



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Katarina Sopko Stracenski

ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA U HRANI

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

Kemijski seminar I

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

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	1
§ 2. AROMA HRANE	3
2.1. Parametri koji određuju miris hrane.....	3
2.2. Procesi nastajanja hlapljivih spojeva u hrani.....	4
§ 3. KORACI U ANALIZI HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	6
3.1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva	6
3.1.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi sa sorbensom nanesenim na vlakno (SPME)	8
3.1.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi sa sorbensom naneseim na magnet (SBSE).....	11
3.1.3. Dinamička ekstrakcija para iznad uzorka (DHS)	12
3.1.4. Isparavanje mirisa potpomognuto otapalom (SAFE)	13
3.2. Tehnike razdvajanja i identifikacije.....	14
3.2.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometar masa	14
3.2.2. Dvodimenzionalna plinska kromatografija.....	15
3.2.3. Identifikacija i kvantifikacija spojeva analiziranih tehnikom GC-MS.....	16
3.2.4. Tehnike direktne spektrometrije masa	17
3.2.5. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija ionske pokretljivosti	20
3.3. Senzorna karakterizacija	21
3.3.1. Plinska kromatografija-olfaktometrijska jedinica	21
3.3.2. Elektronski nos.....	24
3.4. Statističke metode	25
3.5. Volatilomika	26
§ 4. ZAKLJUČAK	28
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	29

§ 1. UVOD

Analiza aroma u prehrambenim proizvodima vrlo je dinamično područje koje se neprestano razvija, još od svojih početaka 50-ih godina 20. stoljeća otkrićem plinske kromatografije i kasnije povezivanjem sa instrumentima koji su omogućili senzornu karakterizaciju različitih uzoraka hrane. Miris hrane je važan faktor prilikom praćenja kvalitete različitih prehrambenih proizvoda budući da su miris i okus blisko povezani te određuju afinitet prema određenoj namirnici. Tvari koje posjeduju miris (tzv. odoransi) najvećim dijelom pripadaju različitim skupinama organskih spojeva među kojima su najzastupljeniji kiseline, alkoholi, aldehidi, amini, esteri, ketoni i heterociklički spojevi. Simon¹ hlapljive spojeve najčešće identificirane u hrani svrstava u 9 kategorija (tablica 1). Hlapljivi organski spojevi (engl. *volatile organic compounds*, VOCs) nastaju različitim procesima, npr. sazrijevanjem biljaka, fermentacijom, tijekom procesa prerade i skladištenja, ali i kontaminacijom hrane. Njihova koncentracija ovisi o klimatskim uvjetima, tlu, uvjetima obrade i proizvodnje te načinu skladištenja. Nepoželjni mirisi (engl. *off odours*) rezultat su nepravilnog proizvodnog procesa, prirodne degradacije produkata ili nepravilnog skladištenja. Količina identificiranih hlapljivih spojeva uvelike ovisi o tehnikama ekstrakcije i identifikacije. Do danas su razvijene brojne tehnike ekstrakcije hlapljivih tvari iz različitih uzoraka hrane koje su, u kombinaciji s plinskom kromatografijom i spektrometrijom masa uz senzorsku analizu, omogućile identifikaciju velikog broja raznovrsnih odoransa. Ovakva analiza zahtijeva pravilan odabir tehnike ekstrakcije, razvoj instrumentalne metode kao i uvježbane paneliste koji će prepoznavati prisutne arome i ocjenjivati njihovu kvalitetu.

Analiza hlapljivih spojeva u hrani najčešće se provodi s ciljem utvrđivanja aromatskog profila različitih sorti neke namirnice, praćenja kvalitete proizvoda tijekom proizvodnog procesa i primjene različitih tretmana i skladištenja, određivanja individualnih komponenti koje najviše doprinose aromi i kakvoći hrane te često utvrđivanja autentičnosti proizvoda. Također, određivanje “mirisnog koda“, odnosno ključnih molekula koje određuju neku aromu hrane, omogućilo bi stvaranje kopija koji potpuno rekonstruiraju prirodni miris za upotrebu u umjetnimokusima i mirisima.

Cilj ovog rada jest prikazati najnovija saznanja o tome koji spojevi i na koji način određuju aromu hrane koju konzumiramo. Uz to, predstaviti će se koraci u analizi hlapljivih

tvari u prehrambenim proizvodima, dati pregled najčešće korištenih tehnika ekstrakcije te opisati najnovija tehnološka rješenja u smislu njihove instrumentalne i senzorne karakterizacije.

Tablica 1. Kategorije odoransa najčešće identificiranih u hrani
(preuzeto i prilagođeno prema Simon¹)

Skupina	Karakteristike mirisa	Primjer spoja
aldehidi	zeleno, voštano, masno, voćno i nalik na gljive	3-heksenal, 2,6-nonadienal, dekanal
sumporni spojevi	sumporast, opor, nalik kupusu i luku	dimetilsulfid, dipropilsulfid, metional, alicin
aciklički terpeni	cvjetno, ruža, limun, lavanda	geraniol, linalol, citronelol, nerol, mircenol
ciklički terpeni	balzamično, nalik kamforu, mint, ljuto, gorko, zemljano i nalik timijanu	limonen, pinen, eukaliptol, 3- kareni, borneol, safranal
seskviterpeni	težak cvjetni, drvenast, zemljani, miris povrća	kariofilen, bisabolol, bergamoten, kamfen, selinen
aromatski spojevi	badem, anis, majčina dušica, vanilija, dim	vanilin, 4-etilgvajakol, timol, benzaldehid, kuminaldehid, elemicin
fenolni spojevi	slatko, anis, muškatni oraščić, ljuto, cimet	eugenol, kumarin, anetol, estragol, miristicin, safrol
heterociklički spojevi	poput kore kruha, sijeno, karamel, drvenasto, orašasto, pečeno	furfurali, pirazini, sotolon
trigeminalni spojevi bez mirisa	iritirajuće, nagrizajuće, hladi, grije	kapsaicin, kvercetin, galna kiselina, oksalna kiselina

§ 2. AROMA HRANE

2.1. Parametri koji određuju miris hrane

Kemijski spojevi koji potiču osjet mirisa nazivaju se odoransi. To su većinom lakohlapljivi organski spojevi male relativne molekulske mase (< 300) čija su mirisna svojstva uzrokovana njihovom strukturom i fizikalnim osobinama, odnosno načinom na koji se vežu na proteinske mirisne receptore u nosu. Do njih dolaze u obliku aerosola nakon čega informacije o mirisu u obliku kemijskog podražaja putuju živčanim sustavom do mozga gdje se pretvaraju u električni signal. Njušni sustav prima podražaje iz okoline pomoću svojih 400 mirisnih receptora zbog čega razlikujemo veliki broj mirisa. Da bi se neki hlapljivi spoj percipirao kao miris, mora biti u koncentraciji koja je veća od njegovog praga mirisa (engl. *odor threshold*). Mirisne spojeve u hrani ponekad karakterizira izrazito nizak prag mirisa (ng L^{-1} ili ng kg^{-1}) što njihovu ekstrakciju, identifikaciju i kvantifikaciju čini izrazito izazovnom.

Jeleń i sur.² navode kako od 12 000 hlapljivih spojeva identificiranih u hrani, svega 5% ima značajnu ulogu u formiranju arome prehrambenih proizvoda. Regueiro i sur.³ su podijelili prehrambene proizvode u 4 skupine na temelju količine odoransa koji definiraju aromu. Prvoj skupini pripada hrana čiji miris je određen jednim karakterističnim spojem (npr. aroma banane je određena mirisom 3-metilbutil etanoata, benzaldehid je karakterističan spoj u aromi badema, citral određuje aromu limuna itd). Drugu skupinu predstavljaju prehrambeni proizvodi čiji je miris rezultat doprinosa manjeg broja spojeva (npr. aroma maslaca koja je definirana najviše mirisom 2,3-butandiona uz doprinosa etanola i dimetilsulfida), dok kod zadnje dvije skupine ukupnu aromu čini veći broj spojeva i vjerojatno ne postoji karakterističan odorans. To je najčešće termički obrađena i fermentirana hrana, npr. pečeno meso, kava, kruh itd. Dunkel i sur.⁴ obradili su veliki broj publikacija koje su se bavile određivanjem ključnih odoransa u širokom rasponu različitih kategorija prehrambenih proizvoda te su zaključili da od navedenih preko 10 000 hlapljivih spojeva, miris hrane je određen tek sa njih 226. Koristeći statističke programe i *heatmap* vizualizaciju dobivenih podataka, prepoznati su „općeniti“ odoransi koji su detektirani u više od 25% od 227 analiziranih uzoraka (tablica 2.). Također su određeni i „individualni“ odoransi koji su identificirani u manje od 5% uzoraka hrane, među kojima se ističu oni koji doprinose svega

nekoliko namirnica i predstavljaju za njih karakteristične mirise. Tako npr. 4,5-ditio-1,7-oktadien (alicin) daje karakterističnu aromu češnjaku, a „vinski lakton“ ((3*S*,3*aS*,7*aR*)-3,6-dimetil-3*a*,4,5,7*a*-tetrahidro-3*H*-1-benzofuran-2-on) je odgovoran za miris kokosa u vinu. Većina „individualnih“ odoransa ima izrazito nizak prag mirisa i time značajno utječu na percepciju arome.

Međutim, velika raznolikost mirisa hrane rezultat je činjenice da cjelokupnoj percepciji doprinose određeni ključni spojevi u točno određenim koncentracijama, što u kombinaciji sa 400 mirisnih receptora daje veliki broj mogućih mirisa. Dakle, jedinstvenu aromu svake namirnice čini kombinacija više odoransa koji pripadaju različitim skupinama kemijskih spojeva, a takav „mirisni kod/uzorak“ sastoji se od 3 do 40 kemijskih spojeva. Npr. pokazalo se da je jedna od najkompleksnijih aroma konjaka, koju čini set od 36 ključnih molekula, dok je miris maslaca kodiran sa samo njih tri.⁴

Doprinos pojedinog spoja aromi hrane ovisi o njegovoj koncentraciji, pragu mirisa te interakcijama s matricom i drugim hlapljivim komponentama. Primjer ovisnosti mirisa o koncentraciji je 3-metilindol (skatol), koji je glavni uzročnik fekalnog mirisa, dok pri niskim koncentracijama ima cvjetni miris i nalazi se u nekoliko cvjetova i eteričnih ulja, uključujući cvjetove naranče i jasmina. Otpuštanje hlapljivih spojeva iz matrice hrane ovisi o koeficijentu razdjeljenja između zraka i matrice hrane te interakcijama spojeva sa samom matricom. Upravo različite interakcije mirisnih sastojaka unutar neke namirnice dovode do stvaranja mješavine koja se percipira kao novi miris.

2.2. Procesi nastajanja hlapljivih spojeva u hrani

Hlapljivi spojevi nastaju enzimski kataliziranim reakcijama (fermentacija i tijekom proizvodnje hrane biljnog podrijetla) ili termalnom degradacijom iz prekursora kao što su ugljikohidrati, aminokiseline i nezasićene masne kiseline. Odoransi koji se u manjem postotku javljaju u hrani najčešće nastaju iz specifičnih prekursora kao što su polifenoli i izoprenoidi.⁴ Tipične neenzimske reakcije nastajanja odoransa su Streckerova degradacija i Maillardove reakcije koje se odvijaju tijekom dugog izlaganja visokim temperaturama (npr. pečenje i prženje hrane). Maillardove reakcije, odgovorne za tzv. neenzimatsko posmeđivanje, reakcije su u kojim šećeri reagiraju s amino skupinama aminokiselina ili proteina te nastaju produkti koji utječu na okus, aromu i boju hrane. Spojevi nastali ovom reakcijom daju karakterističan miris pečenim/kuhanim proizvodima (meso, kava).⁵

Tablica 2. Najčešći odoransi u hrani (preuzeto i prilagođeno prema Dunkel i sur.⁴)

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

§ 3. KORACI U ANALIZI HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza hlapljivih spojeva u prehrambenim proizvodima uključuje nekoliko koraka:

- 1) izolacija i ukoncentriravanje
- 2) razdvajanje i identifikacija instrumentalnim tehnikama
- 3) kvantifikacija
- 4) senzorna karakterizacija

Zbog kompleksnosti matrice i velikog broja hlapljivih spojeva u većini prehrambenih proizvoda, priprema uzorka ključan je i izazovan korak u njihovoj analizi. Potrebno je izabrati odgovarajuću tehniku ekstrakcije uzimajući u obzir da ciljane molekule mogu na različite načine reagirati s ostalim sastojcima hrane (lipidima, proteinima i šećerima), ali i međusobno. Dodatna poteškoća jesu velike razlike u pragu mirisa i koncentraciji ciljanih spojeva zbog čega sama metodologija analize može utjecati na dobiveni aromatski profil. Izolacija i ukoncentriravanje hlapljivih spojeva vrši se ekstrakcijom ili destilacijom, nakon čega slijedi razdvajanje kromatografskim metodama. Instrumentalnim tehnikama identificiraju se i kvantificiraju specifični odoransi odgovorni za karakterističnu aromu analiziranog uzorka hrane ili se provodi ne-ciljana analiza u svrhu određivanja ukupnog profila hlapljivih spojeva. Plinska kromatografija u sprezi s detektorom masa vodeća je tehnika za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju hlapljivih spojeva. Upotrebom olfaktometrijske jedinice ili elektronskog nosa kao dodatnog detektora, vrši se senzorna karakterizacija od strane obučanih panelista te se dobivaju informacije o spojevima koji najviše doprinose aromi ispitivanog uzorka. U narednim poglavljima detaljnije će se objasniti svaki korak tijekom analize hlapljivih spojeva u hrani.

3.1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva

Prilikom analize aroma hrane, jedan od glavnih zahtjeva jesu brze i jednostavne metode pripreme uzorka koje se mogu primijeniti u rutinskim analizama kao rezultat potrebe za brzim praćenjem hrane dostupne na tržištu. Teži se automatizaciji analitičkog postupka i skraćivanju ukupnog vremena analize, smanjenju količine uzorka potrebnog za analizu, kao i primjeni „zelene kemije“, odnosno smanjenoj upotrebi organskih otapala i izloženosti toksičnim

reagensima.⁵ Prehrambeni proizvodi najčešće su kompleksne matrice i zbog toga su znanstvenici u stalnoj potrazi za novim, ekološki prihvatljivijim, jednostavnijim i učinkovitijim metodama ekstrakcije. Stoga se, osim klasičnih ekstrakcijskih tehnika kao što su ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE) i tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE), pri analizi hrane koriste i:

- a) ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE)
- b) isparavanje mirisa potpomognuto otapalom (engl. *Solvent Assited Flavour Extraction*, SAFE)
- c) simultana hidrodestilacija-ekstrakcija (engl. *Simultaneous Distillation-Extraction*, SDE) – uobičajena metoda odvajanja hlapljivih spojeva iz vodenih matrica prije analize plinskim kromatografom; temeljena na kombinaciji destilacije i ekstrakcije otapalom (Likens-Nickerson aparatura)

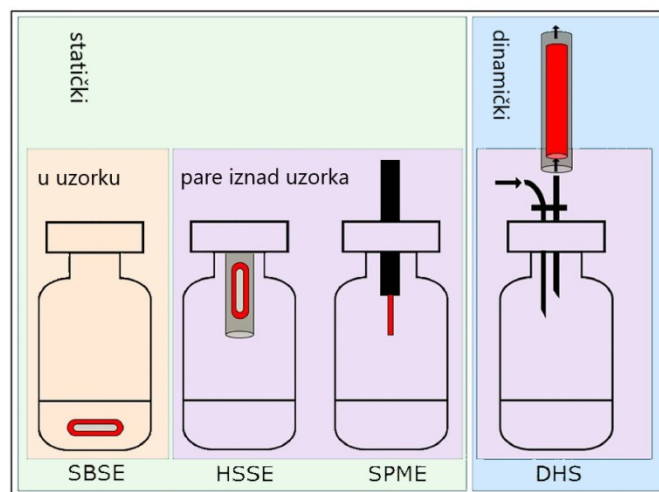
Međutim, zbog jednostavnosti i mogućnosti brzog dobivanja profila hlapljivih sastojaka, za ekstrakciju hlapljivih spojeva u uzorcima hrane najčešće se primjenjuju tehnike temeljene na sorpciji analita: dinamička ekstrakcija para iznad uzorka (engl. *Dynamic headspace*, DHS) te tehnike mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid-Phase Microextraction*, SPME). SPME tehnike se temelje na sorpciji analita na polimerni sorbens. Ekološki su prihvatljivije jer ne zahtijevaju upotrebu organskog otapala i koriste manju količinu uzorka.⁴ Pri tome se može analizirati analit u otopini (*in liquid* tehnika) ili pare iznad uzorka (*headspace* tehnika).

Također, s obzirom na vrstu ravnoteže koja se uspostavlja, tehnike mikroekstrakcije mogu se podijeliti na⁶:

- a) tehnike posredovane miješanjem - statičke (engl. *Stirring Mediated SPME*), kod kojih sorbens može biti nanesen na vlakno (engl. *Fiber Solid-Phase Microextraction*, fiber SPME) ili magnet (engl. *Stir-Bar Sorptive Microextraction*, SBSE i HSSE)
- b) tehnike posredovane protokom - dinamičke (engl. *Flow Through Mediated SPME*), gdje sorbens može biti nanesen u koloni (engl. *in-tube Solid-Phase Microextraction*, IT-SPME), u igli (engl. *in-needle Solid-Phase Microextraction*, in-needle SPME) ili u nastavku za automatske pipete (engl. *in-tip Solid-Phase Microextraction*, in-tip SPME).

Usporedba statičkih i dinamičkih ekstrakcijskih tehnika temeljenih na sorpciji analita na polimerni sorbens prikazana je na slici 1. Statičke tehnike temelje se na uspostavljanju ravnotežne raspodjele sastojaka analita između matrice i uzorka, dok se kod dinamičkih

konstantnim protokom inertnog plina iznad uzorka analiti ukoncentriravaju na određeni adsorbens („zamku“) koja može biti direktno povezana s uzorkom u viali putem igle.



Slika 1. Shematski prikaz četiri ekstrakcijske tehnike temeljene na sorpciji analita (preuzeto i prilagođeno prema Luov, 2021.⁷⁾)

Za analizu tekućih prehrambenih proizvoda česta je upotreba i mikroekstrakcije tekućom fazom (engl. *Liquid phase Microextraction*, LPME) koja označava tekućinsko-tekućinsku ekstrakciju, ali uz smanjenu količinu otapala.⁸ SDME (engl. *Single drop microextraction*) je vrsta mikroekstrakcije tekućom fazom kod koje se kap organskog otapala (1-3 μL) nanosi na vrh igle te se ekstrahirani spojevi injektiraju u plinski kromatograf. Također se može primjenjivati kao *headspace* ili *in liquid* tehnika. U navedenim poglavljima detaljnije će se objasniti neke od najčešće primjenjivanih tehnika za ekstrakciju hlapljivih spojeva.

3.1.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi sa sorbentsom nanesenim na vlakno (SPME)

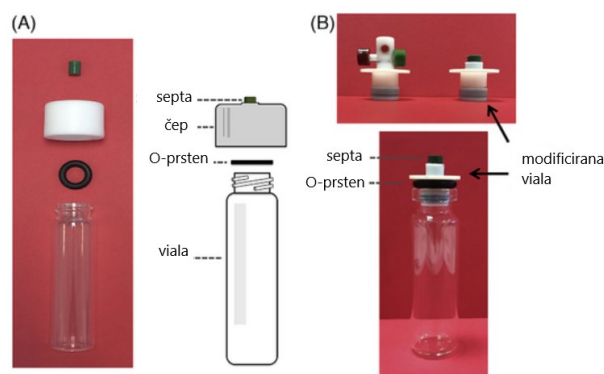
Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) temelji se na sorpciji analita na određeni sorbens koji je nanesen na vlakno od taljenog silicijevog dioksida. Ovu tehniku uveo je J. Pawliszyn 1990. g. Vlakno se može izložiti analitu direktnim uranjanjem u uzorak (engl. *direct immersion*, DI) ili postavljanjem vlakna na definiranu visinu iznad površine uzorka pri čemu dolazi do akumulacije para iznad uzorka (engl. *headspace*, HS). Ekstrakcija se odvija pri definiranoj temperaturi i nakon određenog vremena dolazi do uspostavljanja ravnoteže raspodjele analita između matrice uzorka i adsorbensa. Ekstrakcija zbog toga nije potpuna, odnosno ne ekstrahira se ukupna količina određenog spoja

zbog čega neki autori predlažu višestruku ekstrakciju i zbrajanje površina pikova dobivenih plinskokromatografskom analizom.⁵ Vlakno s akumuliranim analitom postavlja se u injektor plinskog kromatografa gdje dolazi do termičke desorpcije i direktnog ulaska sastojaka analita u kromatografsku kolonu. Osjetljivost ove tehnike ovisi o omjeru volumena tekućine i plinovite faze, temperaturi, tlaku i brzini miješanja uzorka. Vlakna se razlikuju u vrsti, polarnosti i debljini nanesenog sorbensa te odabir vlakna prikladnog za analizu ovisi o vrsti i polarnosti analita. Primjer nepolarnog sorbensa je polidimetilsiloksan (PDMS), a polarnog poliakrilat (PA). Za analizu hlapljivih spojeva u hrani najučinkovitijim se pokazao divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (50/30 μm DVB/CAR/PDMS) kojim su se, u usporedbi s drugim sorbensima, dobivali pikovi najveće površine.²

Prednosti mikroekstrakcije na čvrstoj fazi u odnosu na klasičnu ekstrakciju tekuće - tekuće su jednostavna priprema uzorka, analiza bez upotrebe organskog otapala, skraćivanje ukupnog vremena analize, mogućnost automatizacije te prikladnost za širok raspon analita. Također, ova tehnika može objediniti više koraka u analizi, kao što su uzorkovanje, ekstrakciju te transport analita do instrumenta.⁵ Međutim, profil hlapljivih tvari snažno ovisi o uvjetima ekstrakcije, afinitetu analita prema sorbensu vlakna te selektivnosti samog vlakna. Nedostatci mikroekstrakcije na čvrstoj fazi također su nizak kapacitet sorpcije, kemijska nestabilnost vlakna i pH osjetljivost, kratak period upotrebe i degradacija korištenjem što podrazumijeva upotrebu unutarnjeg standarda. Također, postoji mogućnost bubrenja sorbensa ukoliko se koriste određena nepolarna otapala visoke koncentracije.

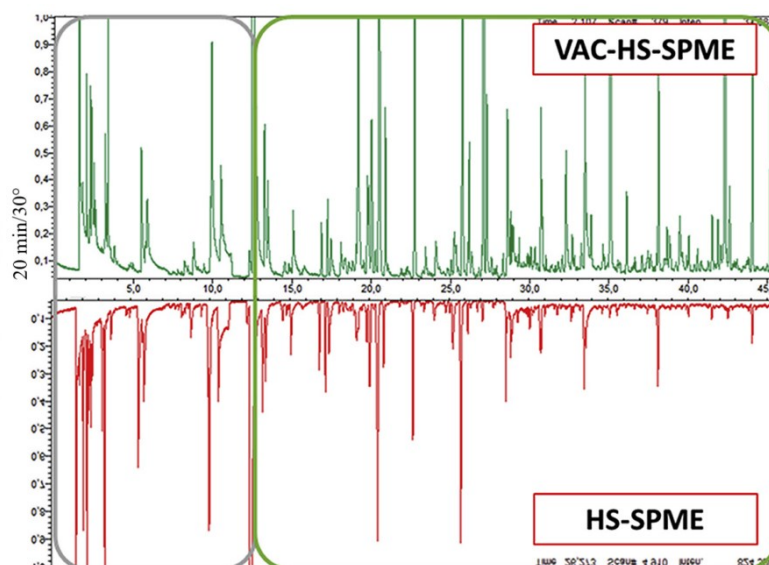
Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi široko se primjenjuje u brojnim područjima te je predvodnik u analizi aroma u različitim uzorcima. U analizi prehrambenih proizvoda najčešće se koristi za analizu aroma u voću i povrću, mesu, mliječnim proizvodima, medu, pićima, vinu.⁵ Ovom tehnikom mogu se usporediti različite sorte voća i povrća, profilirati određeni hlapljivi spojevi u hrani, provjeriti autentičnost, analizirati odabrane spojeve važne za kvalitetu hrane, pratiti utjecaj tehnoloških procesa na spojeve koji utječu na aromu te odrediti karakteristične note mirisa tehnikom plinska kromatografija-olfaktometrijska jedinica.²

Osim klasične izvedbe SPME tehnike, zabilježena su i novija rješenja kao što je HS-SPME potpomognut vakuumom (Vac-HS-SPME), s ciljem učinkovitije ekstrakcije djelomično hlapljivih spojeva.⁹ Ekstrakcija se odvija pod vakuumom koji se postiže pomoću vakuum pumpe spojene s iglom koja je umetnuta kroz septu u klasičnu *headspace* vialu (slika 2). Ispod septe umeće se O-prsten koji pomaže održavanju vakuuma.



Slika 2. Primjeri izvedbi HS-SPME tehnike potpomognute vakuomom (preuzeto i prilagođeno od Louw i sur., 2021.⁹)

Mascresz i suradnici¹⁰ analizirali su profile ekstradjevičanskog maslinovog ulja tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa nakon ekstrakcije tehnikama HS-SPME i Vac-HS-SPME, uz vlakno PDMS/DVB/CAR. Uočili su značajno poboljšanje ekstrakcije djelomično hlapljivih spojeva tehnikom Vac-HS-SPME (slika 3).



Slika 3. Usporedba ukupne ionske struje (TIC) hlapljivih spojeva ekstrahiranih iz ekstrakta djevičanskog maslinovog ulja tehnikama Vac-HS-SPME (zeleno) i HS-SPME (crveno) (preuzeto i prilagođeno prema Mascresz i sur., 2019.¹⁰)

Također, kako bi se povećao volumen sorbensa nanesenog na vlakno, 2015. god. uvedena je tehnika SPME *Arrow*, koja koristi deblji sloj sorbensa. Ekstrakcijom hlapljivih spojeva iz Baijiu (kineski liker) navedenom tehnikom uz upotrebu sorbensa DVB/CAR,WR/PDMS 120

μm (WR označava široki raspon, engl. *wide range*), Zhang i suradnici pokazali su veću osjetljivost u odnosu na klasično DVB/CAR/PDMS 50/30 μm .¹¹ Međutim, broj detektiranih hlapljivih spojeva nije se znatno razlikovao.

3.1.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi sa sorbensom nanesenim na magnet (SBSE)

Mikroekstrakciju sa sorbensom nanesenim na magnet predstavili su Baltussen i sur. 1999. g. kako bi povećali učinkovitost ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Kod ove tehnike sorbens može biti nanesen na magnetski mješalac koji se nalazi u uzorku (SBSE) ili iznad nje (*headspace* SBSE ili skraćeno HSSE). U literaturi je druga po redu najčešće spominjana tehnika ekstrakcije u analizi hlapljivih spojeva.⁵ SBSE i HSSE pokazuju veliki kapacitet sorpcije na razini ultratragova hlapljivih i djelomično hlapljivih spojeva nepolarnog do srednje polarnog karaktera. Poput SPME, također ne zahtijeva upotrebu organskog otapala i koristi malu količinu uzorka. Ekstrakcija se provodi na način da se sorbens postavi u tekući uzorak koji se miješa primjenom magnetske mješalice dok se ne postigne ravnotežno stanje analita između sorbena i uzorka. Nakon adsorpcije analita, magnet se izvadi iz uzorka, osuši i ispere deioniziranom vodom te se analit desorbira desorpcijom u injektoru plinskog ili tekućinskog kromatografa. Prednost SBSE u odnosu na SPME jest veći kapacitet sorpcije i učinkovitost ekstrakcije zahvaljujući većoj količini korištenog sorbena (50-250 više nego kod SPME). Moguće je postići vrlo nisku granicu detekcije (ng L^{-1}), a učinkovitost ekstrakcije ovisi o brzini miješanja i volumenu uzorka. Međutim, primjenjiva je samo za tekuće uzorke, a za ekstrakciju lakohlapljivih analita prisutnih u složenim matricama primjenjuje se HSSE. SBSE zahtijeva duže vrijeme ekstrakcije zbog duljeg vremena potrebnog za postizanje ravnotežne raspodjele analita između otopine i sorbena te ponekad dodatnu ekstrakciju u odgovarajućem otapalu. Također, nije moguća potpuna automatizacija. Kao sorbens se najčešće koristi polidimetilsiloksan (PDMS) zbog čega se ova tehnika najviše primjenjivala za ekstrakciju nepolarnih spojeva, iako su danas dostupni i sorbensi prikladni za polarne spojeve (EG-silikon). Međutim, izbor komercijalno dostupnih sorbena manji je nego kod SPME tehnike. Usporedba SPME i SBSE prikazana je u tablici 3. Prednost ove tehnike također je i mogućnost istodobne ili uzastopne upotrebe nekoliko različitih nosača (engl. Multi-Stir Bar Sorptive Microextraction, ^mSBSE).⁶ SBSE nalazi primjenu u analizi vina, pića, detekciji nepoželjnih mirisa te praćenju metabolizma sastojaka arome.² Coelho i suradnici¹², koristeći SBSE tehniku za ekstrakciju monoterpena, monoterpenola, seskviterpena, alkohola i estera u

pjenušcima različitih sorti, tala i faza dozrijevanja grožđa opazili su znatan utjecaj vrste tla i sorte grožđa na profil hlapljivih tvari. SBSE se također koristila za otkrivanje hlapljivih sumpornih spojeva koji su najčešći nepoželjni mirisi (*off odours*) u vinu.^{13,14}

Tablica 3. Usporedba SPME i SBSE tehnike (preuzeto i prilagođeno prema Rosendo i sur.¹⁵)

	SPME	SBSE
Vrsta matrice	tekućina, plin, krutina	tekućina
Debljina sorbensa	150 µm	0,1 -5 mm
Volumen uzorka (mL)	0,5 - 20	1 - 100
Re-upotreba sorbensa	50-100 puta	6-80 puta
Vrijeme analize (min)	5 - 120	10 - 240
Iskorištenje	nisko	dobro
Osjetljivost	niska	dobra
Prednosti	jednostavnost, „zelena“ tehnika, automatiziranost,	volumen uzorka i miješanje utječu na učinkovitost ekstrakcije
Nedostatci	nepotpuna ekstrakcija, degradacija vlakna	zahtijeva dodatnu desorpcijsku jedinicu

3.1.3. Dinamička ekstrakcija para iznad uzorka (DHS)

DHS se temelji na 2 osnovna principa:

a) „*purge and trap*“: propuhivanjem inertnog plina kroz matricu uzorka, hlapljivi organski spojevi se uklanjaju i akumuliraju na odgovarajućem mediju za prikupljanje, npr. hladna „zamka“, sorbens ili specifično otapalo

b) dinamički pristup: analiti se uzorkuju strujom inertnog plina koji prolazi preko matrice uzorka. Uzorkovane hlapljive tvari eluiraju se pomoću otapala ili termičkom desorpcijom te analiziraju plinskom kromatografijom ili vezanim sustavom plinski kromatograf-spektrometar masa.

Dinamička ekstrakcija ne ovisi o ravnoteži između plinske i tekuće faze zbog čega je moguće koncentrirati analite na razini ultra-tragova čime se povećava osjetljivost. Također, DHS koristi širok raspon adsorbensa.

Istraživanja su pokazala da statičke i dinamičke tehnike ekstrakcije pokazuju različit profil spojeva u istom uzorku hrane. Diez-Simon i suradnici⁹ optimizirali su četiri tehnike ekstrakcije (SPME, SBSE, HSSE i DHS) hlapljivih tvari iz aroma na bazi ekstrakta kvasca te su ispitali utjecaj dodatka soli na ekstrakciju. Ekstrakti su analizirani vezanim sustavom plinski kromatograf-spektrometar masa. Uspoređujući doseg ekstrakcije i ponovljivost, pokazali su kako se tehnika SBSE pokazala najprikladnijom za ekstrakciju polisulfida, pirazina i terpenola, SPME seskviterpena, a DHS monoterpena. Najveći broj hlapljivih spojeva detektiran je SBSE tehnikom, dok je utjecaj dodatak soli u uzorak na kvantifikaciju uočen samo kod ekstrakcije SPME tehnikom. Također je uočeno kako SPME i SBSE pokazuju najveću ponovljivost te da HSSE i DHS pokazuju sličan profil ekstrahiranih hlapljivih spojeva.

3.1.4. Isparavanje mirisa potpomognuto otapalom (SAFE)

Od tehnika ekstrakcije temeljenih na vakuum destilaciji, za analizu aroma najviše se koristi SAFE kako bi se spriječila termička degradacija nestabilnih spojeva i stvaranje nepoželjnih produkata. Ova tehnika, razvijena 90-ih godina 20. stoljeća, temelji se na destilaciji hlapljivih komponenti pri nižim temperaturama (40° - 50°) i visokom vakuumu (10^{-2} – 10^{-3} Pa) pri čemu dolazi do razdvajanja hlapljivih i nehlapljivih komponenti. Glavni nedostatak ove tehnike jest dugotrajnija analiza i veća količina uzorka potrebna za analizu. SAFE je važan preliminarni dio sensorike (molekularnog senzorskog koncepta) koji omogućava odvajanje hlapljivih od nehlapljivih spojeva za daljnju instrumentalnu analizu te je uglavnom korištena za potvrdu specifičnih molekula odgovornih za aromu različitih prehrambenih proizvoda.⁵ SPME i SAFE smatraju se komplementarnim tehnikama te se u mnogim istraživanjima paralelno primjenjuju kako bi se detektirao kompletan raspon hlapljivih spojeva u uzorku hrane. Wiczorek i suradnici¹⁶ uspoređivali su tri tehnike ekstrakcije hlapljivih spojeva iz brokule: SPME, SAFE i simultanu destilaciju-ekstrakciju (SDE). Ekstrakti su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-olfaktometrijska jedinica (GC-O) te dodatno tehnikom dvodimenzionalne plinske kromatografije uz analizator vremena leta (GC×GC-ToF). Pokazalo se da se tehnikom SAFE ekstrahirao najveći broj odoransa, a sa SPME najmanje. Međutim, SPME je bio koristan za detekciju lakohlapljivih spojeva koji se nisu mogli detektirati tehnikama SDE i SAFE (tablica 4).

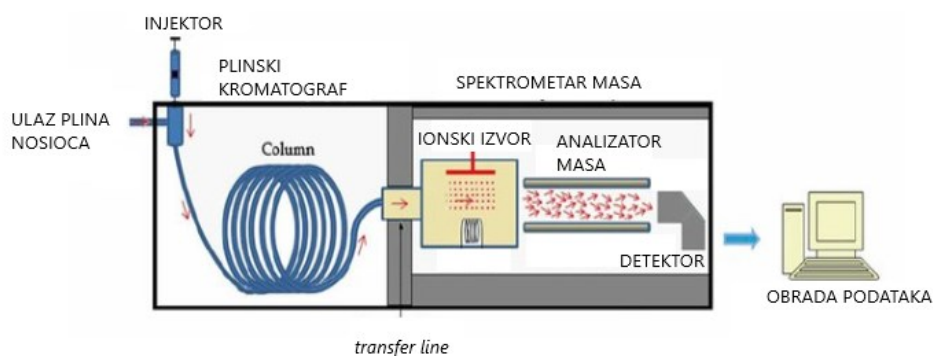
Tablica 4. Identificirani hlapljivi spojevi u sirovoj brokuli nakon ekstrakcije tehnikama SPME, SDE i SAFE (preuzeto i prilagođeno prema Wieczorek i suradnici¹⁶)

Opis mirisa	Spoj	SAFE	SDE	SPME
sumporni, spaljeni	metantiol	+	+	+
trulež, kupus	dimetilsulfid	-	+	+
miris maslaca	2,3-butandion	+	+	+
užeglo, sumporni	2- i 3-metilbutanal	+	+	-
miris maslaca	2,3-pentandion	+	-	-
trava	heksanal	+	+	+
kupus, znojno	2- i 3-metilbutanska kiselina	+	-	+
trava, zeleno	3-heksen-1-ol	+	+	+
krastavac	(E)-2-nonenal	+	+	+
juha	(E)-2-dekenal	+	+	-

3.2. Tehnike razdvajanja i identifikacije

3.2.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometar masa

Najčešće korištena tehnika u analizi hlapljivih spojeva svakako je mikroekstrakcija na čvrstoj fazi u kombinaciji s vezanim sustavom plinski kromatograf-spektrometar masa (GC-MS).⁵ Uzorak se unosi u injektor plinskog kromatografa gdje se analizirani spojevi nošeni plinom nosiocem razdvajaju na kapilarnoj koloni zbog različitih vremena zadržavanja te se dolaskom u detektor ioniziraju. Kvadrupolni analizator masa razdvaja nastale ione na temelju njihovih omjera mase i naboja te se mjeri ukupna ionska struja kao funkciju vremena (engl. *Total Ion Current*, TIC) ili intenzitet odabranih iona (engl. *Selected Ion Monitoring*, SIM). Kromatogram uzoraka hrane snimljen u TIC modu omogućava detekciju širokog raspona spojeva i najčešće je vrlo kompleksan, s pikovima velikih intenziteta. Međutim, zbog preklapanja mnogih pikova i loše rezolucije, kvantifikacija se često vrši snimanjem odabranih iona (SIM). Drugi način poboljšanja loše rezolucije jest i izdvajanje karakterističnih iona snimljenih u TIC-u (eng. *Ion extraction chromatography*, IEC ili *Extracted ion chromatogram*, EIC) te se kalibracija vrši na temelju njihovih intenziteta i vremena zadržavanja analita. Shema vezanog sustava GC-MS prikazana je na slici 4.

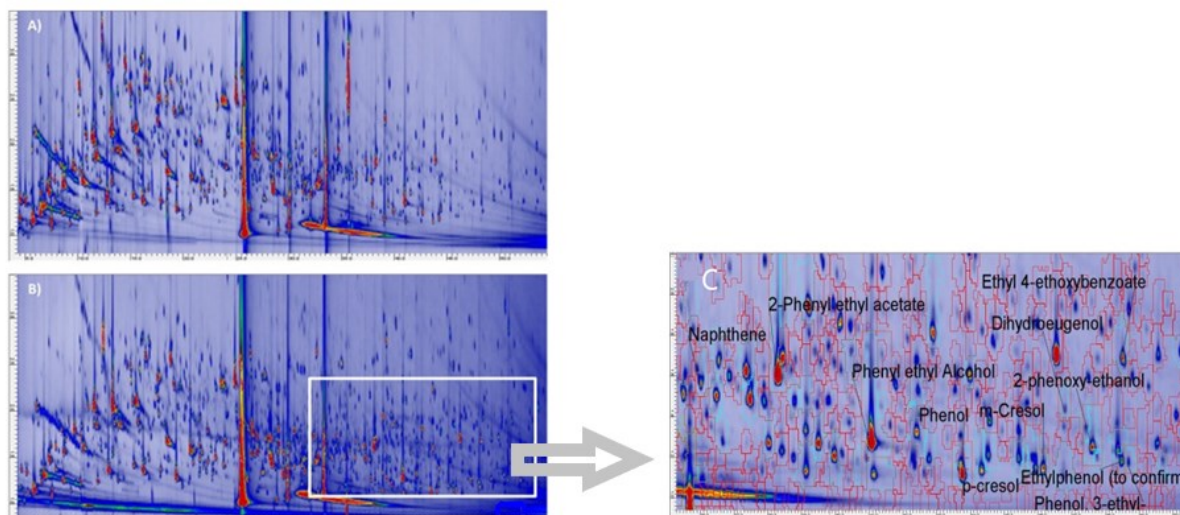


Slika 4. Shema vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar masa (preuzeto i prilagođeno prema Emwas i sur., 2015.¹⁷)

3.2.2. Dvodimenzionalna plinska kromatografija (GC×GC)

Dodatan napredak postignut je primjenom dvodimenzionalne plinske kromatografije.³ Bolje razdvajanje analita i veća osjetljivost omogućili su točnije određivanje aromatskog profila kompleksnih matrica kao što su uzorci hrane i detekciju analita u tragovima. Ovaj sustav koristi dvije kolone različitih selektivnosti koje su povezane posebnim sučeljem, tzv. modulatorom. Nakon razdvajanja na prvoj koloni, modulator skupljene frakcije periodički injektira u drugu kolonu gdje se sastojci dodatno razdvajaju. Signali prikupljeni detektorom prikazuju se u obliku ravnine određene dvjema osima koje prikazuju vremena zadržavanja spojeva na prvoj i drugoj koloni. Dvodimenzionalna plinska kromatografija u analizi aroma najviše se primjenjuje uz analizador vremena leta (engl. *Time-of-flight*, TOF).

Sveobuhvatna plinska kromatografija bila je korisna u otkrivanju spojeva koji su odgovorni za nepoželjan dimljeni okus kakaa koji nastaje nepravilnom obradom.¹⁸ Analiti su ekstrahirani mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi te analizirani tehnikom GC×GC-ToF. Određeni su i uspoređeni dvodimenzionalni profili hlapljivih spojeva u uzorcima koji su imali nepoželjan okus s onima koji nisu (slika 5). Usporedbom navedenih uzoraka otkriveno je kako kakao nepoželjnog okusa sadrži 56 hlapljivih spojeva u većoj koncentraciji, od čega njih 10-ak doprinosi dimljenom okusu (naftalen, fenoli, esteri i alkoholi).



Slika 5. 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) (Preuzeto i prilagođeno prema Perottia i sur., 2020.¹⁸)

3.2.3. Identifikacija i kvantifikacija spojeva analiziranih tehnikom GC-MS

Identifikacija spojeva razdvojenih plinskom kromatografijom vrši se usporedbom dobivenih spektara masa i indeksa zadržavanja (engl. *retention index*, RI) s onima dostupnima u bazama podataka (*National Institute of Standards and Technology*, NIST). Pri tome treba voditi računa da se uspoređuju indeksi zadržavanja određeni na istoj vrsti kolone i pri istoj temperaturi. Također, koriste se dostupni referentni spojevi (standardi) te se uspoređuju vremena i spektri masa standarda i analita. Pri identifikaciji mogu se računati i Kovatsevi indeksi koji se određuju relativno u odnosu na vremena zadržavanja homolognog niza n-alkana.

Količina hlapljivih tvari u uzorcima hrane identificiranih tehnikom GC-MS može se odrediti kvantitativno ili semikvantitativno. Ukoliko se utvrđuje aromatski profil ili se promatraju razlike u količini određenih aroma u različitim uzorcima, najčešće se provodi semikvantitativna analiza. U tom slučaju rezultati se izražavaju kao površina integriranog pika (obično relativno prema površini unutrašnjeg standarda) ili kao udio površine jednog pika u ukupnoj površini integriranih pikova svih identificiranih hlapljivih tvari.⁵ Kao unutrašnji standard odabire se referentni spoj svojstava sličnih analitu ili se primjenjuje tehnika izotopnog razrjeđenja (engl. *stable isotope dilution analysis*, SIDA) u kojoj se kao unutarnji

standardi koriste stabilni oblici molekule analita obilježenih izotopom (^{13}C , ^2H , ^{15}N). Međutim, točna i precizna kvantifikacija ključnih mirisnih komponenti zahtjevan je proces zbog velikih razlika u njihovoj koncentraciji, hlapljivosti i kemijskoj stabilnosti što hlapljive frakcije čini iznimno kompleksnima.⁴ Jedna od metoda točne kvantifikacije jest pomoću vanjske kalibracije, odnosno kalibracijskih krivulja pripremljenih standardnih otopina. S obzirom na kompleksnost matrice pri analizi hrane, kalibracija se često radi u modelnim matricama koje svojim sastavom oponašaju sastav uzorka. Vanjska kalibracija se može izvoditi u TIC ili SIM načinu, a također se može primijeniti i IEC način rada.

3.2.4. Tehnike direktne spektrometrije masa³

Iako je GC-MS referentna za analizu hlapljivih tvari, za brzu detekciju hlapljivih organskih spojeva u tragovima koriste se tehnike direktne spektrometrije masa (ili spektrometrija masa u realnom vremenu). Razvijene su iz potrebe za bržim i jednostavnijim tehnikama koje su se pokazale korisnim alatom za praćenje otpuštanja aroma tijekom skladištenja, prerade hrane kao i oslobađanje aroma tijekom konzumiranja hrane u realnom vremenu. Npr. profil arome tijekom kuhanja ili dok potrošači žvaču hranu značajno se mijenja te su potrebne tehnike za mjerenje sastava arome u takvim dinamičnim uvjetima. Ove tehnike nisu invazivne i daju brzi analitički odgovor bez potrebe za prethodnom pripremom uzorka. Uzorak se u plinovitom stanju uvodi direktno u sustav i odmah analizira, bez prethodnog kromatografskog odjeljivanja. Tehnike se temelje na blagoj kemijskoj ionizaciji (1-2 eV) zbog čega ne dolazi do jake fragmentacije, za razliku od jake ionizacije elektronima pri energiji od 70 eV. Molekule analita ioniziraju se posredno, pomoću molekula plina reagensa koje se prve ioniziraju jer se nalaze u suvišku. Najčešće primjenjivane tehnike direktne spektrometrije masa u analizi hlapljivih spojeva u hrani su:

- a) Spektrometrija masa uz kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*, APCI-MS)
- b) Spektrometrija masa uz ionizaciju prijenosom protona (engl. *Proton transfer reaction mass spectrometry*, PTR-MS)
- c) Spektrometrija masa uz ionizaciju izabranim protokom iona (engl. *Selected ion flow tube mass spectrometry*, SIFT-MS)

U APCI-MS tehnici, analit se uvodi u ionski izvor (elektroda) u kojem se proizvode elektroni koji ioniziraju molekule u plinovitoj fazi pri atmosferskom tlaku. Za razliku od APCI-MS, kod PTR-MS i SIFT-MS ne dolazi do direktne ionizacije molekula analita u ionskom izvoru, nego su stvaranje iona prekursora reagensa i ionizacija analita pojedinačno kontrolirani i prostorno odvojeni procesi što dovodi do stalnih i dobro definiranih uvjeta u reakcijskim ćelijama (protočna cijev u SIFT-MS i protočna sudarna cijev u PTR-MS). Kao ionski izvor u PTR-MS služi šuplja katoda, a molekule analita ioniziraju se reakcijom s H_3O^+ ionima koja uključuje prijenos protona. To se može prikazati reakcijom¹⁹:



gdje R predstavlja molekulu analita, a k je konstanta ravnoteže reakcije. Kod SIFT-MS tehnike smjesa iona reagensa (H_3O^+ , NO^+ i O_2^+) generira se mikrovalnim pražnjenjem. Ioni se filtriraju kvadrupolnim analizatorom masa i injektiraju u struju inertnog plina nosioca gdje reagiraju s molekulama analita. Usporedba tehnika direktne spektrometrije masa dana je u tablici 5.

Tablica 5. Glavne značajke tehnika direktne spektrometrije masa primjenjivanih u analizi hlapljivih spojeva u hrani (preuzeto i prilagođeno prema Taylor i sur., 2021.²⁰)

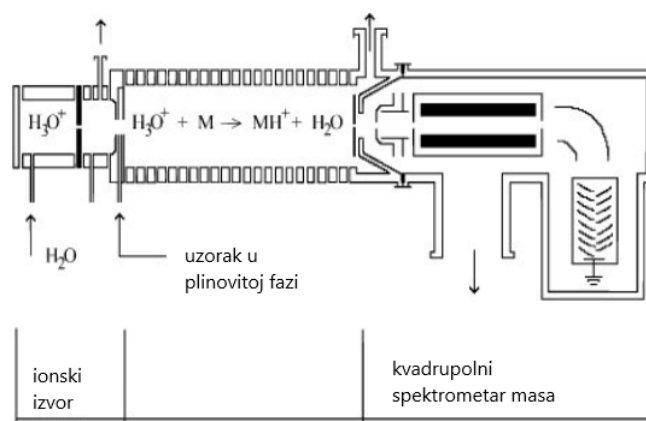
	APCI-MS	PTR-MS	SIFT-MS
Ionski izvor	elektroda	šuplja katoda	mikrovalno pražnjenje
Ion reagens	$(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$	H_3O^+ (NO^+ , O_2^+)	H_3O^+ (NO^+ , O_2^+)
Naboj iona	+/-	+	+/-
Plin	dušik	zrak	dušik ili helij
Reakcijska ćelija	unutar elektrode	protočna sudarna cijev	protočna cijev
Analizator masa	kvadrupol, trostruki kvadrupol	kvadrupol, ToF	kvadrupol

Proučavanje kinetike ovih reakcija omogućilo je brzo određivanje apsolutnih te vrlo niskih koncentracija analita u realnom vremenu. Reakcija (1) moguća je samo ukoliko analit ima veći afinitet prema protonima od vode, zbog čega će H_3O^+ stupati u reakcije samo s

analiziranim hlapljivim organskim spojevima, ali ne i s drugim sastojcima zraka (O_2 , N_2 ...). Zbog blage ionizacije gotovo uopće ne dolazi do fragmentacije pa analit u obliku molekulskog iona ubrzan električnim poljem dolazi do analizatora masa (najčešće kvadrupolni ili analizator vremena leta, engl. *Time-of flight*, TOF). Zbog niske koncentracije analita u tragovima, može se pretpostaviti da se koncentracija H_3O^+ iona ne mijenja te da vrijedi sljedeća jednadžba¹⁹:

$$[RH^+] = [H_3O^+] \left(1 - e^{-k[R]t}\right) \approx [H_3O^+] [R]kt \quad (2)$$

Iz jednadžbe je vidljivo da se koncentracija analita $[R]$ može izračunati na temelju izmjerenih koncentracija reaktanta i produkta, vremena reakcije i poznate vrijednosti konstante ravnoteže. Shema PTR-MS instrumenta prikazana je na slici 6.



Slika 6. Shema PTR-MS (preuzeto i prilagođeno prema Amann i sur.²¹)

Na ovaj način omogućena je brza i osjetljiva kvantifikacija (pptv reda veličine) u realnom vremenu. Određuje se apsolutna koncentracija analita bez primjene kalibracijske krivulje. Za razliku od GC-MS tehnike, nije potrebna priprema uzorka niti razdvajanje sastojaka uzoraka. Međutim, PTR-MS je jednodimenzionalna tehnika i poznavanje samo nominalne mase često nije dovoljno za nedvosmislenu identifikaciju spoja. Stoga, potpuna identifikacija dobivenih pikova najčešće nije cilj analize ovom tehnikom nego se usmjerava na određivanje karakterističnog profila i brzu klasifikaciju uzoraka određene vrste hrane što je vrlo korisno tijekom praćenja brzih procesa u prehrambenoj industriji, razlikovanja autentičnog od neautentičnog proizvoda, praćenja geografskog podrijetla itd. Pri tome se PTR-MS tehnike često

kombiniraju sa senzorskim, a podatci se obrađuju statističkim metodama, poput analize glavnih komponenti (PCA) i diskriminantne analize metodom najmanjih kvadrata (PLS-DA). Taiti i sur.²² su primjenom PTR-ToF-MS uz senzornu analizu 792 uzorka maslinovog ulja te statističkom obradom dobivenog skupa podataka odredili karakteristične otiske i model za razlikovanje lažno deklariranog ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Također, PTR-MS postaje referentni alat za *in vivo* mjerenja otpuštanja mirisa tijekom konzumacije hrane, odnosno analizu izdahnutog zraka (engl. *nose-space measurement*). Charles i suradnici²³ navedenu su tehniku koristili kako bi pratili kinetiku otpuštanja spojeva odgovornih za aromu tijekom konzumacije kave i povezanost sa senzorskim odgovorom, dok su Mayr i suradnici²⁴ PTR-MS primijenili za praćenje hlapljivih spojeva u mesu tijekom skladištenja kako bi detektirali kvarenje mesa.

3.2.5. Plinska kromatografija-spektrometrija ionske pokretljivosti (GC-IMS)

Od ostalih tehnika za analizu hlapljivih spojeva, u posljednje vrijeme sve se više koristi i spregnuti sustav plinska kromatografija-spektrometrija ionske pokretljivosti (engl. *Gas chromatography-Ion mobility spectrometry*, GC-IMS). GC-IMS je moćna tehnika za detekciju hlapljivih organskih spojeva, zahvaljujući svojoj brzini, robustnosti i jednostavnosti rukovanja. Također, ovom tehnikom mogu se razlikovati izomeri što nije moguće GC-MS analizom u slučaju kada spojevi koeluiraju. Tijekom analize smjese hlapljivih spojeva, analiti se prvo odjeljuju na koloni plinskog kromatografa, a zatim u spektrometru ionske pokretljivosti unutar sudarnih ćelija. Molekule analita se ioniziraju elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*, ES) ili matricom potpomognutom ionizacijom uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI). Nastali se ioni unutar sudarne ćelije gibaju pod utjecajem električnog polja i sudaraju s molekulama inertnog plina. Veličina koje daje prosjek svih geometrijskih orijentacija i tipova interakcija ion-plin tijekom eksperimenta naziva se sudarnim presjekom (Ω), a vrijeme koje ioni provedu unutar sudarne ćelije sudarnim vremenom (engl. *drift time*, DT).⁷ Veći sudarni presjek označava i veće sudarno vrijeme. Identifikacija se vrši usporedbom eksperimentalno određenih indeksa zadržavanja i sudarnih vremena sa standardima u bazama podataka. Indeksi zadržavanja određuju se relativno u odnosu na vremena zadržavanja homolognog niza n-ketona. GC-IMS najčešće se primjenjuje u svrhu klasificiranja uzoraka budući da se određuje karakterističan profil nekog uzorka te točna identifikacija svakog pika nije potrebna.

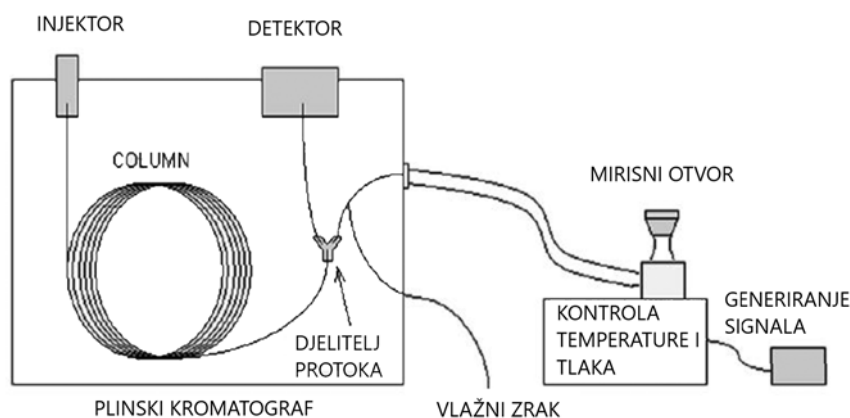
Povezivanjem ove tehnike sa spektrometrijom masa omogućena je kvantitativna analiza i šire područje primjene. U nedavnom istraživanju, Li i suradnici²⁵ ispitivali su profil aroma u koncentriranoj rajčici tehnikama GC-MS, GC × GC-TOF-MS i GC-IMS uz senzornu karakterizaciju olfaktometrom. Hlapljivi spojevi su ekstrahirani tehnikama SAFE i *headspace* (analiza para iznad uzorka). Ukupno su identificirana 274 hlapljiva spoja, od čega je 87 % identificirano tehnikom GC×GC-O-TOF-MS, dok su neki od spojeva prvi put identificirani tehnikama GC×GC-O-TOF-MS i HS-GC-IMS. Senzorskom analizom pomoću olfaktometra, pokazalo se kako β -damaskenon, linalol, 3-etilbutanska kiselina i nonanal najintenzivniji odoransi.

3.3. Senzorna karakterizacija

Veliki iskorak u analizi mirisa postignut je spregom plinske kromatografije i olfaktornih tehnika čime je omogućeno razlikovanje mirisno aktivnih od neaktivnih spojeva na temelju njihove količine u analiziranoj matrici. Senzorna karakterizacija hlapljivih tvari razdijeljenih na koloni plinskog kromatografa obavlja se primjenom instrumentalnih tehnika koje su kombinacija analitičke i senzorske tehnike, što znači da uz standardni detektor (najčešće spektrometar masa) koriste detektor koji se temelji na ljudskim osjetilima (olfaktometrijska jedinica ili elektronski nos).

3.3.1. Plinska kromatografija-olfaktometrijska jedinica (GC-O)

Sprega plinske kromatografije i olfaktometrijske jedinice (engl. *gas chromatography-olfactometry*, GC-O) razvijena je kako bi se u mnoštvu identificiranih hlapljivih tvari prepoznali spojevi koji imaju značajan utjecaj na aromu u analiziranom uzorku. Ova kombinacija analitičke i senzorske tehnike koristi ljudski nos kao najosjetljiviji i najselektivniji detektor, a detekcija mirisnih tvari vrši se njušenjem spojeva eluiranih s kromatografske kolone u posebnom dijelu uređaja, tzv. mirisnom otvoru (slika 5.). Analizu vrše obučeni panelisti koji bilježe vrijeme osjeta mirisa, kvalitativno ga opisuju i određuju njegov intenzitet. Prvi GC-O instrument izumili su 1964. Fuller i suradnici, a kasnije je poboljšan miješanjem eluiranih spojeva s vlažnim zrakom ili inertnim plinom prije detektiranja olfaktometrom.²⁶ Slika 7. prikazuje shemu vezanog sustava GC-O.

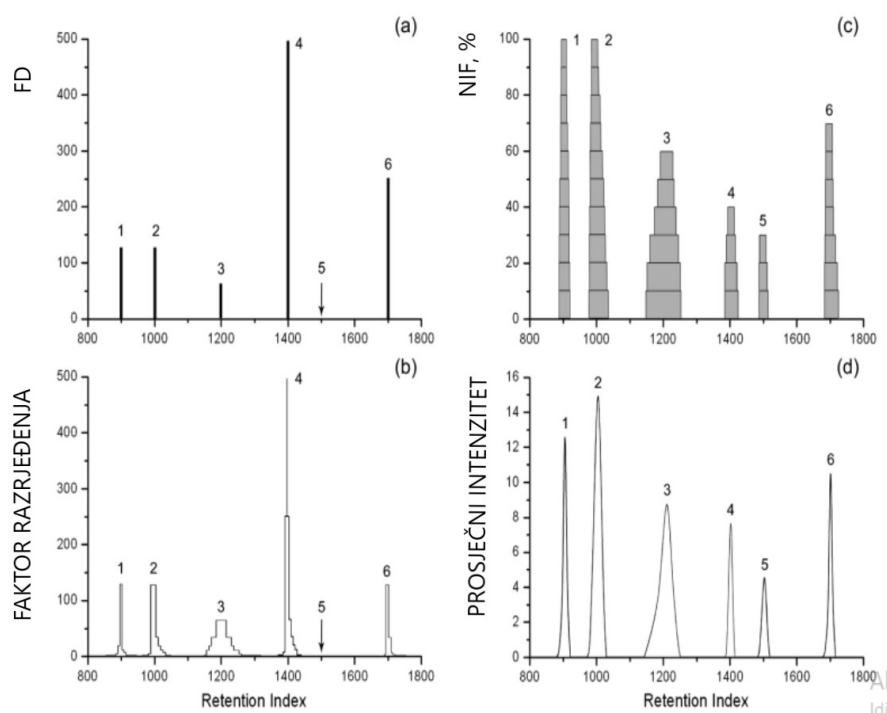


Slika 7. Shema vezanog sustava plinski kromatograf-olfaktometrijska jedinica
(preuzeto i prilagođeno prema Bratolli i sur.²⁷)

Ukoliko se uz olfaktometrijsku jedinicu koristi i maseni detektor, eluat s kromatografske kolone dijeli se na dva dijela te se detektira paralelno s oba detektora. Međutim, vremena zadržavanja analita ne moraju se podudarati budući da maseni detektor koristi vakuum, a olfaktometrijski se spojevi identificiraju pri atmosferskom tlaku. Kako bi se to izbjeglo, može se instalirati tzv. restriksijska kapilara malog promjera prije masenog spektrometra čime se povećava pad tlaka između sučelja i djelitelja toka. Spojevi se identificiraju na temelju spektara sadržanih u bazama podataka te usporedbom spektara masa, indeksa zadržavanja i opisa spojeva referentnih standarda. Ovakav vezani sustav plinski kromatograf-spektrometar masa-olfaktometrijska jedinica (GC-MS/O) općenito je najčešće korištena spregnuta analitička tehnika za analizu aroma koja nalazi primjene u mnogim aspektima analize hrane kao što su brzo mapiranje spojeva i klasificiranje spojeva odgovornih za aromu (klasterska analiza), identifikacija ključnih mirisnih spojeva, povezivanje odoransa s njihovim senzorskim svojstvima, kao i određivanje mehanizma nastajanja važnih odoransa.²⁸

Uz pojam mirisnog kapaciteta ili aktivnosti nekog odoransa vežu se tri veličine: prag mirisa, intenzitet kao funkcija koncentracije i kvalitativni opis. Prag mirisa (engl. *odor threshold*, OD) određenog hlapljivog spoja predstavlja njegovu najnižu koncentraciju koja se može detektirati osjetom mirisa, a određuju ga trenirani panelisti. Doprinos pojedinog odoransa aromi procjenjuje se metodama: analiza razrjeđenja ekstrakta arome (engl. *aroma extraction dillution analysis*, AEDA), kombinirana metoda temeljena na hedonističkom doživljaju (engl. *combined hedonic aroma response method*, CHARM), određivanje

specifičnog intenziteta mirisa (od grč. *osme* = miris, engl. *odor specific magnitude estimation*, OSME) te frekvencija detekcije (GC-SNIF).²⁶ AEDA i CHARM se temelje na određivanju granice detekcije (tj. pragu mirisa), GC-SNIF na učestalosti (frekvenciji) detekcije, a OSME na percipiranom intenzitetu. Jedna od uobičajenih tehnika određivanja granice detekcije jest AEDA kojom se određuje faktor razrjeđenja arome (FD) definiran kao razrjeđenje pri kojem niti jedan od panelista ne detektira miris. Spojevi s većim faktorom razrjeđenja više doprinose aromi uzorka. CHARM također koristi analizu razrjeđenja, uz dodatak da se detektira i trajanje mirisa pa se kao rezultat dobiju pravokutni signali. U tehnici OSME, panelist ocjenjuje intenzitet i vrijeme trajanja osjeta arome koristeći računalnu skalu vrijeme-intenzitet. Visina signala (pika) kod GC-SNIF metode odgovara broju panelista koji su detektirali miris i ta veličina se u literaturi označava s NIF (prema engl. *nasal impact frequency*); dok je površina pika umnožak NIF i vremena trajanja osjeta mirisa. Slika 8. prikazuje usporedbu signala za navedene aromagrame.



Slika 8. Usporedba rezultata za 6 komponenti u istom ekstraktu koristeći četiri različite metode tijekom analize vezanim sustavom plinska kromatografija-olfaktometrijska jedinica:

a) AEDA, b) CHARM, b) GC-SNIF i d) OSME
(preuzeto i prilagođeno prema Delahunty i sur.²⁹)

Nakon identifikacije i kvantifikacije spojeva koji definiraju aromu, mogu se izračunati njihove vrijednosti aktivnosti mirisa (engl. *odor activity value*, OAV) prema formuli (3):²⁶

$$OAV = \frac{\text{koncentracija odoransau uzorku}}{\text{prag mirisa}} \quad (3)$$

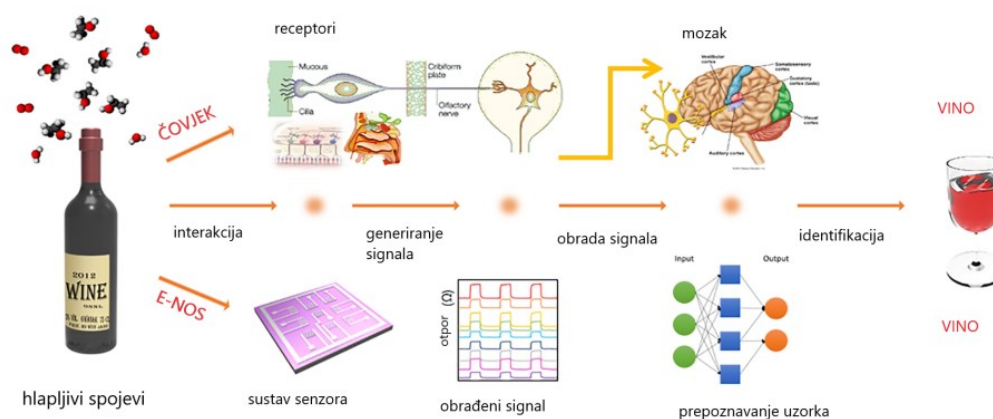
Veličina OAV uvedena je zbog činjenice da se praćenje ključnih molekula GC-O tehnikom temelji na njihovom pragu mirisa u zraku, a ne u matrici. Vrijednost OAV veća od 1 znači da taj spoj doprinosi mirisu. Iz formule je vidljivo da aroma određene hrane nije definirana samo koncentracijama ključnih odoransa, nego i o pragovima mirisa koji mogu varirati u rasponu od nekoliko redova veličine. GC-O je vrlo koristan alat u analizi aroma, ali treba imati na umu da se karakteristike jednog identificiranog spoja često teško mogu povezati s ukupnom aromom nekog kompleksnog sustava.

Niu i suradnici³⁰ proučavali su profil hlapljivih esterskih spojeva u pet vrsta vina od trešnje tehnikama GC-O (uz plameno-ionizacijski detektor) i GC-MS. Identificirana su 24 estera te je na temelju testova dodavanja i izostavljana pojedinih komponenti izabrano sedam ključnih spojeva koji su korišteni za daljnju senzorsku analizu i statističku obradu: etil acetat, etil butanoat, etil izovalerat, heksil acetat, etil oktanoat, etil dekanoat i metil salicilat. Određeni su pragovi mirisa navedenih spojeva tehnikom AEDA razrjeđivanjem spojeva u 9% etanolu te su izračunate i vrijednosti aktivnosti mirisa. Ustanovljeno je da svaki od sedam ključnih estera ima značajan efekt na voćni, cvjetni i slatki intenzitet arome, osobito etil dekanoat i metil salicilat koji su i u koncentracijama ispod praga mirisa doprinosili ukupnoj aromi.

3.3.2. Elektronski nos (E-Nose)

Elektronski nos, poznat i kao umjetni nos, temelji se na imitaciji ljudskog osjetila mirisa. Sastoji se od niza selektivnih elektrokemijskih senzora od kojih je svaki osjetljiv na određenu skupinu aroma (npr. aromatski spojevi, sulfidi itd.). One pobuđuju signalni uzorak karakterističan za određenu aromu (otisak prsta ili *fingerprint*) koji se zatim pomoću sustava za prepoznavanje uzoraka uspoređuje s referentnima u bazi podataka. Na taj način moguće je kategorizirati i prepoznati nepoznate arome. Unatoč nedostacima kao što su smanjena

osjetljivost u prisutnosti vlage ili visoke koncentracije neke komponente, nemogućnost dobivanja kvantitativnih podataka, ovo su instrumenti visoke osjetljivosti (ppt) koji pokazuju visoku korelaciju sa ljudskim senzornim panelom. Često su korišteni u prehrambenoj industriji za procjenu očuvanosti namirnice, detekciju nepoželjnih mirisa i potvrdu autentičnosti. Usporedba mehanizma djelovanja ljudskog i elektronskog nosa prikazana je na slici 9.



Slika 9. Usporedba mehanizma djelovanja ljudskog i elektronskog nosa (preuzeto i prilagođeno: https://www.ayfxl.com/?product_id=100250268_28, datum pristupa 2. travnja 2023.)

3.4. Statističke metode

Navedene instrumentalne tehnike omogućavaju prikupljanje velikog skupa podataka koje je potom potrebno pravilno analizirati statističkim metodama. Multivarijanta analiza koristi se kako bi se pronašli obrasci i uspostavila korelacija između uzoraka i različitih varijabli te između instrumentalnih i senzornih podataka. Najčešće upotrebljavane su analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA), diskriminantna analiza metodom najmanjih kvadrata (engl. *partial least squares*, PLS-DA) te analiza klastera (engl. *generalized procrustes analysis*, GPA).³ PCA metoda koristi sirove podatke kako bi opisala skup podataka. Pomoću ove metode mogu se uočiti grupiranje uzoraka, veze između varijabli i mjerenih uzoraka te detektirati odstupanja. PLS omogućava predviđanje jednog skupa podataka na temelju drugog, zbog čega se često koristi za istraživanje odnosa između

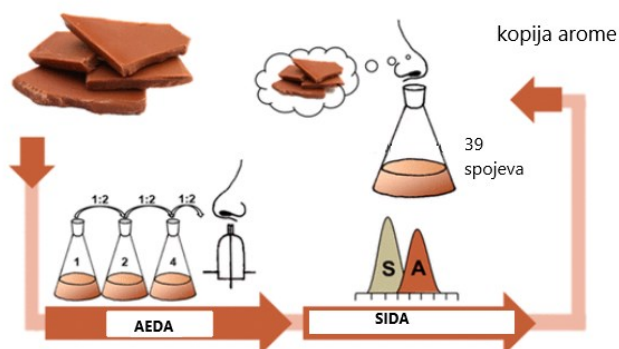
podataka dobivenih instrumentalnim i senzornim tehnikama. GPA izdvaja zajedničku strukturu iz više skupova podataka sastavljenih od neidentičnih varijabli. Ova metodologija se koristi za karakterizaciju i razlikovanje proizvoda s različitim svojstvima te je uobičajeni alat za statističku obradu podataka dobivenih tzv. profiliranjem slobodnim izborom (engl. *free choice profiling*, FCP) kod kojeg se od potrošača traži da identificiraju te ocijene kvalitetu i intenzitet određenih svojstava uzorka (npr. aroma) bez prethodnog treninga.

3.5. Volatolomika

Može se provoditi ciljana i ne-ciljana analiza hlapljivih tvari u prehrambenim proizvodima. Ciljana analiza pretpostavlja poznavanje ključnih odoransa koji doprinose aromi istraživanog prehrambenog proizvoda, a koristi se kako bi se ispitali ciljani spojevi, npr. nepoželjni mirisi u hrani. Neciljanom analizom utvrđuje se hlapljivi metabolom, što je jedan od koraka u tzv. senzomici. Senzomika (ili molekularna senzorna znanost), kao grana metabolomike predstavlja sistematični pristup čiji je cilj određivanje ključnih molekula u određenom uzorku hrane koji će uzrokovati karakterističan doživljaj određene vrste hrane (miris i okus).³¹ Hlapljivi metabolom prema tome predstavlja kompletan skup hlapljivih metabolita – organskih molekula male molekulske mase prisutnih u određenoj vrsti hrane, koje mogu reagirati s mirisnim receptorima. Analizom takvih hlapljivih organskih spojeva bavi se volatolomika (engl. *volatilomics*). Ovakav pristup razvijen je kako bi se dobio uvid u male molekule koje u kombinaciji doprinose jedinstvenim senzornim karakteristikama i ukupnoj aromi hrane. Flavoromika je nova disciplina usmjerena na povezivanje kemijskog sastava hrane s okusom primjenom tehnika omike, a uključuje primjenu senzomike i kemometričkih metoda. Sastoji se od nekoliko koraka: *i*) ekstrakcija hlapljivih spojeva, *ii*) instrumentalna i senzorna analiza (GC-O uz AEDA) i izolacija spojeva koji doprinose mirisu, *iii*) nedvojbeno identifikacija ključnih odoransa pomoću tehnika spektrometrije masa, *iv*) kvantificiranje odoransa (SIDA tehnika, unutarnji i vanjski standardi) te određivanje vrijednosti aktivnosti mirisa (OAV), *v*) validacija analitičkih i senzornih podataka rekonstruiranjem aroma na temelju izračunatih koncentracija odoransa u uzorku hrane i testovima izostavljanja pojedinih komponenti (engl. *omission experiments*) te usporedba s autentičnom aromom, *vi*) testovi koji uključuju određivanje individualnih razlika u osjetilnoj percepciji, *vii*) identificiranje parova odorans – kemosenzor te na kraju *viii*) istraživanje različitih parametara koji utječu na aromu tijekom procesa proizvodnje i skladištenja s ciljem poboljšanja proizvoda. Ovaj pristup

označava senzomički potpomognuto prehrambeno inženjerstvo (engl. *sensomics-assisted food engineering*). Na ovaj način ustanovljeno je kako je potrebna potpuna analitička pokrivenost i točna kvantifikacija cjelokupnog volatoloma kako bi se u potpunosti kreirao kompleksni doživljaj određene hrane. Izostavljanje samo jednog ključnog mirisa ili netočna koncentracija jedne ili više hlapljivih tvari u mješavinama mirisa izaziva značajna odstupanja u percepciji arome.

Fricke i suradnici³¹ koristili su senzomički pristup u određivanju spojeva ključnih za kremastu aromu mliječne čokolade. Hlapljivi spojevi su ekstrahirani SAFE tehnikom te se destilat analizirao GC-O tehnikom uz plamenoionizacijski detektor. Analizom razrjeđenja ekstrakta arome određeni su faktori razrjeđenja ukupno 48 odoransa. Najveći faktor razrjeđenja (FD) pokazali su feniloctena kiselina (aroma meda) i vanilin. Za analizu spojeva korištene su četiri tehnike spektrometrije masa: HS-GC/MS (statička *headspace* tehnika) za analizu metantiola kao izrazito hlapljivog spoja te GC-MS, dvodimenzionalna GC-MS/O i GC×GC-ToF/MS za analizu ostalih spojeva. Upotrebom tehnike izotopnog razrjeđenja (SIDA) kvantificirano je ukupno 40 odoransa te su im izračunate vrijednosti aktivnosti mirisa pri čemu su najveće vrijednosti imali dimetil trisulfid (miris kupusa) i butanska kiselina (OAV>170). Napravljena je kopija arome pomoću referentnih standarda odgovarajućih koncentracija koja je pokazala dobro slaganje s pravom aromom mliječne čokolade. Zaključeno je kako mliječnoj aromi doprinose najviše metantiol i laktoni koji su, u usporedbi s tamnom čokoladom, imali mnogo manje vrijednosti aktivnosti mirisa. Princip primijenjenog senzomičkog pristupa prikazan je na slici 10.



Slika 10. Princip senzomičkog pristupa u analizi mliječne čokolade

(preuzeto i prilagođeno prema Fricke i sur.²⁹)

§ 4. ZAKLJUČAK

Specifična aroma svakog prehrambenog proizvoda rezultat je karakteristične kombinacije hlapljivih organskih spojeva čiji je doprinos ukupnoj aromi određen njihovom koncentracijom i pragom mirisa. Određivanje aromatskog profila, identifikacija ključnih molekula koje doprinose ukupnoj aromi, kao i praćenje nepoželjnih mirisa glavni su ciljevi mnogih istraživanja vezanih uz analizu hrane. Točna i precizna kvantifikacija ključnih odoransa predstavlja veliki izazov zbog velikih razlika u njihovoj koncentraciji, hlapljivosti i kemijskoj stabilnosti. Ovaj proces obuhvaća nekoliko koraka, pri čemu je odabir tehnike ekstrakcije ključan dio. Najčešće primjenjivane tehnike su mikroekstrakcija na čvrstoj fazi te isparavanje mirisa potpomognuto otapalom. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa standardna je tehnika kojom se mogu identificirati i kvantificirati hlapljivi organski spojevi. Tehnike direktne spektrometrije masa, poput PTR-MS koriste se u svrhu određivanje karakterističnog profila i brzu klasifikaciju uzoraka hrane. Korištenje naprednih tehnika, poput dvodimenzionalne plinske kromatografije i spregnutih sustava kao što je sve popularnija plinska kromatografija-spektrometrija ionske pokretljivosti, omogućili su dodatan napredak u analizi hlapljivih spojeva u smislu boljeg razdvajanja analita, postizanja veće osjetljivosti i točnijeg određivanje aromatskog profila kompleksnih matrica hrane. Senzorna analiza i razlikovanje mirisno-aktivnih molekula od onih koje ne doprinose mirisu vrši se najčešće primjenom vezanog sustava plinska kromatografija-olfaktometrijska jedinica. Važan čimbenik u interpretaciji velikog skupa podataka i klasificiranju uzoraka hrane jest primjena odgovarajućih kemometričkih metoda. Uz postojeće propisane standardne postupke analize hlapljivih spojeva, očekuje se daljnji razvoj postojećih tehnika ekstrakcije i instrumentalnih analiza u smislu poboljšanja i minijaturizacije uređaja, skraćivanja vremena analize, automatizacije i postizanja veće osjetljivosti i selektivnosti.

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. C. Diez Simon, *Volatile characterization: Optimizing GC-MS methods to reveal the chemistry and aroma of savoury food ingredients*, Doktorski rad, Wageningen University, 2021, str. 14.
2. H. H. Jeleń, M. Majcher, M. Dziadaz, *Anal. Chim. Acta* **738** (2012) 13-26.
3. J. Regueiro, N. Negreira, J. Simal-Gándara, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57** (2017) 2112-2127.
4. A. Dunkel, M. Steinhaus, M. Kotthoff, B. Nowak, D. Krautwurst, P. Schieberle, Thomas Hofmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53** (2014) 7124-7143.
5. M. Starowicz, *Separations* **8** (2021) 158.
6. A. Mornar, I. Marinac-Anđić, D. Amidžić Klarić i J. Kovačić, *Kem. Ind.* **71** (2022) 639–652.
7. S. Louw, *Anal Sci Adv.* **2** (2021) 157–170.
8. C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, P. Rubiolo, *J. Chromatogr. A* **1184** (2008) 220–233.
9. C. Diez-Simon, B. Ammerlaan, M. van den Berg, J. van Duynhoven, D. Jacobs, R. Mumm, R. D. Hall, *J. Chromatogr. A* **1624** (2020) 46119.
10. S. Mascrez, E. Psillakis, G. Purcaro, *Anal. Chim. Acta* **1103** (2020), 106-114.
11. X. Zhang, C. Wang, L. Wang, S. Chen, Y. Xu, *J. Chromatogr. A* **1610** (2020) 460584.
12. E. Coelho, M. A Coimbra, J M F Nogueira, S. M Rocha, *Anal. Chim. Acta* **635** (2009), 214-221.
13. C. Franc, Frank David, G. de Revel, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3318-3327.
14. D. Kiyomichi, C. Franc, P. Moulis, L. Riquier, P. Ballestra, S. Marchand, S. Tempère, G. de Revel, *Food. Chem* **411** (2023) 135454.
15. L. M. Rosendo, A. T. Brinca, B. Pires, G. Catarro, T. Rosado, R. P. F. Guiné, A. R. T. S. Araújo, O. Anjos, and E. Gallardo, *Processes* **11** (2023), 243.
16. M. N. Wieczorek, M. Majcher, H. Jele, *Foods* **9(4)** (2020) 398.
17. A.-H. M. Emwas, Z. A. Al-Talla, Y. Yang, N. M. Kharbatia, u J. T. Bjerrum (ur.), *Metabonomics: Methods and Protocols*, Vol. 1277, Humana Press, 2015, str. 91.
18. P. Perotti, C. Corderoa, C. Bortolinib, P. Rubioloa, C. Bicchia, E. Libertoa, *Food. Chem.* **309** (2020) 125561.

-
19. F. Biasioli, C. Yeretdzian, F. Gasperi, T. D. Märk, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30** (2011) 968-977.
 20. A. J. Taylor, J. D. Beauchamp, V. S. Langford, u J. D. Beauchamp (ur.), *Dynamic Flavor: Capturing Aroma Using Real-Time Mass Spectrometry*, Vol. 1402, ACS Symposium Series, 2021, str. 1.
 21. A. Amann, K. Schwarz, G. Wimmer, V. Witkovský, *Meas. Sci. Rev.* **10** (2010) 180-188.
 22. C. Taiti, E. Marone, P. Fiorino, S. Mancuso, *Food control* **135** (2022) 108817.
 23. M. Charles, A. Romano, S. Yener, M. Barnabà, L. Navarini, T. D. Märk, T., F. Biasoli, F. Gasperi, *Food Res. Int.* **69** (2015) 9-20.
 24. D. Mayr, R. Margesin, F. Schinner, T. D Märk, *Int. J. Mass Spectrom.* **223** (2023) 229-235.
 25. X. Li, X. Zeng, H. Song, Y. Xi, Y. Li, B. Hui, H. Li, J. Li, *Food Chem.* **405** (2023) 13482.
 26. H. Song, J. Liu, *Food Res. Int.* **114** (2018) 187-198.
 27. M. Brattoli, E. Cisternino, P. Rosario Dambrosio, G. de Gennaro, P. Giungato, A. Mazzone, J. Palmisani, M. Tutino, *Sensors* **13** (2013) 16759-16800.
 28. P. Balakrishnan, S. Gopi (ur.), *Flavors and Fragrances in Food Processing: Preparation and Characterization Methods*, Vol. 1433, ACS Symposium Series, Washington DC, 2022, str. 1.
 29. C. M. Delahunty, G. Eyres, J-P. Dufour, *J. Sep. Sci* **29** (2006) 2107-2125.
 30. Y. Niu, P. Wang, Z. Xiao, J. Zhu, X. Sun, R. Wang, *Food Chem.* **275** (2019) 143-153.
 31. K. Fricke, P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.* **68** (2020), 12086–12095.