojeva (C)

Spektrometrija masa uz kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (APCI-MS)

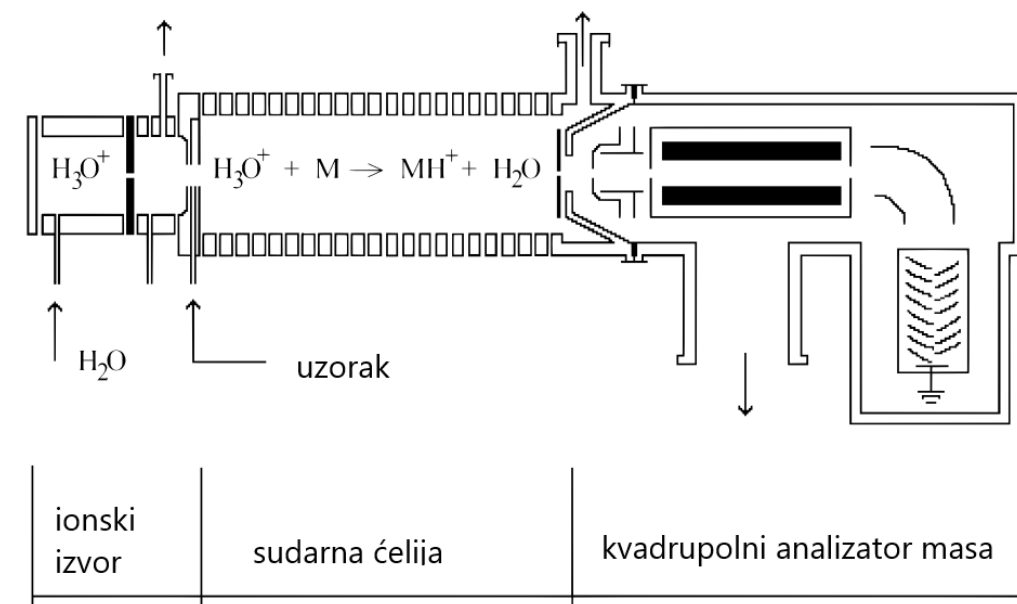
Spektrometrija masa uz ionizaciju prijenosom protona (PTR-MS)

Spektrometrija masa uz ionizaciju izabranim protokom iona (SIFT-MS)

- neinvazivne, brza detekcija hlapljivih spojeva u realnom vremenu, bez prethodne pripreme uzorka i kromatografskog odjeljivanja sastojaka, uzorak se u plinovitom stanju uvodi direktno u sustav i odmah analizira
- blaga kemijska ionizacija (1-2 eV) posredno putem plina reagensa → ne dolazi do jake fragmentacije
- određivanje apsolutnih, niskih koncentracija (ppt) bez primjene kalibracijskih krivulja
- određivanje karakterističnog profila hlapljivih spojeva (*fingerprint*) i brza klasifikacija uzoraka hrane (praćenje brzih procesa u prehrambenoj industriji, tijekom skladištenja, razlikovanje autentičnog od ne-autentičnog proizvoda, praćenje geografskog podrijetla, oslobađanje aroma tijekom konzumiranja hrane u realnom vremenu)

Tablica 7. Glavne značajke tehnika direktne spektrometrije masa primjenjivanih u analizi hlapljivih spojeva u hrani

|                   | APCI-MS                            | PTR-MS                                                    | SIFT-MS                                                   |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Ionski izvor      | elektroda                          | šuplja katoda                                             | mikrovalno pražnjenje                                     |
| Ion reagens       | $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$ | $\text{H}_3\text{O}^+$ ( $\text{NO}^+$ , $\text{O}_2^+$ ) | $\text{H}_3\text{O}^+$ ( $\text{NO}^+$ , $\text{O}_2^+$ ) |
| Naboj iona        | +/-                                | +                                                         | +/-                                                       |
| Plin              | dušik                              | zrak                                                      | dušik ili helij                                           |
| Reakcijska ćelija | unutar elektrode                   | protočna sudarna cijev                                    | protočna cijev                                            |
| Analizator masa   | kvadrupol, trostruki kvadrupol     | kvadrupol, ToF                                            | kvadrupol                                                 |



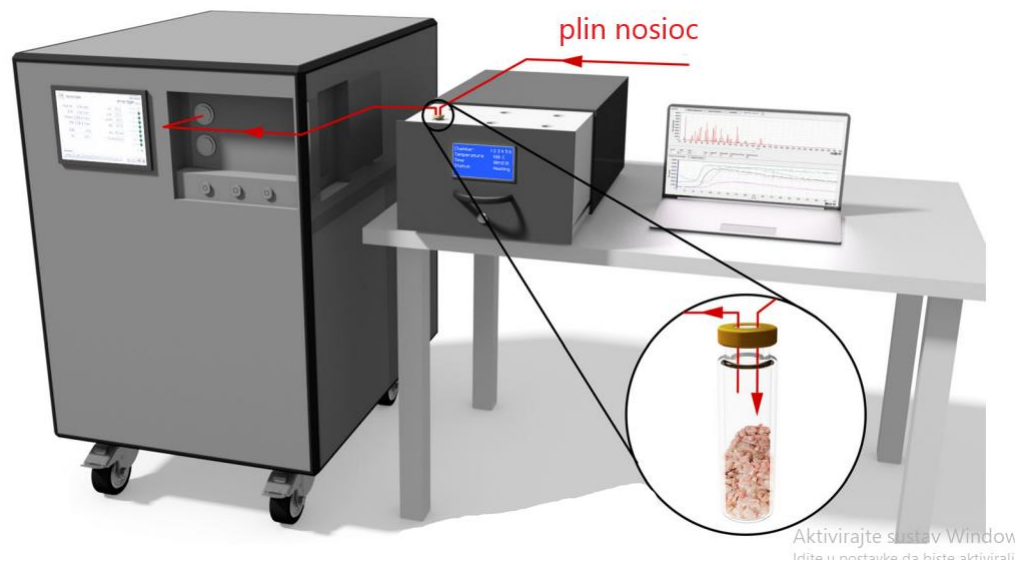
Slika 12. Shema PTR-MS instrumenta  
Amann i sur., *Meas. Sci. Rev.* **10** (2010) 180-188.

# Brza procjena roka trajanja mesa peradi pomoću PTR-MS tehnike

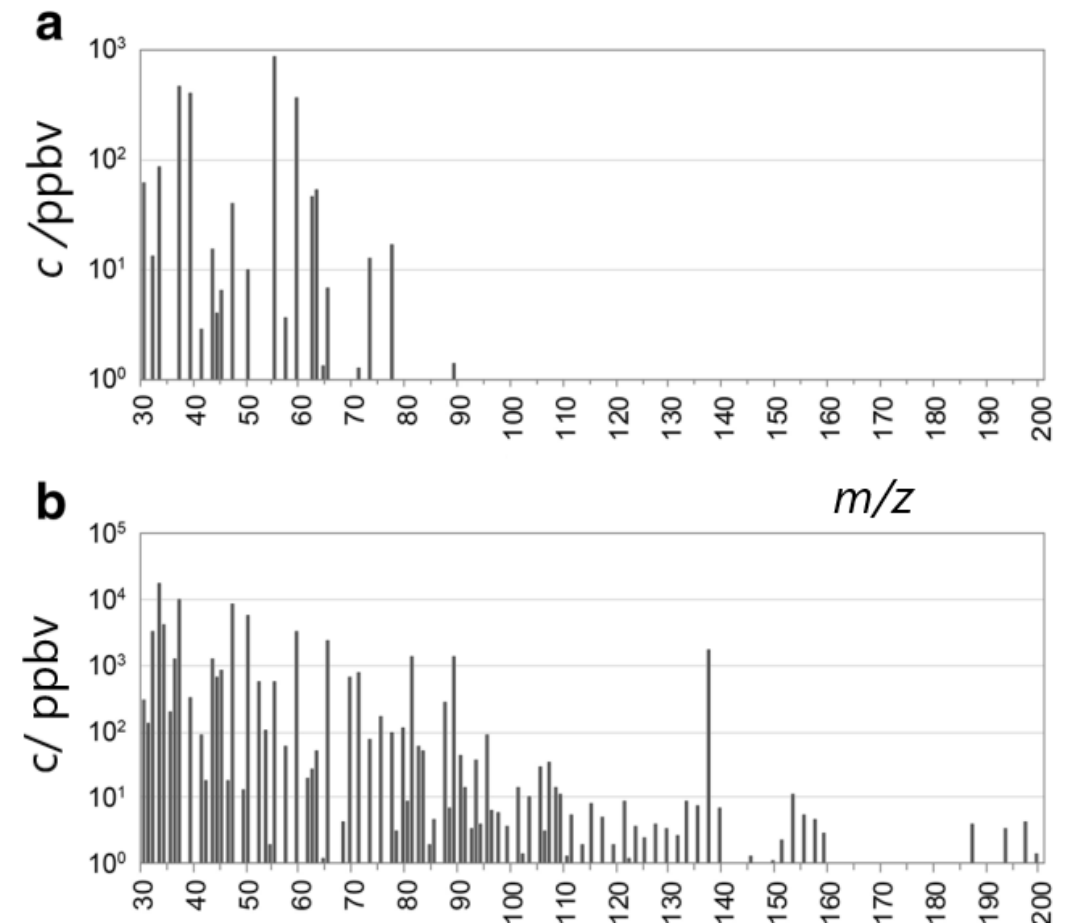
17

Wojnowski i sur., *Food Anal. Methods* **11** (2018) 2085–2092.

- 4g uzorka skladišteno na 4° - analiza tijekom 5 dana
- PTR-MS rezultati uspoređeni s mikrobiološkim mjerenjima – određeni spojevi izabrani kao indikatori za klasifikaciju svježine mesa



Slika 13. PTR-MS instrument

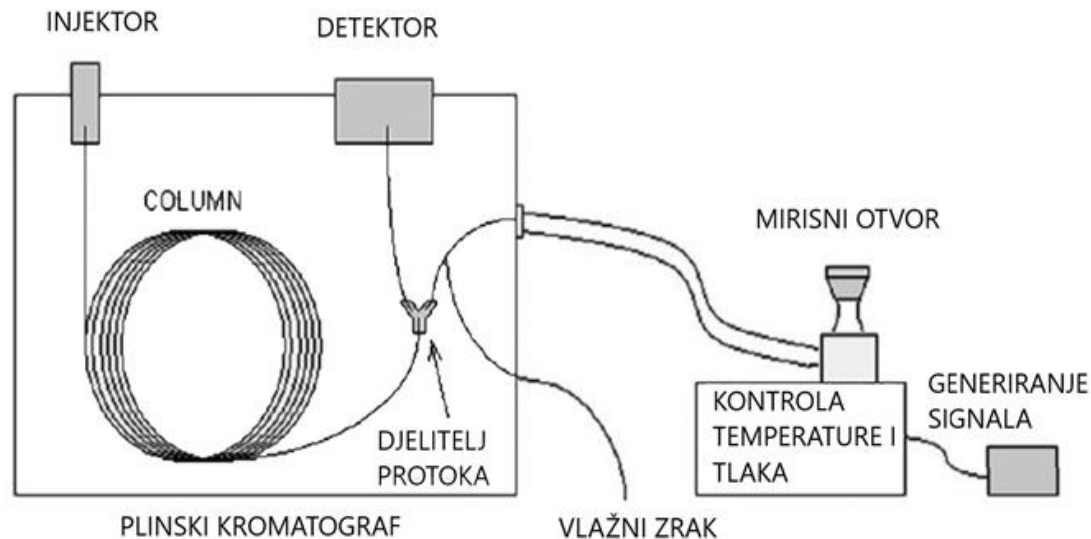


Slika 14. Spektri masa pilećeg mesa  
a) prvog i b) petog dana skladištenja

- kombinacija analitičke i senzorske tehnike – uz standardni detektor (MS) koristi se detektor temeljen na ljudskim osjetilima (olfaktometrijska jedinica ili električni nos)

## Plinska kromatografija-olfaktometrijska jedinica (GC-O)

- 1964. Fuller i sur.; kasnije poboljššan miješanjem eluiranih spojeva s vlažnim zrakom prije detektiranja olfaktometrom
- detekcija mirisnih tvari: njušenje spojeva eluiranih s kromatografske kolone



Slika 15. Shema vezane tehnike plinski kromatograf-olfaktometrijska jedinica

## MIRIS

**prag mirisa** = najniža koncentracija koja se može detektirati osjetom mirisa (trenirani panelisti)

**intenzitet** kao funkcija koncentracije

kvalitativni **opis mirisa**

- Analiza razrjeđenja ekstrakta arome (AEDA):**

faktor razrjeđenja arome FD

- Kombinirana metoda temeljena na hedonističkom doživljaju (CHARM):**

analiza razrjeđenja + trajanje mirisa

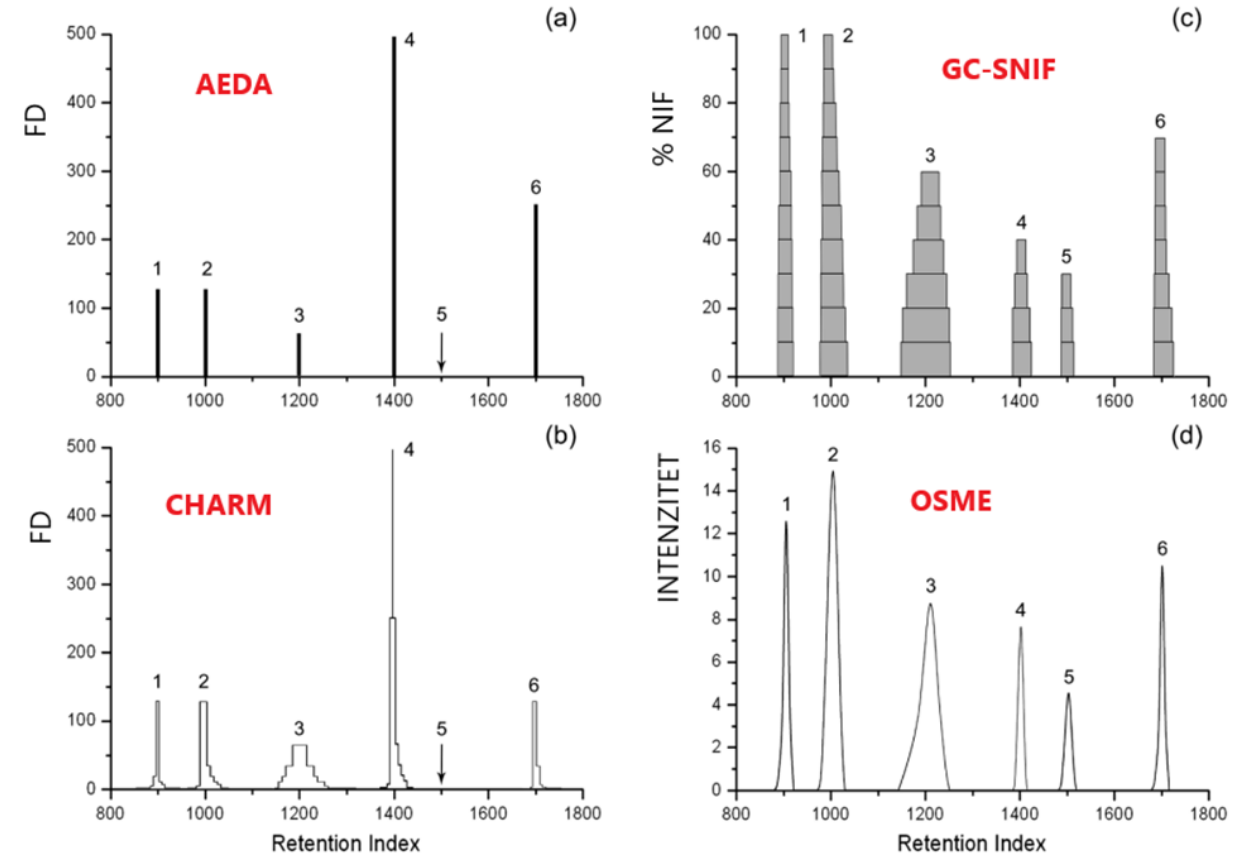
- Određivanje specifičnog intenziteta mirisa (OSME):**

intenzitet i vrijeme trajanja osjeta arome

- Frekvencija detekcije (GC-SNIF):**

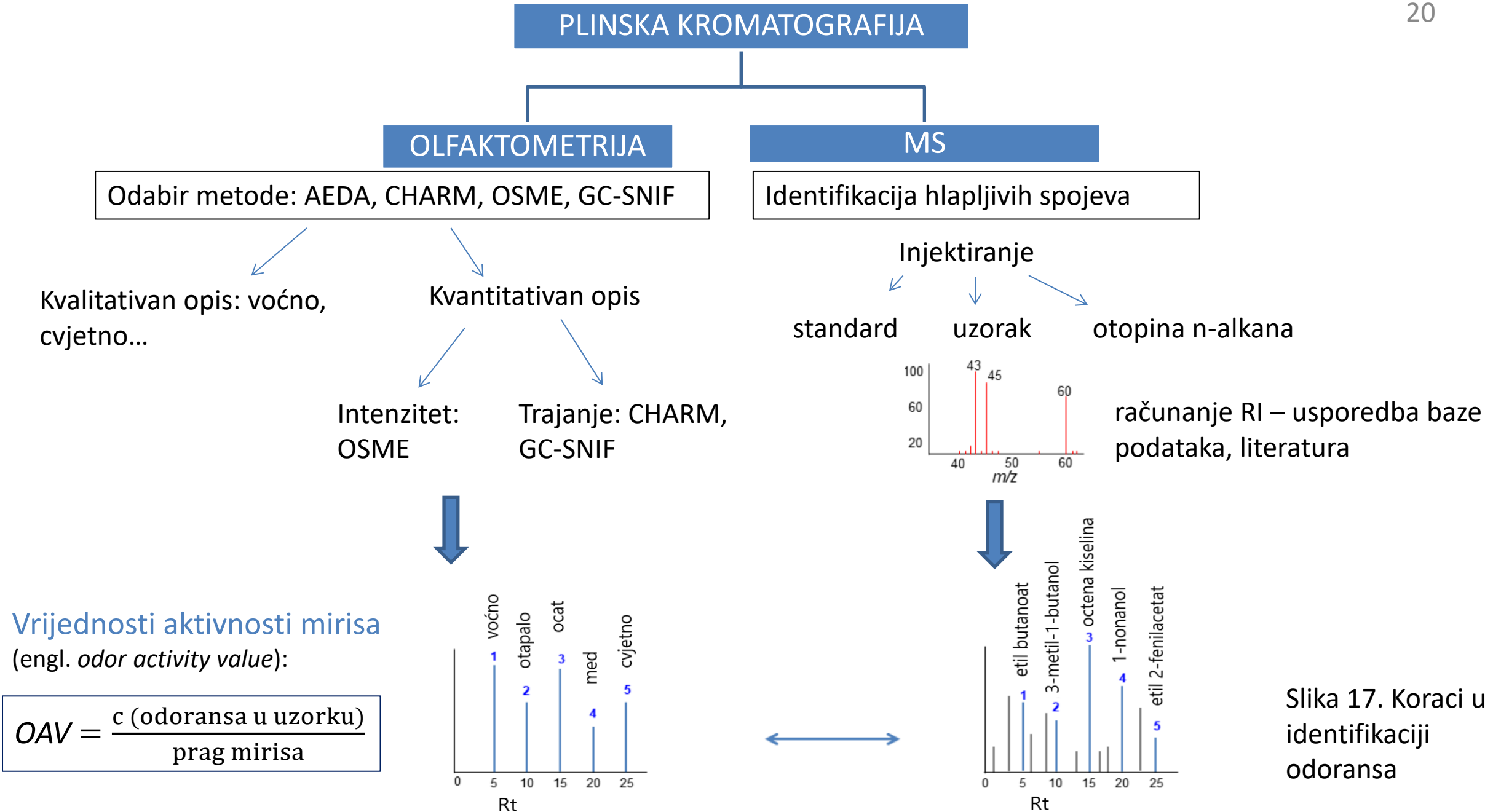
visina signala (NIF) = broj panelista koji su detektirali miris

površina signala = NIF × vrijeme trajanja mirisa



Slika 16. Aromagrami dobiveni s 4 različite metode

Delahunty i sur., *J. Sep. Sci* **29** (2006) 2107-2125.



Slika 17. Koraci u identifikaciji odoransa

# Zaključak

- aroma: rezultat karakteristične kombinacije odoransa, doprinos svakog određen koncentracijom i pragom mirisa
- točna i precizna kvantifikacija ključnih odoransa zahtjevna zbog velikih razlika u koncentraciji, hlapljivosti i kemijskoj stabilnosti
- GC-MS/O - standardna tehnika analize hlapljivih spojeva u hrani
- korištenje naprednih tehnika (GC×GC-ToF MS , GC-IMS) → bolje razdvajanje analita, veća osjetljivost, točnije određivanje aromatskog profila hrane
- očekuje se daljnji razvoj postojećih tehnika ekstrakcije i instrumentalnih analiza (poboljšanje i minijaturizacija/automatizacija uređaja, skraćivanja vremena analize, postizanja veće osjetljivosti i selektivnosti)

*HVALA NA PAŽNJI!*