

Određivanje masnih kiselina GC-FID tehnikom

Boras, Dorja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:082268>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE MASNIH KISELINA GC-FID TEHNIKOM

DIPLOMSKI RAD

DORJA BORAS

Matični broj: 431

Split, listopad 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ODREĐIVANJE MASNIH KISELINA GC-FID TEHNIKOM

DIPLOMSKI RAD

DORJA BORAS

Matični broj: 431

Split, listopad 2024.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

DETERMINATION OF FATTY ACIDS BY GC-FID TECHNIQUE

DIPLOMA THESIS

DORJA BORAS

Parent number: 431

Split, october 2024.

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij kemije, smjer: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemije

Mentor: izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

ODREĐIVANJE MASNIH KISELINA GC-FID TEHNIKOM

Dorja Boras, 431

Sažetak: Masne kiseline sastoje se od ravnih lanaca s parnim brojem ugljikovih atoma s karboksilnom skupinom. Grade lipide, ključna su komponenta u membranama stanica te sudjeluju u prijenosu tvari i signala u stanicama živih bića. Masne kiseline mogu se podijeliti s obzirom na zasićenost. Zasićene masne kiseline sadržavaju isključivo jednostruke veze između ugljikovih atoma, dok nezasićene masne kiseline imaju jednu ili više dvostrukih veza. Višestruko nezasićene masne kiseline koje ljudski organizam ne može sam sintetizirati nazivaju se esencijalnim masnim kiselinama. To su linolna, linolenska i arahidonska masna kiselina te ih je potrebno unositi hranom. Od esencijalnih masnih kiselina se u organizmu stvaraju nizovi omega masnih kiselina koje su od iznimne važnosti za normalno funkcioniranje organizma. Masne kiseline određuju se u obliku njihovih metilnih estera te je u tu svrhu korištena smjesa 37 metilnih estera masnih kiselina kao standard. Metoda za odjeljivanje te kvalitativno i kvantitativno određivanje razvijena je korištenjem plinske kromatografije uz plamenoionizacijski detektor (GC-FID). Metoda preporučena od strane proizvođača kolone modificirana je i optimizirana promjenom temperaturnog programa kako bi se uspješno odijelilo 37 estera masnih kiselina. Ispitivani parametri vrednovanja metode (raspon, linearnost, granica dokazivanja i određivanja, točnost, ponovljivost, srednja preciznost te prikladnost sustava) pokazali su se zadovoljavajućima. Metoda je primijenjena i na uzorke jestivih ulja te standarde masnih kiselina. Rezultati realnih uzoraka ukazali su na važan korak pripreme uzorka te je uočeno da je nužno poboljšati korak esterifikacije masnih kiselina u uljima.

Ključne riječi: masne kiseline, plinska kromatografija, plamenoionizacijski detektor, vrednovanje

Rad sadrži: 57 stranica, 17 tablica, 25 slika, 18 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

- | | |
|---|-------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Ivana Škugor Rončević | predsjednik |
| 2. dr. sc. Azra Đulović, znanst. suradnik | član |
| 3. izv. prof. dr. sc. Franko Burčul | mentor |

Datum obrane: 28. listopada 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Graduate study in Chemistry, orientation: Organic Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Franko Burčul, PhD

DETERMINATION OF FATTY ACIDS BY GC-FID TECHNIQUE

Dorja Boras, 431

Abstract: Fatty acids consist of straight chains with an even number of carbon atoms with a carboxyl group. They build lipids, are a key component in cell membranes and participate in the transmission of substances and signals in the cells of living beings. Fatty acids can be divided according to saturation. Saturated fatty acids contain only single bonds between carbon atoms, while unsaturated fatty acids have one or more double bonds. Polyunsaturated fatty acids that the human body cannot synthesize on its own are called essential fatty acids. These are linoleic, linolenic and arachidonic fatty acids and must be consumed with food. From essential fatty acids, series of omega fatty acids are created in the body, which are extremely important for the normal functioning of the body. Fatty acids are determined in the form of their methyl esters, and for this purpose a mixture of 37 methyl esters of fatty acids was used as a standard. The method for separation and qualitative and quantitative determination was developed using gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). The method recommended by the column manufacturer was modified and optimized by changing the temperature program to successfully separate 37 fatty acid esters. The examined parameters of the evaluation of the method (range, linearity, limit of proof and determination, accuracy, repeatability, mean precision and suitability of the system) proved to be satisfactory. The method was also applied to edible oil samples and fatty acid standards. The results of real samples indicated an important step of sample preparation and it was observed that it is necessary to improve the step of esterification of fatty acids in oils.

Keywords: fatty acids, gas chromatography, flame ionization detector, validation

Thesis contains: 57 pages, 17 tables, 25 figures, 18 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

1. Assoc. Prof. Ivana Škugor Rončević, PhD
2. Scientific associate Azra Đulović, PhD
3. Assoc. Prof. Franko Burčul, PhD

Defence date: 28th October 2024.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof.dr.sc. Franka Burčula i neposrednim vodstvom Ane Vučak mag. chem. u razdoblju od srpnja do rujna 2024. godine.

Posebno se zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Franku Burčulu i asistentici Ani Vučak, mag. chem. na uloženom vremenu, angažmanu i dobroj atmosferi tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala obitelji, pogotovo djedu i baki, koji su me bezuvjetno voljeli i bodrili tijekom cijelog mog školovanja.

Hvala svim mojim prijateljima na riječima podrške, slušanju mojih žalopojki, zajedničkom nerviranju te svakom iskrenom zagrljaju i utjesi. Bez vas bi mi život pust i beznačajan, od srca vam hvala što postojite.

I na kraju želim se zahvaliti samoj sebi. Želim se samoj sebi zahvaliti što sam vjerovala u samu sebe iako je bilo trenutaka kad je to bilo jako teško, što sam odradila sav ovaj posao i nisam odustala, a ponajviše što sam u svakom trenutku ostala dosljedna samoj sebi.

Ovaj rad je u potpunosti financiran sredstvima projekta SEAFENNEL&MED (PRIMA 2021, Section 2; <https://seafennel4med.com/>).

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je razviti i vrednovati metodu za odjeljivanje te kvalitativno i kvantitativno određivanje masnih kiselina primjenom plinske kromatografije uz plamenoionizacijski detektor (GC-FID). Masne kiseline određuju se GC-FID tehnikom u obliku njihovih metilnih estera.

Razvoj metode uključuje optimizaciju kromatografskih parametara za odjeljivanje 37 metilnih estera masnih kiselina.

Vrednovanje metode za primjenu u kvantitativnoj analizi uključuje:

- Definiranje raspona i ispitivanje linearnosti
- Određivanje granica dokazivanja i određivanja
- Ispitivanje točnosti, ponovljivosti, srednje preciznosti i prikladnosti sustava

U konačnici metoda je korištena za analizu realnih uzoraka jestivih ulja: maslinovo, suncokretovo, bućino, kokosovo i riblje ulje.

SAŽETAK

Masne kiseline sastoje se od ravnih lanaca s parnim brojem ugljikovih atoma s karboksilnom skupinom. Grade lipide, ključna su komponenta u membranama stanica te sudjeluju u prijenosu tvari i signala u stanicama živih bića. Masne kiseline mogu se podijeliti s obzirom na zasićenost. Zasićene masne kiseline sadržavaju isključivo jednostruke veze između ugljikovih atoma, dok nezasićene masne kiseline imaju jednu ili više dvostrukih veza. Višestruko nezasićene masne kiseline koje ljudski organizam ne može sam sintetizirati nazivaju se esencijalnim masnim kiselinama. To su linolna, linolenska i arahidonska masna kiselina te ih je potrebno unositi hranom. Od esencijalnih masnih kiselina se u organizmu stvaraju nizovi omega masnih kiselina koje su od iznimne važnosti za normalno funkcioniranje organizma.

Masne kiseline određuju se u obliku njihovih metilnih estera te je u tu svrhu korištena smjesa 37 metilnih estera masnih kiselina kao standard. Metoda za odjeljivanje te kvalitativno i kvantitativno određivanje razvijena je korištenjem plinske kromatografije uz plamenoionizacijski detektor (GC-FID). Metoda preporučena od strane proizvođača kolone modificirana je i optimizirana promjenom temperaturnog programa kako bi se uspješno odijelilo 37 estera masnih kiselina.

Ispitivani parametri vrednovanja metode (raspon, linearnost, granica dokazivanja i određivanja, točnost, ponovljivost, srednja preciznost te prikladnost sustava) pokazali su se zadovoljavajućima. Metoda je primijenjena i na uzorke jestivih ulja te standarde masnih kiselina. Rezultati realnih uzoraka ukazali su na važan korak pripreme uzorka te je uočeno da je nužno poboljšati korak esterifikacije masnih kiselina u uljima.

Ključne riječi: masne kiseline, plinska kromatografija, plamenoionizacijski detektor, vrednovanje

ABSTRACT

Fatty acids consist of straight chains with an even number of carbon atoms with a carboxyl group. They build lipids, are a key component in cell membranes and participate in the transmission of substances and signals in the cells of living beings. Fatty acids can be divided according to saturation. Saturated fatty acids contain only single bonds between carbon atoms, while unsaturated fatty acids have one or more double bonds. Polyunsaturated fatty acids that the human body cannot synthesize on its own are called essential fatty acids. These are linoleic, linolenic and arachidonic fatty acids and must be consumed with food. From essential fatty acids, series of omega fatty acids are created in the body, which are extremely important for the normal functioning of the body.

Fatty acids are determined in the form of their methyl esters, and for this purpose a mixture of 37 methyl esters of fatty acids was used as a standard. The method for separation and qualitative and quantitative determination was developed using gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). The method recommended by the column manufacturer was modified and optimized by changing the temperature program to successfully separate 37 fatty acid esters.

The examined parameters of the evaluation of the method (range, linearity, limit of proof and determination, accuracy, repeatability, mean precision and suitability of the system) proved to be satisfactory. The method was also applied to edible oil samples and fatty acid standards. The results of real samples indicated an important step of sample preparation and it was observed that it is necessary to improve the step of esterification of fatty acids in oils.

Key words: fatty acids, gas chromatography, flame ionization detector, validation

Sadržaj

UVOD	1
1.OPĆI DIO	2
1.1.Masne kiseline.....	2
1.1.1.Nomenklatura.....	2
1.2.Zasićene masne kiseline.....	3
1.3.Nezasićene masne kiseline.....	4
1.4.Polinezasićene masne kiseline	4
1.5.Kromatografija.....	7
1.5.1.Plinska kromatografija – GC.....	8
1.5.2.Plamenoionizacijski detektor – FID.....	10
1.6.Vrednovanje metode	10
2.EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
2.1.Korištene kemikalije	12
2.2.Priprema otopina	17
2.3.Optimizacija metode	21
2.3.1.Kolona.....	21
2.3.2.Početa metoda	21
2.3.3.Razvoj metode.....	22
2.4.Priprema realnih uzoraka za analizu	23
3.REZULTATI I RASPRAVA	25
3.1.Razvoj metode za odjeljivanje 37 masnih kiselina	25
3.2.Vrednovanje metode za kvantitativnu analizu	29
3.2.1.Linearnost.....	29
3.2.2.Točnost.....	31
3.2.3.Preciznost.....	33
3.2.3.1.Ponovljivost	33
3.2.3.2.Srednja preciznost.....	35
3.2.4.Prikladnost sustava.....	37
3.3.Analiza realnih uzoraka.....	40
4.ZAKLJUČAK	44
5.LITERATURA.....	45

UVOD

Masne kiseline sastoje se od ravnog ugljikovodičnog lanca s parnim brojem ugljikovih atoma i karboksilnom skupinom koja joj daje kiselost. Masne kiseline ključna su komponenta lipida prisutnima u živim organizmima. Zasićenim masnim kiselina sve su veze između atoma ugljika jednostruke, međutim ako su prisutne dvostruke veze kiselina je nezasićena i pokazuje veću reaktivnost.

Neke masne kiseline kao što su linolna ili α -linolenska kiselina odnosno ω -masne kiseline, naši organizmi ne mogu sami sintetizirati te ih je potrebno unositi prehranom. Takve masne kiseline nazivaju se esencijalnim masnim kiselinama.

Plinska kromatografija uz plamenoionizacijski detektor pogodna je tehnika za analizu masnih kiselina zbog svoje visoke učinkovitosti u razdvajanju komponenti.

Plinska kromatografija je tehnika analitičke kemije koja omogućava razdvajanje kemijskih tvari. Uzorak se transportira pokretnim plinovima (nepokretna faza) kroz kolonu koja je ispunjena krutim ili tekućim materijalom (stacionarna faza). Komponente s većim afinitetom za stacionarnu fazu sporije izlaze iz kolone i imaju veće vrijeme zadržavanja prema kojem se može identificirati određena komponenta.

Plamenoionizacijski detektor (FID) uređaj je koji se koristi u plinskoj kromatografiji za određivanje organskih spojeva zbog svoje visoke osjetljivosti te širokog raspona detekcije. Zahtijeva upotrebu plamena pomoću kojeg spaljuje organski spoj stvarajući ione i elektrone. Nastali ioni i elektroni skupljaju se tvoreći električnu struju koja je proporcionalna koncentraciji detektiranog spoja.

U ovome radu optimizirana je i vrednovana metoda korištenjem plinske kromatografije uz plamenoionizacijski detektor za kvalitativno i kvantitativno određivanje 37 masnih kiselina.

1. OPĆI DIO

1.1 Masne kiseline

Masne kiseline dugi su ugljikovodični lanci s karboksilnom skupinom na jednome kraju koja ih čini kiselima. Svi ugljikovi atomi potječu od acetata, odnosno C₂ građevne jedinice.^{1,2} Gotovo sve prirodne masne kiseline u stanicama imaju parni broj ugljikovih atoma, mogu biti zasićene i nezasićene te im je dvostruka veza gotovo uvijek u *cis* položaju. Duljine lanaca kreću se najčešće između C₁₂ i C₂₂, iako mogu ići do 80 ugljikovih atoma. Masne kiseline s jednim nezasićenim centrom obično su olefinski spojevi s *cis*-konfiguracijom i dvostrukom vezom, ali se dvostruke veze pojavljuju i na drugim položajima ili pak mogu imati *trans* konfiguraciju.² Kako bi se masne kiseline mogle u potpunosti definirati i razlikovati potrebno je učiniti slijedeće korake:

- odrediti duljinu osnovnog lanca i duljinu ogranaka, cikličkih molekula ili bilo kojih drugih funkcionalnih skupina
- odrediti broj, prirodu, konfiguraciju i položaj svih nezasićenih ugljikovih centara,
- odrediti prirodu, položaj i stereokemijsku konfiguraciju mogućih funkcijskih skupina.³

Brojne su uloge masnih kiselina u stanicama: služe kao gorivo u β -oksidaciji, dio su strukture membrana utječući na fluidnost i prijenos molekula kroz stanicu kao i na prijenos signala.² Masne kiseline imaju brojne komercijalne primjene, od jestivih ulja do proizvodnje sapuna, deterdženta i kozmetike.¹ Određeni proizvodi za njegu kože sadržavaju masne kiseline koje pomažu u održavanju zdravog izgleda i funkcije kože, dok se kapsule omega-3 masnih kiselina prodaju kao dodaci prehrani.¹

1.1.1 Nomenklatura

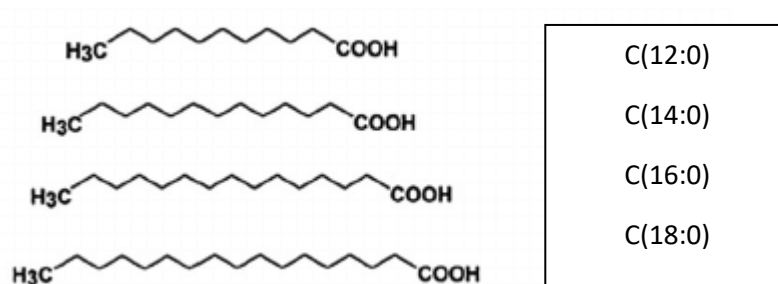
U strukturi masne kiseline, prvi atom ugljika koji se nalazi uz karbonilni ugljik naziva se α -ugljik, dok je sljedeći β -ugljik. Najudaljeniji ugljik od karboksilne skupine se naziva ω -ugljik.² Sustavni nazivi masnih kiselina temelje se na međunarodno prihvaćenim pravilima koja su odredili organski kemičari i biokemičari. Imena masnih kiselina definirana su sustavnim imenima prema nomenklaturi IUPAC-a ili svojim trivijalnim nazivima.⁴

Prema IUPAC-u, zasićeni nerazgranati lanci nazivaju se brojčanim prefiksom. Najmanji lanci, odnosno oni do C4 ugljika koriste prefikse svojih trivijalnih naziva (metan, etan, propan, butan), dok bi se za ostale koristili prefiksi koji predstavlja njihov broj ugljika. Primjerice, zasićena masna kiselina s 15 ugljikovih atoma naziva se pentadekanska masna kiselina. Dvostruke veze označavaju se „ Δ “ konfiguracijom predstavljajući udaljenost od karboksilnog ugljika. Položaji dvostrukih veza označeni su brojevima ispred naziva masne kiseline, pazeći da je osnovni lanac numeriran kako bi se dobio najmanji mogući broj za dvostruke veze. Ovisno o broju dvostrukih veza, u imenu masne kiseline završetak -an se zamjenjuje s -en te se dodaju prefiksi di-, tri-, tetra- i tako dalje. Stoga se npr. masna kiselina s 18 ugljikovih atoma i jednom dvostrukom vezom između devetog i desetog ugljika naziva oktadek-9-enoska kiselina. Trivijalna imena masnih kiselina najčešće potječu od botaničkog ili zoološkog podrijetla.⁵

Treći način imenovanja je skraćena nomenklatura gdje se masne kiseline označavaju slovom C koji predstavlja ugljik uz koji stoji broj ugljikovih atoma u masnoj kiselini iza čega slijedi dvotočka, zatim broj dvostrukih veza i položaj najbliže dvostruke veze na metilnoj strani. Npr. C18:0 predstavlja oktadekansku masnu kiselinu s osamnaest ugljikovih atoma bez dvostrukih veza. Također uz skraćeni opis u zagradama može se definirati pozicija prve dvostruke veze od omega kraja koristeći oznaku ω - . Ovaj način pomaže u jednoznačnom definiranju masnih kiselina koje se razlikuju samo po položaju jednakog broja dvostrukih veza.^{3,5}

1.2 Zasićene masne kiseline

Zasićene masne kiseline linearni su lanci s jednostrukim vezama među ugljikovim atomima. Jednolični cik-cak lanci zasićenih masnih kiselina se međusobno podudaraju i slažu jedan na drugog zbog čega imaju i više talište u odnosu na tališta nezasićenih masnih kiselina čije se molekule ne mogu uzajamno dobro pakirati zbog dvostruke veze. Primjeri struktura zasićenih masnih kiselina dane su na slici 1. a to su redom laurinska, miristinska, palmitinska i stearinska masna kiselina.^{2,4,5}



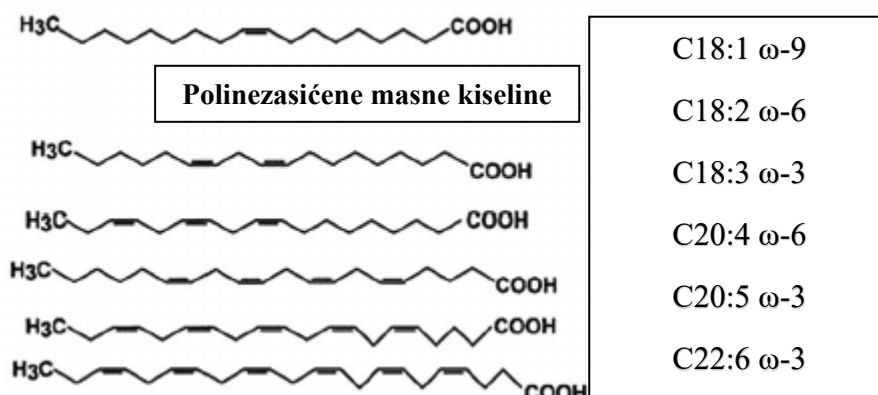
Slika 1. Zasićene masne kiseline

1.3 Nezasićene masne kiseline

Mononezasićene masne kiseline sadrže jednu dvostruku vezu odnosno dva vodikova atoma manje od odgovarajućih zasićenih masnih kiselina te prirodne masne kiseline imaju *cis*-konfiguraciju. Masne kiseline s *cis*-konfiguracijom imaju niže talište te su termodinamički manje stabilne od masnih kiselina s *trans*-konfiguracijom. Ovakvi lanci mogu se rasporediti u cik-cak-konformacije kao zasićene masne kiseline što rezultira višim talištima u odnosu na savijene lance kad je prisutna *cis*-konfiguracija dvostruke veze.^{2,5}

1.4 Višestruko nezasićene masne kiseline

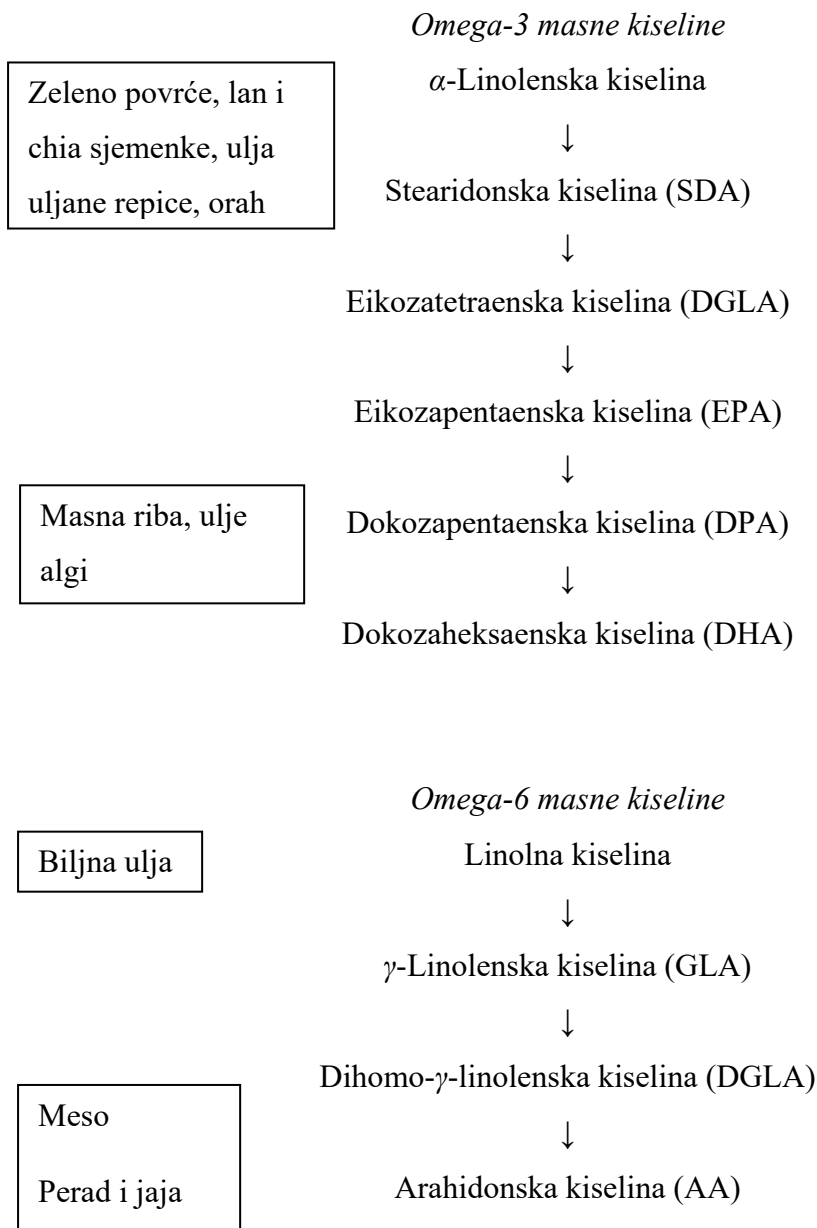
Višestruko nezasićene masne kiseline sadrže dvije ili više dvostrukih veza pri čemu su dvostruke veze odvojene metilenskim skupinama (slika 2). Prva dvostruka veza najčešće se može pronaći između trećeg i četvrtog ugljikovog atoma u odnosu na ω -ugljik pa se ove masne kiseline nazivaju i omega-3-masnim kiselinama.^{2,3}



Slika 2. Primjer struktura mono- i višestruko nezasićenih masnih kiselina

Ako se pak prva dvostruka veza nalazi između šestog i sedmog ugljika, odnosno devetog i desetog ugljika gledano od zadnjeg ugljikova atoma, onda je riječ o omega-6-masnim kiselinama, odnosno omega-9 masnim kiselinama. Omega-3 i omega-6 masne kiseline smatraju se i esencijalnim kiselinama jer ih ljudski organizam sam ne može sintetizirati budući da mu nedostaju enzimi $\Delta 12$ i $\Delta 15$ desaturaza koji omogućavaju umetanje *cis* dvostruke veze na n-3 ili n-6 mjesto u masnoj kiselini. Potrebno ih je nadomjestiti hranom bogatom omega-3 i omega-6 masnim kiselinama. Ove esencijalne masne kiseline tvore dvije klase spojeva – matična masna kiselina za omega-3 masne kiseline je linolna kiselina dok je za omega-6 masne kiseline to α -linolenska kiselina. U organizmu ove masne kiseline dovode do daljnjeg stvaranja dužih višestruko nezasićenih masnih kiselina prikazanih na shemi 1. Zbog niske učinkovitosti stvaranja eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske (DHA) masne kiseline iz α -linolenske kiseline preporuča se unos iz dodatnih izvora.^{5,6}

Shema 1. Izvori esencijalnih masnih kiselina⁶

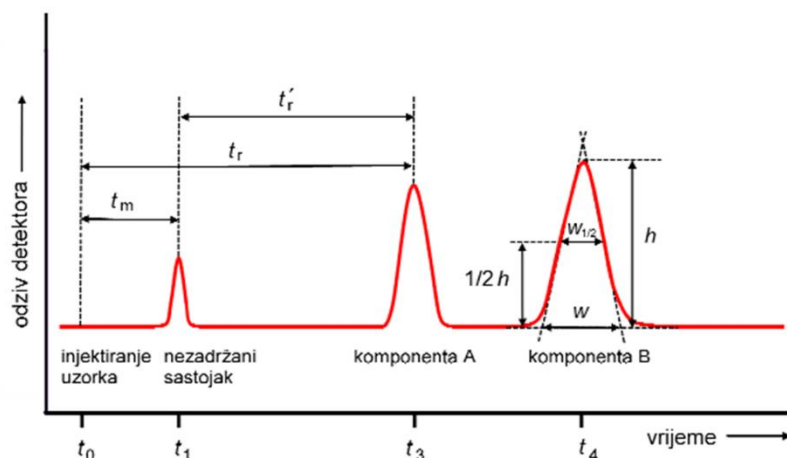


Za razliku od omega-3 i omega-6 masnih kiselina, omega-9 se ne klasificiraju kao esencijalne masne kiseline. Razlog tomu je što se u ljudskom organizmu mogu sintetizirati iz nezasićenih masnoća, ujedno ne mogu stvarati eikosanoide zbog manjka dvostruke veze na omega-6 položaju. Neke od omega-9 masnih kiselina su primjerice oleinska, elaidinska, gondoinska, nervonska kiselina i još brojne druge.⁶

1.5 Kromatografija

Kromatografija predstavlja fizikalnu metodu razdvajanja komponenata smjese s obzirom na njihovu različitu raspodjelu između stacionarne i mobilne faze koje mogu biti tekuća, plinovita ili čvrsta tvar. Raznolike fizikalno-kemijske karakteristike analita omogućavaju razdvajanje komponenti smjese s obzirom na različite afinitete prema stacionarnoj fazi. Odnos analita prema stacionarnoj fazi predstavljen je brzinama kretanja komponenti između dviju faza u kromatografskom sustavu.^{7,8,9}

Kromatogram je grafički prikaz odziva detektora (slika 3) koji se postavlja na izlazu kolone te predstavlja odnos koncentracije analita u eluatu prema volumenu mobilne faze ili prema vremenu. Odijeljene komponente mogu se odrediti prema položaju signala na vremenskoj osi, a količina koja je eluirala predstavlja površina ispod signala.^{7,8}



Slika 3. Kromatogram.⁷

Zadržano vrijeme t_m je važan parametar za kvalitativnu analizu, odnosno vrijeme prolaska nezadržane komponente kroz kolonu. Vrijeme od injektiranja uzorka do maksimalnog odziva detektora definira se kao ukupno vrijeme zadržavanja t_r svojstveno za svaku komponentu u smjesi. Zajedno se ova dva parametra koriste za računanje prilagođenog vremena zadržavanja t_r' koje opisuje vrijeme potrebnoj određenoj komponenti da pristigne na detektor nakon prethodnog dolaska nezadržane komponente. Širina kromatografske krivulje označava se s w dok širina na polovici njene visine ($w_{1/2}$) karakterizira razmak između tangenti.^{7,8}

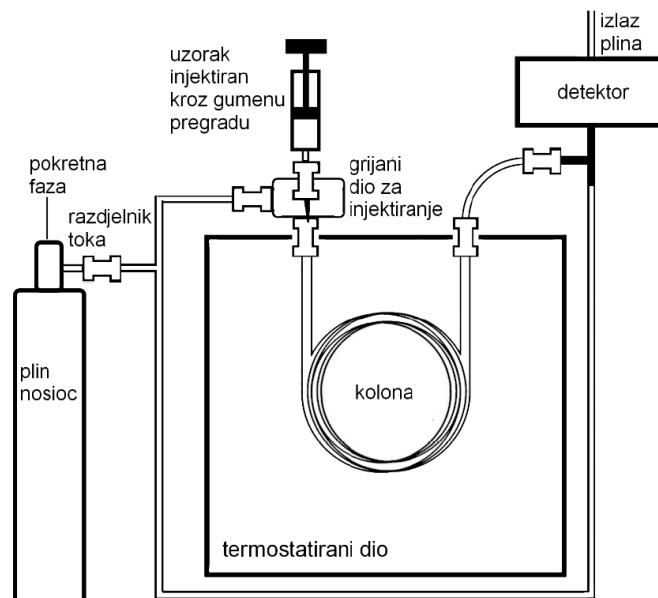
Razlučivanje (R_s) kvantitativna je mjera odjeljivanja signala dviju komponenti dana sljedećom jednačbom:

$$R_s = \frac{2 \times [t_r(A) - t_r]}{w_A + w_B}$$

Komponenta A kraće je zadržana komponenta što znači da brže eluira s kolone u odnosu na duže zadržavanu komponentu B, a da bi se postiglo uspješno odjeljivanje R_s mora biti veći od 1,5.⁸

1.5.1 Plinska kromatografija – GC

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) osjetljiva je instrumentna tehnika za odjeljivanje analita vrlo niskih koncentracija u plinovitom stanju. Primjenjiva je na brojne aromatske spojeve, eterična ulja, većinu otapala, pesticide i druge.^{7,9}



Slika 4. Shematski prikaz plinskog kromatografa⁷

Pokretnu ili mobilnu fazu čini kemijski inertan plin nosioc kao što su helij, argon ili dušik, koji prenosi uzorak od injektora kroz kolonu pa sve do detektora (slika 4). Nepokretna ili stacionarna faza može biti u krutom ili tekućem stanju. Uzorak se najprije injektira kroz gumenu pregradu te se, ako je u tekućem stanju, uzorak grije u *inletu* kako bi se preveo u plinovito agregatno stanje. Nadalje, uzorak s mobilnom fazom zadanom brzinom protoka

prolazi kroz kolonu pri čemu se komponente razdvajaju te dolaze do detektora spojenog na računalo na kojem se prikazuje kromatogram.^{7,8}

- **Injektor**

Danas se za injektiranja koriste automatski uzorkivači koji postižu bolju preciznost, ponovljivost i brzinu odnosno bolju kontrolu procesa. Svoju špricu uzorkivač ispire nekoliko puta u odabranom otapalu prije uzimanja zadane količine uzorka. Split /*splitless* injektori jedni su od najčešće korištenih injektora za tekuće uzorke. *Split* način rada ili djelomično injektiranje primjenjuje se za uzorke kojima je koncentracija analita veća od 100 µg/mL kako bi se postiglo što bolje razlučivanje. U ovom slučaju ovisno o zadanom omjeru raspodjele, unosi se samo jedan dio uzorka, a ostatak se ispušta. Potpuno injektiranje ili *splitless* način rada postavlja se za uzorke u kojima se analit nalazi samo u tragovima pa se time analizira čitav uzorak.⁸

- **Kolone**

Kromatografska kolona savijena u svitke i postavljena u termostatiranu peć služi za odjeljivanje komponenti uzorka. Komponente s većim afinitetom prema stacionarnoj fazi eluiraju sporije s kolone dok one s manjim afinitetom eluiraju brže. Bitno je osigurati da uzorak ostane u plinovitom stanju pa se postavlja otprilike jednaka temperatura kao temperatura vrelišta uzorka te temperatura peći raste brzinom od 4 °C/min do 20 °C/min kako bi se osiguralo otpuštanje jače zadržanih komponenti. Kolone za plinsku kromatografiju mogu biti kapilarne i punjene.⁸

Punjene kolone se koriste za uzorke u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju, duljine najčešće 2 m - 3 m s unutarnjim promjerom između 2 mm i 4 mm. Izrađeni su od stakla, aluminijske ili nehrđajućeg čelika s unutarnjim inertnim nosačem na kojemu je nanosena stacionarna faza odnosno polimer visokog vrelišta. U punjenim kolonama apliciran je visoki potisni tlak kako bi plin nosioc što učinkovitije prolazio kroz ovu kolonu.⁸

Kapilarne kolone su vrlo uske kolone unutarnjeg promjera 250 µm - 320 µm, ali veće duljine kolone koja može biti u rasponu 30 m - 100 m. Izrađene su od taljenog kvarca visoke čvrstoće s vanjskim stijenkama obloženih poliimidom. Ovakve kolone dosta su fleksibilne pa se mogu savijati u zavojnice ali mali unutarnji promjeri ograničavaju korištenje većih količina uzorka.⁸

1.5.2 Plamenoionizacijski detektor – FID

Eluirane komponente nakon prolaska kroz kolonu dolaze na detektor koji vrši njihovu identifikaciju i daje signal računalu. Obradom podataka stvara se kromatogram.¹¹

Plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionization Detector*, FID) pogodan je za identifikaciju brojnih organskih spojeva zbog svog širokog dinamičkog raspona i osjetljivosti. Ugljik-vodik veze detektiraju se primjenom plamena koji uzrokuje izgaranje komponenti i njihovo prevođenje u ione i elektrone zbog lakše identifikacije. Plamen se održava pomoću vodika i oksidansa koji podržava gorenje što je najčešće zrak i to u omjeru zrak : vodik = 10 : 1. Nastali elektroni i ioni privlače se na sabirnu elektrodu zbog stvaranja struje proporcionalne broju ugljika. Pojačavanjem strujnog toka nastaje signal koji se bilježi detektorom. Površina ispod signala izravno je proporcionalna koncentraciji pripadajućih komponenata.¹⁰

1.6 Vrednovanje metode

Vrednovanje analitičke metode proces je izvođenja raznolikih eksperimenata kako bi se potvrdilo da je analitička metoda prikladna za namjeravanu primjenu te da je sposobna pružiti adekvatne analitičke podatke. Ispitivanje valjanosti metode specifično je za svaki analit i tehniku te nije uvijek potrebno ispitati sve parametre.^{11,12}

Linearnost predstavlja mogućnost da se rezultati prikažu kao linearna funkcija koncentracije analita u uzorku. Linearno dinamičko područje je raspon u kojem dolazi do linearnog rasta signala povećanjem koncentracije analita.^{11,12}

Granica dokazivanja najniža je količina analita u uzorku koja se može dokazati ali ne i detektirati primijenjenom metodom.¹³

Granica određivanja najniža je količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću.¹³

Točnost analitičke metode predstavlja poklapanje između prihvaćene referentne vrijednosti i izmjerene vrijednosti.¹¹

Preciznost analitičke metode izražava blizinu poklapanja rezultata višestrukog mjerenja istog uzorka. Najčešće se promatra kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost metode.^{11,12}

Ponovljivost predstavlja preciznost metode pod istim radnim uvjetima u kratkome vremenskom intervalu.¹²

Srednja preciznost opisuje razlike u rezultatima uzrokovane promjenama različitih uvjeta u laboratoriju (npr. drugi dan, drugi analitičar).¹²

Obnovljivost pokazuje preciznost između različitih laboratorija.¹²

Prikladnost sustava očituje se uzastopnim mjerenjem iste otopine prikazujući raspon pogreške sustava i metode bez utjecaja analitičara.^{11,12}

2. EKSPERIMENTALNI DIO

Metilni esteri masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Methyl Esters*, FAME) vrsta su estera masnih kiselina koje se dobivaju transesterifikacijom iz biljnih ulja ili životinjskih masti. U ovome istraživanju korištena je smjesa 37 metilnih estera masnih kiselina masenih udjela između 2 % i 6 %. Kao otapalo odabran je heksan zbog dobre isparljivosti koja mu omogućuje ekstrakciju najveće količine ulja u najkraćem vremenskom roku, nepolarna priroda, niska toksičnost te pristupačnost. Svojstva korištenih kemikalija navedene su u tablici 1.

2.1. Korištene kemikalije

Tablica 1. Korištene kemikalije

Naziv	Sažeta strukturna formula	Relativna molekulska masa	CAS broj	Proizvođač	Čistoća
Heksan	C ₆ H ₁₄	86,18 g/mol	110-54-3	Honeywell	≥99%
FAME mix	C4-C24	/	18919-1AMPC	SUPELCO Sigma- aldrich	/*
Maslinovo ulje	C16:0, C18:1, C18:2, C18:3	/	/	ZVIJEZDA, ekstra djevičansko maslinovo ulje	realni uzorak
Riblje ulje	C20:5 (EPA), C22:6 (DHA)	/	/	dm Drogerie markt GmbH	realni uzorak
Suncokretovo ulje	C16:0, C18:1 <i>trans</i> , C18:2 <i>cis</i>	/	/	ZVIJEZDA	realni uzorak
Bučino ulje	C16:0, C18:1 <i>cis</i> , C18:2 <i>cis</i>	/	/	Uljara Agroprom Patrčević	realni uzorak
Kokosovo ulje	C8:0, C12:0, C14:0	/	/	dm drogerie markt GmbH	realni uzorak

*Navedeno u Tablici 2 za svaku komponentu smjese

Tablica 2. Popis masnih kiselina i pripadajućih estera^{14,15}

Masna kiselina	Trivijalno ime	Metilni ester	Oznaka	Maseni udio ± SD
Butanska kiselina	Maslačna kiselina	Metil-butirat	C4:0	3,26 ± 0,92
Heksanska kiselina	Kaprnska kiselina	Metil-heksanoat	C6:0	3,76 ± 0,28
Oktanska kiselina	Kaprilna kiselina	Metil-oktanoat	C8:0	3,99 ± 0,09
Dekanska kiselina	Kaprnska kiselina	Metil-dekanoat	C10:0	4,00 ± 0,07
Undekanska kiselina		Metil-undekanoat	C11:0	1,98 ± 0,04
Dodekanska kiselina	Laurinska kiselina	Metil-laureat	C12:0	3,98 ± 0,10
Tridekanska kiselina		Metil-tridekanoat	C13:0	1,99 ± 0,05
Tetradekanska kiselina	Miristinska kiselina	Metil-miristat	C14:0	3,99 ± 0,08
<i>cis</i> -9-tetradekanska kiselina	Miristoleinska kiselina	Metil-miristoleat	C14:1	2,00 ± 0,07
Pentadekanska kiselina	/	Metil-pentadekanoat	C15:0	1,99 ± 0,15
<i>cis</i> -10-pentadekanska kiselina	/	Metil-10-pentadekanoat	C15:1	1,98 ± 0,15
Heksadekanska kiselina	Palmitinska kiselina	Metil-palmitat	C16:0	5,95 ± 0,12
Heksadeka-9-enska kiselina	Palmitoleinska kiselina	Metil-palmitoleat	C16:1	2,00 ± 0,03
Heptadekanska kiselina	/	Metil-heptadekanoat	C17:0	1,98 ± 0,03
Heptadek-10-enska kiselina	/	Metil-heptadek-10-enoat	C17:1	2,00 ± 0,03
Oktadekanska kiselina	Stearinska kiselina	Metil-stearat	C18:0	3,99 ± 0,08
(Z)-oktadek-9-enska kiselina	Oleinska kiselina	Metil-oleat	C18:1 <i>cis</i> (n9)	3,98 ± 0,06
(E)-oktadek-9-enska kiselina	Elaidinska kiselina	Metil- <i>trans</i> -9-elaidinat	C18:1 <i>trans</i> (n9)	2,00 ± 0,04
(Z)-oktadeka-9,12-dienska kiselina	Linolna kiselina	Metil-linoleat	C18:2 <i>cis</i> (n6)	1,98 ± 0,05

(E)-oktadeka-9,12-dienska kiselina	α -linolelaidinska kiselina	Metil-linolelaidat	C18:2 <i>trans</i> (n6)	2,00 ± 0,05
Oktadeka-6,9,12-trienska kiselina	γ -linolenska kiselina	Metil-linolenat	C18:3 (n6)	1,98 ± 0,05
Oktadeka-9,12,15-trinska kiselina	α -linolenska kiselina	Metil-linolenat	C18:3 (n3)	1,98 ± 0,05
Eikosanska kiselina	Arahidinska kiselina	Metil-eikosoanoat	C20:0	3,99 ± 0,07
Eikosa-11-enska kiselina	Gondoinska kiselina	Metil-eikosa-11-enoat	C20:1 (n9)	2,00 V 0,04
Eikosa-11,14-dienska kiselina	/	Metil-eikosadienoat	C20:2	2,00 ± 0,15
Eikosa-8,11,14-trienska kiselina	/	Metil-eikosa-8,11,14-trienoat	C20:3 (n6)	2,00 ± 0,04
Eikosa-11,14,17-trienska kiselina	/	Metil-eikosa-11,14,17-trienoat	C20:3 (n3)	1,98 ± 0,04
Eikosa-5,8,11,14-tetraenska kiselina	Arahidonska kiselina (ARA)	Metil-eikosa-5,8,11,14-tetranoat	C20:4 (n6)	2,00 ± 0,04
Eikosa-5,8,11,14,17-pentaenska kiselina	Eikosapentaenska kiselina (EPA)	Metil-eikosapenta-5,8,11,14,17-enoat	C20:5 (n3)	1,98 ± 0,04
Heneikosanska kiselina	/	Metil-henikosanoat	C21:0	1,98 ± 0,16
Dokosanska kiselina	Behenska kiselina	Metil-behenat	C22:0	3,98 ± 0,09
Dokosa-13-enska kiselina	Eruka kiselina	Metil-erukat	C22:1 (n9)	1,99 ± 0,03
Dokosa-13,16-dienska kiselina		Metil-doksa-13,16-dienoat	C22:2	1,98 ± 0,04
Dokosa-4,7,10,13,16,19-heksaenska kiselina	Dokosaheksaenska kiselina (DHA)	Metil-dokosa-4,7,10,13,16,19-heksanoat	C22:6 (n3)	2,00 ± 0,06
Trikosanska kiselina	/	Metil-trikosanoat	C23:0	1,99 ± 0,05
Tetrakosanska kiselina	Lignocerinska kiselina	Metil-lignocerat	C24:0	3,97 ± 0,07
Tetrakosa-15-enska kiselina	Nervonska kiselina	Metil-nervonat	C24:1	2,00 ± 0,04

U nastavku teksta radi lakšeg snalaženja, koristit će se skraćene oznake masnih kiselina kod prikaza rezultata.

Korištena oprema i instrumenti:

- Analitička vaga
- Automatska pipeta Tacta 10 μ L - 100 μ L (Sartorius, Gottingen, Njemačka)
- Automatska pipeta Tacta 100 μ L - 1000 μ L (Sartorius, Gottingen, Njemačka)
- Plinski kromatograf: Agilent Technologies 7890A, Santa Clara, Kalifornija, SAD
- Automatski uzorkivač Agilent Technologies 7683B, Santa Clara, Kalifornija, SAD
- Centrifuga Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
- Generator vodika: Precision Hydrogen 200 cc, peak Scientific, Inchinnan, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Injektor: *split* / *splitless* injektor
- Kolona: Agilent DB – FastFAME G3903 - 63011
- Detektor: FID detektor
- Računalo



Slika 5. Plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom



Slika 6. Plinski kromatograf s automatskim uzorkivačem



Slika 7. Centrifuga

2.2.Priprema otopina

Smjesa 37 masnih kiselina dolazi u ampuli od 1 mL koja se odlomi na označenom mjestu kako bi se sadržaj mogao kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL. Kao otapalo se koristi heksan pomoću kojeg se također ispire ampula i njen čep. Odmjerna tikvica se nadopuni heksanom do oznake i promiješa. Za izradu krivulje umjeravanja iz početne otopine se daljnjim postupnim razrjeđivanjem dobivaju otopine različitih koncentracija. Priprema otopina prikazana je u tablici 3, a konačne koncentracije pojedinog analita izračunate na temelju masenog udjela dane su u tablici 4.

Tablica 3. Priprema otopina za krivulje umjeravanja.

Oznaka razrjeđenja	Volumen početne otopine (μL)	Volumen heksana (μL)
500	500	0
400	400	100
300	300	200
200	200	300
100	100	400
50	50	450
25	25	475



Slika 8. Otopine za krivulje umjeravanja.

Tablica 4. Koncentracije pojedinog analita za krivulje umjeravanja.

Oznaka masne kiseline	500 µg/mL	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL
C4:0	326	260,8	195,6	130,4	65,2	32,6	16,3
C6:0	376	300,8	225,6	150,4	75,2	37,6	18,8
C8:0	399	319,2	239,4	159,6	79,8	39,9	20,0
C10:0	400	320,0	240,0	160,0	80,0	40,0	20,0
C11:0	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C12:0	398	318,4	238,8	159,2	79,6	39,8	19,9
C13:0	199	159,2	119,4	79,6	39,8	19,9	10,0
C14:0	399	319,2	239,4	159,6	79,8	39,9	20,0
C14:1	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C15:0	199	159,2	119,4	79,6	39,8	19,9	10,0
C15:1	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C16:0	595	476,0	357,0	238,0	119,0	59,5	29,8
C16:1	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C17:0	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C17:1	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C18:0	399	319,2	239,4	159,6	79,8	39,9	20,0
C18:1 <i>trans</i> (n9)	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C18:1 <i>cis</i> (n9)	398	318,4	238,8	159,2	79,6	39,8	19,9
C18:2 <i>trans</i> (n6)	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C18:2 <i>cis</i> (n6)	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C18:3 (n6)	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C18:3 (n3)	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C20:0	399	319,2	239,4	159,6	79,8	39,9	20,0
C20:1 (n9)	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C20:2	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C21:0	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C20:3 (n6)	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C20:4 (n6) (ARA)	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C20:3 (n3)	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C20:5 (n3) (EPA)	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C22:0	398	318,4	238,8	159,2	79,6	39,8	19,9
C22:1 (n9)	199	159,2	119,4	79,6	39,8	19,9	10,0
C22:2	198	158,4	118,8	79,2	39,6	19,8	9,9
C23:0	199	159,2	119,4	79,6	39,8	19,9	10,0
C24:0	397	317,6	238,2	158,8	79,4	39,7	19,9
C22:6 (n3) (DHA)	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0
C24:1	200	160,0	120,0	80,0	40,0	20,0	10,0

Razvijenu metodu potrebno je i vrednovati te su u tu svrhu odabrane 4 koncentracijske razine. Priprema otopina prikazana je u tablici 5, a koncentracije pojedinog analita izračunane su na temelju masenog udjela dane u tablici 6.

Tablica 5. Priprema otopina za vrednovanje.

Oznaka razrjeđenja	Volumen početne otopine (μL)	Volumen heksana (μL)
450	450	50
250	250	250
75	75	425
25	25	475



Slika 9. Otopine za vrednovanje.

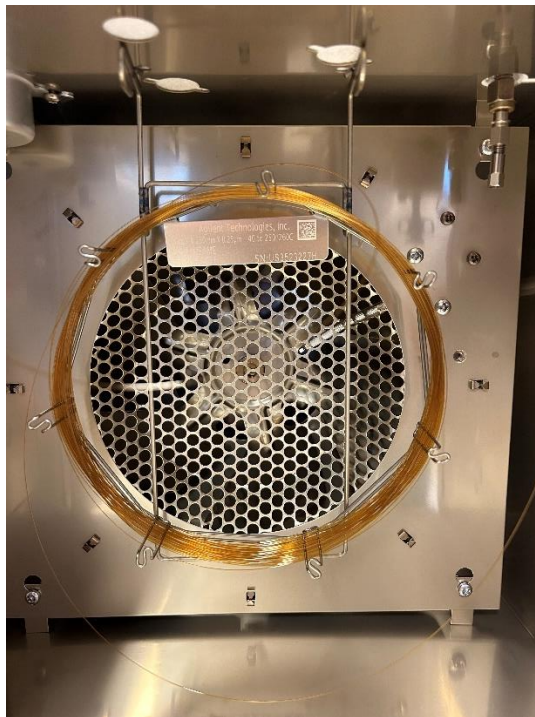
Tablica 6. Koncentracije pojedinog analita za pripremu vrednovanja.

Oznaka masne kiseline	450 (µg/mL)	250 (µg/mL)	75 (µg/mL)	25 (µg/mL)
C4:0	293,4	163,0	48,9	16,3
C6:0	338,4	188,0	56,4	18,8
C8:0	359,1	199,5	59,9	20,0
C10:0	360,0	200,0	60,0	20,0
C11:0	178,2	99,0	29,7	9,9
C12:0	358,2	199,0	59,7	19,9
C13:0	179,1	99,5	29,9	10,0
C14:0	359,1	199,5	59,9	20,0
C14:1	180,0	100,0	30,0	10,0
C15:0	179,1	99,5	29,9	10,0
C15:1	178,2	99,0	29,7	9,9
C16:0	535,5	297,5	89,3	29,8
C16:1	180,0	100,0	30,0	10,0
C17:0	178,2	99,0	29,7	9,9
C17:1	180,0	100,0	30,0	10,0
C18:0	359,1	199,5	59,9	20,0
C18:1 <i>trans</i> (n9)	180,0	100,0	30,0	10,0
C18:1 <i>cis</i> (n9)	358,2	199,0	59,7	19,9
C18:2 <i>trans</i> (n6)	180,0	100,0	30,0	10,0
C18:2 <i>cis</i> (n6)	178,2	99,0	29,7	9,9
C18:3 (n6)	178,2	99,0	29,7	9,9
C18:3 (n3)	178,2	99,0	29,7	9,9
C20:0	359,1	199,5	59,9	20,0
C20:1 (n9)	180,0	100,0	30,0	10,0
C20:2	180,0	100,0	30,0	10,0
C21:0	178,2	99,0	29,7	9,9
C20:3 (n6)	180,0	100,0	30,0	10,0
C20:4 (n6) (ARA)	180,0	100,0	30,0	10,0
C20:3 (n3)	178,2	99,0	29,7	9,9
C20:5 (n3) (EPA)	178,2	99,0	29,7	9,9
C22:0	358,2	199,0	59,7	19,9
C22:1 (n9)	179,1	99,5	29,9	10,0
C22:2	178,2	99,0	29,7	9,9
C23:0	179,1	99,5	29,9	10,0
C24:0	357,3	198,5	59,6	19,9
C22:6 (n3) (DHA)	180,0	100,0	30,0	10,0
C24:1	180,0	100,0	30,0	10,0

2.3. Optimizacija metode

2.3.1. Kolona

Korištena je kapilarna kolona Agilent DB – FastFAME duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine nepokretne faze 0,25 μm . Temperaturni raspon rada navedene kolone je od 40 $^{\circ}\text{C}$ do 250 $^{\circ}\text{C}$.



Slika 10. Kromatografska kolona u peći.

2.3.2. Početna metoda

U plinski kromatograf automatskim uzorkivačem injektirano je 1 μL uzorka. Prva korištena metoda preuzeta je od proizvođača kolone te se kasnije optimizirala mijenjanjem temperaturnog programa.

Tablica 7. Temperaturni program početne metode.

Početna temperatura (°C)	Konačna temperatura (°C)	Brzina porasta temperature (°C/min)	Zadržavanje (min)
50	50	/	0,5
50	194	30	3,5
194	240	5	1
Ukupno trajanje:			19

Korišten je helij kao pokretna faza dok su se za održavanje plamena u detektoru koristili vodik i sintetski zrak, a kao plin za ujednačavanje bazne linije (*makeup*) koristio se dušik. Isprobane su i različite brzine protoka plinova, a vrijednosti za konačnu metodu dane su u tablici 8.

Tablica 8. Brzine protoka plinova.

Plin	Brzina protoka (mL/min)
Helij	2,2
Zrak	400
Vodik	40
Dušik	25

2.3.3. Razvoj metode

Cilj optimizacije metode bio je postići što bolje razdvajanje komponenti uz što kraće vrijeme trajanja mjerenja. Početna metoda se modificirala regulacijom temperaturnog programa pri čemu su nastale tri metode čiji su temperaturni programi opisani u tablicama 9 - 11.

Tablica 9. Temperaturni program metoda 2.

Početna temperatura (°C)	Konačna temperatura (°C)	Brzina porasta temperature (°C/min)	Zadržavanje (min)
50	50	/	0,5
50	194	30	3,5
194	240	2	1
Ukupno trajanje:			33

Tablica 10. Temperaturni program metoda 3.

Početna temperatura (°C)	Konačna temperatura (°C)	Brzina porasta temperature (°C/min)	Zadržavanje (min)
50	50	/	0,5
50	194	30	3,5
194	215	1	1
Ukupno trajanje:			31

Tablica 11. Temperaturni program metoda 4.

Početna temperatura (°C)	Konačna temperatura (°C)	Brzina porasta temperature (°C/min)	Zadržavanje (min)
50	50	/	0,5
50	194	30	3,5
194	200	0,3	1,5
Ukupno trajanje:			30,3

2.4. Priprema realnih uzoraka za analizu

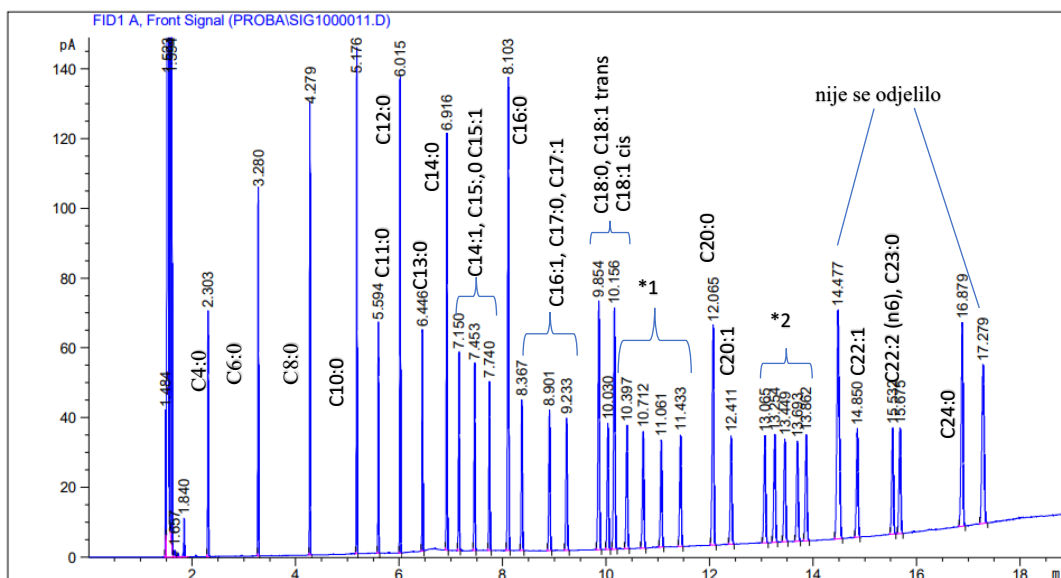
Primjenjivosti konačne metode provjerena je na pet odabranih realnih uzoraka: maslinovo, suncokretovo, bućino, kokosovo i riblje ulje. Masne je kiseline u realnim uzorcima najprije potrebno prevesti u metilne estere masnih kiselina. Postupak kemijske obrade sastojaka uzorka prije ulaska u kromatografsku kolonu naziva se derivatizacija.

Derivatizacijom se masne kiseline metanolom prevode u metilne estere kako bi im se poboljšala hlapljivost te osigurao bolji oblik pika plinskog kromatograma. Postupak derivatizacije masnih kiselina rađen je u skladu sa smjernicama europske regulative.¹⁶ Najprije je pripravljena otopina 2M kalijeva hidroksida u metanolu potrebnog za esterifikaciju masnih kiselina. Za pripremu navedene otopine potrebno je odvaganih 5,6 g KOH otopiti u 50 mL metanola uz pomoć ultrazvučne kupelji. Zatim je odvagano oko 100 mg realnog uzorka (što odgovara oko 110 μ L ulja) uz bilježenje točnih masa pomoću analitičke vage. Uzorku je dodano 100 μ L KOH u metanolu radi metilacije te je epruveta energično miješana u trajanju od 5 minuta. Nadalje je dodano 10 mL otapala heksana te se ponovno miješa 1 minutu i zatim postavlja na centrifugu 2 minute. Postignuto je odvajanje dviju faza od čega se uzima 1 mL sadržaja supernatanta i prenosi u bočicu za automatsko uzorkovanje nakon čega se postavlja u plinski kromatograf na analizu odabranom metodom. Derivatizacija svih pet realnih uzoraka provodi se na opisani način.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Razvoj metode za odjeljivanje 37 masnih kiselina

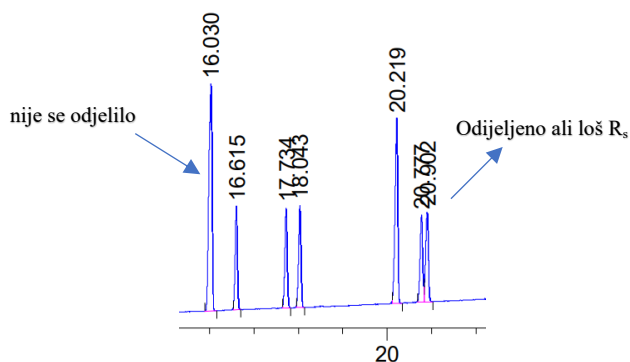
Prva korištena metoda za odjeljivanje masnih kiselina iz radne otopine prijedlog je proizvođača kolone tvrtke *Agilent Technologies*.¹⁷ Početna temperatura peći bila je 50 °C te je zadržana 0,5 minuta. Zatim temperatura raste 30 °C/min do 194 °C i na toj je temperaturi zadržana 3,5 minuti. Naposljetku, temperatura raste 5 °C/min do 240 °C te je zadržana 1 minutu. Metoda je trajala 19 minuta, a *split* omjer bio je 50:1. Ovom metodom odijeljeno je 35 od 37 masnih kiselina.. Naredne metode razvijale su s ciljem odjeljivanja preostala 2 signala.



Slika 11. Kromatogram početne metode (*1 – C18:2 trans, C18:2 cis, C18:3 (n6), C18:3 (n3); *2 – C20:2, C21:0, C20:3 (n6), C20:4 (n6), C20:3 (n3))

Prema kromatogramu na slici 11 pretpostavlja se da su signali na 14,48 min i 17,28 min zapravo po dva signala stopljena u jedan veliki. Prvi navedeni signal bi trebao sadržavati estere behenske i eikosapentaenske masne kiseline, a drugi signal nervonsku i dokosaheksaensku masnu kiselinu. Metodu je potrebno dodatno optimizirati kako bi se postiglo uspješno odvajanje navedenih signala.

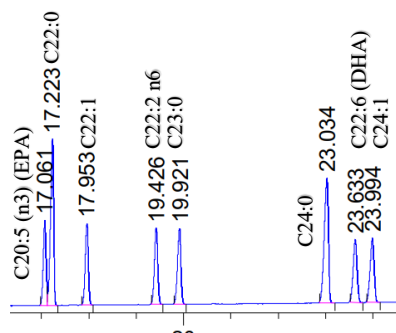
Naredne metode razvijale su se promjenom temperaturnog programa. Metoda 2 započinje jednako kao i početna metoda međutim promijenjena je temperaturni gradijent. Od 194 °C raste 2 °C/min do 240 °C na kojoj se zadržava 1 minutu. Ova metoda pokazala se uspješnija te uspijeva odjeliti 36 od 37 spojeva u trajanju od 33 minute.



Slika 12. Sporni signali metode 2.

Vidljivo je da se zadnji signal uspio razdvojiti u dva pri tome predstavljajući estere dokosaheksaenske i nervonske masne kiseline iako im razdvajanje nije idealno. Signal na 16,03 minute još se nije uspio razdvojiti.

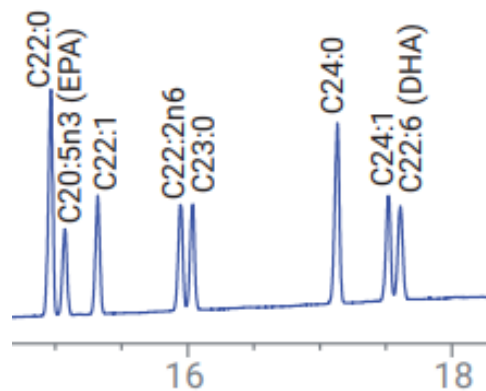
Kod metode 2 uočeno je da nakon 22 minute nema odziva na detektoru te je sljedeći korak bio skratiti metodu ali zadržati dobro odvajanje. Početna temperatura u metodi 3 iznosi također 50 °C te je zadržana 0,5 min. Temperatura raste do 194 °C 30 °C/min te se zadržava 3,5 min, nakon čega temperatura raste brzinom 1 °C/min od 194 °C do 215 °C gdje se zadržava 1 minutu. Smanjenjem konačne temperature postignuto je kraće trajanje metode koje sada iznosi 31 minutu a smanjenjem brzine porasta temperature postignuto je odvajanje svih 37 masnih kiselina.



Slika 13. Razdvojeni sporni signali metodom 3.

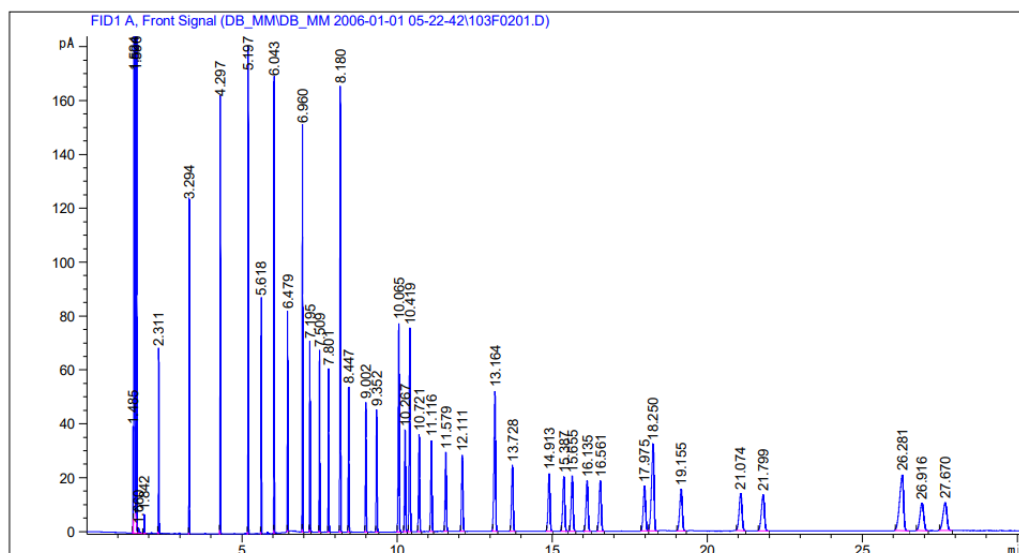
Uočena je razlika u redosljedu eluiranja masnih kiselina u odnosu na predloženu metodu proizvođača kolone. Naime, u njihovom preglednom radu najprije eluiraju C20:5 (n-3) zatim C22:0 masna kiselina, te na krajnjim signalima C22:6 (n-3) te C24:1 masne kiseline prikazane na slici 14. Visine signala proporcionalne su masenim udjelima masnih kiselina. Tako je uočena razlika u visinama signala u kromatogramu kojeg je ponudio proizvođač kolone za C20:5 (n-3) i C22:0 gdje bi najprije trebao izlaziti viši signal, odnosno C22:0, a slijedi ga manji signal od C20:5 (n-3).

Kromatogram na slici 13 pokazuje obrnuti smjer izlaženja navedenih signala. Razlog promjeni slijeda eluiranja može biti posljedica promjene tlaka u koloni ili sličnih uvjeta tijekom mjerenja.¹⁷ Pretpostavka da su iz istog razloga signali za C22:6 (n-3) i C24:1 zamijenili redosljed izlaženja na koloni što je potvrđeno i objašnjeno mjerenjem realnih uzoraka (poglavlje 3.3.).



Slika 14. Kromatogram referentne metode (*Agilent Technologies*).¹⁷

Radi postizanja boljeg razlučivanja razvijena je metoda 4 koja je odabrana kao konačna metoda za odjeljivanje masnih kiselina. Kod ove metode promijenjen je drugi temperaturni gradijent gdje temperatura raste brzinom od 0,3 °C/min od 194 °C do 200 °C a ukupno trajanje metode sada iznosi 30 min. Na slici 15 prikazan je kromatogram konačne odabrane metode za analizu 37 masnih kiselina.



Slika 15. Kromatogram konačne metode.

U tablici 10 dana su vremena zadržavanja metilnih estera masnih kiselina iz smjese koristeći konačnu metodu 4.

Tablica 12. Vremena zadržavanja metilnih estera masnih kiselina metoda 4

Oznaka masne kiseline	Vrijeme zadržavanja (min)
C4:0	2,31
C6:0	3,30
C8:0	4,30
C10:0	5,20
C11:0	5,62
C12:0	6,04
C13:0	6,48
C14:0	6,96
C14:1	7,20
C15:0	7,51
C15:1	7,80
C16:0	8,18
C16:1	8,45
C17:0	9,00
C17:1	9,35
C18:0	10,07
C18:1 <i>trans</i> (n9)	10,27
C18:1 <i>cis</i> (n9)	10,42
C18:2 <i>trans</i> (n6)	10,72

C18:2 <i>cis</i> (n6)	11,12
C18:3 (n6)	11,58
C18:3 (n3)	12,11
C20:0	13,16
C20:1 (n9)	13,73
C20:2	14,91
C21:0	15,39
C20:3 (n6)	15,66
C20:4 (n6) (ARA)	16,14
C20:3 (n3)	16,56
C20:5 (n3) (EPA)	17,98
C22:0	18,25
C22:1 (n9)	19,16
C22:2	21,07
C23:0	21,80
C24:0	26,28
C22:6 (n3) (DHA)	26,92
C24:1	27,67

3.2. Vrednovanje metode za kvantitativnu analizu

3.2.1. Linearnost

Za potvrdu prikladnosti analitičkog postupka za namjeravanu upotrebu potrebno je sagledati linearni odnos koncentracije analita i signala u cijelom radnom rasponu. Za uspostavu linearnosti Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) preporučuje najmanje pet koncentracija prikladno raspoređenih u rasponu.^{11,18} Linearnost ispitivane metode izražena je koeficijentom linearne regresije za pojedinu masnu kiselinu u uzorku. Raspon koncentracija za sve metilne estere masnih kiselina kao i njihove jednadžbe pravca te koeficijent linijske regresije dane su u tablici 13.

Tablica 13. Krivulje umjeravanja

Oznaka masne kiseline	Raspon koncentracija (µg/mL)	y = ax+b		R ²	LOD µg/mL	LOQ µg/mL
		a	b			
C4:0	16,2 - 331,8	0,22313	-0,22863	0,99965	1,38	4,19
C6:0	18,2 - 381,5	0,26775	-0,17138	0,99974	1,15	3,49
C8:0	19,2 - 404,6	0,29170	-0,15267	0,99973	1,06	3,21
C10:0	19,2 - 405,2	0,31733	0,00554	0,99974	0,97	2,95
C11:0	9,4 - 200,6	0,32697	0,01941	0,99973	0,94	2,86
C12:0	18,7 - 403,0	0,33666	-0,02836	0,99974	0,92	2,78
C13:0	10,8 - 202,3	0,34591	0,09422	0,99954	0,89	2,70
C14:0	18,8 - 404,0	0,35222	-0,01405	0,99974	0,88	2,65
C14:1	9,4 - 202,5	0,34714	-0,05210	0,99975	0,89	2,69
C15:0	9,4 - 201,4	0,35592	0,00080	0,99975	0,87	2,63
C15:1	9,4 - 200,4	0,35511	0,00625	0,99975	0,87	2,63
C16:0	28,0 - 602,1	0,36144	-0,05755	0,99976	0,85	2,59
C16:1	9,3 - 202,5	0,35560	-0,03449	0,99973	0,87	2,63
C17:0	9,3 - 200,5	0,36449	-0,02010	0,99975	0,85	2,57
C17:1	9,5 - 202,4	0,36331	-0,01225	0,99975	0,85	2,57
C18:0	18,8 - 403,8	0,36904	-0,01068	0,99974	0,84	2,53
C18:1 trans (n9)	9,3 - 202,4	0,36617	-0,02830	0,99976	0,84	2,55
C18:1 cis (n9)	18,9 - 404,1	0,37180	-0,24361	0,99967	0,83	2,51
C18:2 trans (n6)	9,4 - 202,5	0,36734	-0,01786	0,99975	0,84	2,55
C18:2 cis (n6)	9,3 - 200,4	0,37145	-0,01466	0,99974	0,83	2,52
C18:3 (n6)	9,5 - 200,4	0,34132	0,05154	0,99974	0,90	2,74
C18:3 (n3)	9,2 - 200,4	0,36135	-0,02113	0,99975	0,85	2,59
C20:0	18,7 - 404,1	0,37860	-0,03530	0,99973	0,81	2,47
C20:1 (n9)	9,5 - 202,6	0,36822	-0,01387	0,99973	0,84	2,54
C20:2	9,4 - 202,7	0,36911	-0,02000	0,99972	0,84	2,53
C21:0	9,2 - 200,5	0,38074	-0,01632	0,99972	0,81	2,46
C20:3 (n6)	9,3 - 202,6	0,36548	-0,04161	0,99973	0,84	2,56
C20:4 (n6) (ARA)	9,6 - 202,5	0,35425	-0,01299	0,99973	0,87	2,64
C20:3 (n3)	9,2 - 200,5	0,37176	-0,01029	0,99975	0,83	2,51
C20:5 (n3) (EPA)	9,3 - 202,4	0,36582	-0,03220	0,99974	0,84	2,56
C22:0	18,8 - 403,4	0,38229	0,05583	0,99970	0,81	2,45
C22:1 (n9)	9,5 - 201,7	0,37562	-0,03406	0,99971	0,82	2,49
C22:2	9,4 - 200,4	0,37606	-0,04725	0,99973	0,82	2,49
C23:0	9,2 - 201,7	0,38582	-0,03254	0,99967	0,80	2,42
C24:0	18,4 - 402,7	0,38633	-0,12190	0,99966	0,80	2,42
C22:6 (n3) (DHA)	9,0 - 202,7	0,35822	-0,13145	0,99966	0,86	2,61
C24:1	9,8 - 203,3	0,37883	-0,13204	0,99962	0,81	2,47

*LOD – granica dokazivanja, najniža koncentracija analita pri kojoj ga metoda može detektirati; LOQ – granica određivanja, najniža koncentracija analita pri kojoj ga metoda može kvantificirati s pouzdanom točnošću i preciznošću.

Sve krivulje pokazuju jako dobru linearnost ($R^2 \approx 0,9997$). Srednja vrijednost standardnog odstupanja bazne linije iznosi 0,09349. U navedenim jednadžbama pravca, y predstavlja površinu ispod kromatografske krivulje, a x masenu koncentraciju masne kiseline.

Granice dokazivanja i određivanja, dane u tablici 13, izračunate su prema sljedećim jednadžbama:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$
$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

gdje S predstavlja nagib krivulje umjeravanja, a σ standardno odstupanje od bazne linije.^{11,18} Granice dokazivanja i određivanja određene su na temelju odnosa koncentracije određene masne kiseline s omjerom signal-šum. Kriterij definiranja odnosa signala i šuma prema ICH smjernicama za granicu dokazivanja 3:1 odnosno za granicu određivanja iznosi 10:1.

3.2.2. Točnost

Točnost analitičkog postupka dokazuje se u uobičajenim uvjetima ispitivanja analitičkog postupka te su primjenjuje na cijeli odabrani koncentracijski raspon usporedbom izmjerenih rezultata s očekivanim vrijednostima. Točnost je izražena kao relativna pogreška u postotku, a izračunata je na slijedeći način¹¹:

$$RE = \frac{c(\text{eksperimentalno}) - c(\text{očekivano})}{c(\text{očekivano})} \times 100\%$$

Pripravljene su uzorci za kontrolu kvalitete namijenjeni oponašanju ispitanih uzoraka dodavanjem poznate količine analita iz radne otopine i otapala te su analizirani kako bi se procijenila valjanost analitičke metode. Spomenuti uzorci pripremljeni su unutar raspona krivulje umjeravanja najmanje četiri koncentracijske razine¹¹:

- Najniža granica određivanja (LLOQ) – najmanja koncentracija kalibracijske krivulje
- Niska koncentracija određivanja (LQC) – tri puta veća od LLOQ
- Srednja koncentracija (MQC) – 30 - 50 % raspona kalibracijske krivulje

- Visoka koncentracija (HQC) – više od 75 % kalibracijske krivulje

S obzirom na odabrani koncentracijski raspon 500 – 25 µg/mL, LLOQ dodijeljena je koncentracija od 25 µg/mL, LQC 75 µg/mL, MQC 250 µg/mL te za HQC 450 µg/mL.

U tablici 14 su dane relativne pogreške za svaki spoj u odabranim koncentracijskim razinama.

Tablica 14. Točnost – relativne pogreške (%) četiri koncentracijske razine

Oznaka masne kiseline	RE (%)			
	450	250	75	25
C4:0	-0,17	-0,82	-2,45	2,45
C6:0	0,37	-0,35	-3,37	-0,71
C8:0	0,80	-0,22	-3,48	-0,92
C10:0	0,93	-0,15	-3,61	-1,50
C11:0	0,94	-0,13	-3,70	-1,68
C12:0	1,00	-0,12	-3,63	-1,84
C13:0	0,87	0,67	-5,75	1,51
C14:0	1,03	-0,10	-3,43	-2,26
C14:1	1,00	-0,10	-3,44	-1,33
C15:0	1,04	-0,13	-3,52	-2,18
C15:1	0,97	-0,10	-3,48	-2,02
C16:0	0,97	-0,13	-3,45	-1,62
C16:1	0,89	-0,13	-3,44	-1,33
C17:0	0,97	-0,10	-3,37	-2,02
C17:1	0,94	-0,10	-3,33	-1,67
C18:0	0,92	-0,23	-3,70	-1,75
C18:1 <i>trans</i> (n9)	0,91	-0,10	-3,67	-1,00
C18:1 <i>cis</i> (n9)	0,61	-0,40	-3,46	-1,01
C18:2 <i>trans</i> (n6)	0,91	-0,20	-3,44	-1,33
C18:2 <i>cis</i> (n6)	0,88	-0,34	-3,82	-1,35
C18:3 (n6)	0,88	-0,30	-3,70	-2,02
C18:3 (n3)	0,90	-0,07	-3,82	-1,35
C20:0	0,82	-0,25	-3,76	-2,76
C20:1 (n9)	0,81	-0,27	-3,33	-2,67
C20:2	0,74	-0,37	-3,89	-1,00
C21:0	0,69	-0,27	-4,38	-6,06
C20:3 (n6)	0,91	-0,20	-3,78	-0,67
C20:4 (n6) (ARA)	0,78	-0,27	-3,44	0,33
C20:3 (n3)	0,79	-0,40	-3,48	-4,04
C20:5 (n3) (EPA)	0,71	-0,27	-3,93	-0,34
C22:0	0,74	-0,15	-4,80	-11,22
C22:1 (n9)	0,73	-0,37	-3,85	-0,17
C22:2	0,84	-0,27	-4,04	-2,36
C23:0	0,86	0,20	-6,09	-17,92

C24:0	1,04	0,47	-7,98	-28,46
C22:6 (n3) (DHA)	0,78	-0,47	-3,11	-7,33
C24:1	0,43	-0,30	-3,22	-8,67

Točnost pri svakoj koncentraciji treba biti $\pm 15\%$ nominalne koncentracije izuzev LLOQ gdje bi trebala biti $\pm 20\%$. U tablici 14 vidljivo je da svi rezultati ne prelaze navedene granice točnosti. Tako primjerice metil-butirat (C4:0) pokazuje visoku točnost u vrlo niskom rasponu relativnih pogrešaka 0,16 – 2,45, dok spojevi koji su kasnije eluirali kao što su EPA (C20:5 (n3)) i DHA (C22:6 (n3)) imaju širi raspon relativnih pogrešaka redom 0,00 – 6,06 te 0,00 – 10,0 odnosno manju točnost ali ipak ne prelaze granice točnosti od 15 % odnosno 20 %. Srednje relativne pogreške odabranih koncentracija za kontrolu kvalitete redom iznose: 3,25 % za LLOQ, 3,84 % za LQC, 0,19 % za MQC te 0,82 % za HQC.

3.2.3. Preciznost

Preciznost predstavlja stupanj raspršenosti rezultata u nizu mjerenja. Odabrane otopine injektiraju se u GC-FID pri čemu je određena koncentracija uzoraka iz odziva prema detektoru. Iz dobivenih podataka računa se srednja vrijednost koncentracija te standardno odstupanje. Preciznost se izražava kao relativno standardno odstupanje (RSD) danom formulom¹¹:

$$RSD = \frac{\text{standardna devijacija}}{\text{srednja koncentracija}} \times 100 \%$$

Preciznost metode ocjenjivana je na dvije razine: ponovljivost te srednja preciznost.

3.2.3.1. Ponovljivost

Ponovljivost je procijenjena na podacima od četiri uzorka odabranih koncentracija (LLOQ, LQC, MQC, HQC) generiranima kroz tri mjerenja istog dana i od strane istog analitičara. Određena je relativna standardna devijacija (RSD) pomoću dobivenih eksperimentalnih vrijednosti koncentracija čiji su rezultati prikazani u tablici 15.

Tablica 15. Ponovljivost.

Oznaka masne kisljine	RSD (%)			
	450	250	75	25
C4:0	0,42	0,18	1,09	4,90
C6:0	0,45	0,40	1,12	5,06
C8:0	0,45	0,45	1,41	4,91
C10:0	0,43	0,43	1,45	5,85
C11:0	0,38	0,56	1,52	6,84
C12:0	0,44	0,54	1,46	6,48
C13:0	0,16	1,10	3,19	3,57
C14:0	0,39	0,54	1,50	6,41
C14:1	0,40	0,53	1,63	6,90
C15:0	0,38	0,58	1,51	6,61
C15:1	0,37	0,54	1,32	6,44
C16:0	0,36	0,57	1,54	6,59
C16:1	0,36	0,51	1,59	5,94
C17:0	0,33	0,66	1,84	6,44
C17:1	0,33	0,61	2,10	6,54
C18:0	0,33	0,66	1,46	6,27
C18:1 <i>trans</i> (n9)	0,44	0,70	1,51	6,14
C18:1 <i>cis</i> (n9)	0,36	0,62	1,46	5,00
C18:2 <i>trans</i> (n6)	0,31	0,63	1,63	6,90
C18:2 <i>cis</i> (n6)	0,29	0,59	1,33	6,26
C18:3 (n6)	0,36	0,62	1,52	8,05
C18:3 (n3)	0,35	0,48	1,62	6,26
C20:0	0,28	0,57	1,51	7,22
C20:1 (n9)	0,36	0,67	1,24	6,61
C20:2	0,31	0,64	1,40	8,27
C21:0	0,28	0,51	1,76	8,80
C20:3 (n6)	0,30	0,63	1,91	5,54
C20:4 (n6) (ARA)	0,20	0,46	2,19	7,21
C20:3 (n3)	0,26	0,54	1,32	6,57
C20:5 (n3) (EPA)	0,26	0,47	1,46	11,53
C22:0	0,28	0,41	2,03	13,47
C22:1 (n9)	0,25	0,65	2,12	7,69
C22:2	0,24	0,56	2,46	5,10
C23:0	0,25	0,70	2,68	14,76
C24:0	0,26	0,37	5,02	12,70
C22:6 (n3) (DHA)	0,36	0,64	2,18	14,37
C24:1	0,25	0,89	2,10	9,93

Prosječne vrijednosti relativne standardne devijacije za LLOQ, LQC, MQC i HQC redom iznose 7,41 %, 1,79 %, 0,57 % te 0,33 %. Vrijednosti relativne standardne devijacije za ponovljivost nisu prelazile 15 % što pokazuje da je metoda ispitivanja ponovljiva. To znači da su otopine za mjerenja pripravljena precizno te da uređaj ne pokazuje pogreške tokom mjerenja. Više vrijednosti relativne standardne devijacije masnih kiselina za najnižu koncentraciju mogu ukazivati na ponavljanje istih pogreški prilikom pripreve navedene otopine.

3.2.3.2. Srednja preciznost

Uzorci koncentracija za kontrolu kvalitete (LLOQ, LQC, MQC, HQC) pripremljeni su za dva mjerenja od istog analitičara kroz dva različita dana dok ponovno iste uzorke za treće mjerenje pripremlja drugi analitičar.

U tablici 16 dani su rasponi QC koncentracija te rasponi relativnih standardnih devijacija za odabrane masne kiseline.

Tablica 16. Srednja preciznost.

Oznaka masne kiseline	RSD (%)			
	450	250	75	25
C4:0	0,57	1,00	1,23	3,08
C6:0	0,72	1,25	2,13	4,09
C8:0	0,75	1,23	1,92	3,61
C10:0	0,69	1,26	1,95	3,66
C11:0	0,71	1,34	1,69	4,78
C12:0	0,74	1,34	1,77	4,52
C13:0	1,18	1,43	7,88	4,90
C14:0	0,67	1,31	1,69	4,23
C14:1	0,69	1,30	1,53	4,71
C15:0	0,64	1,24	1,85	5,32
C15:1	0,68	1,28	2,11	4,26
C16:0	0,64	1,34	1,78	4,24
C16:1	0,64	1,27	1,71	4,17
C17:0	0,59	1,34	1,66	4,01
C17:1	0,58	1,20	1,45	4,21
C18:0	0,60	1,33	1,87	4,50
C18:1 <i>trans</i> (n9)	0,67	1,34	1,90	4,22
C18:1 <i>cis</i> (n9)	0,62	1,24	1,96	3,38
C18:2 <i>trans</i> (n6)	0,58	1,27	1,77	4,77
C18:2 <i>cis</i> (n6)	0,62	1,34	2,03	3,71
C18:3 (n6)	0,58	1,26	2,17	6,19
C18:3 (n3)	0,61	1,34	1,86	4,21
C20:0	0,54	1,24	1,91	5,34
C20:1 (n9)	0,56	1,18	1,83	4,82
C20:2	0,61	1,27	2,19	6,06
C21:0	0,61	1,35	2,20	8,21
C20:3 (n6)	0,51	1,27	2,08	4,32
C20:4 (n6) (ARA)	0,59	1,27	1,16	4,22
C20:3 (n3)	0,59	1,32	1,55	7,95
C22:0	0,52	1,24	2,38	12,28
C20:5 (n3) (EPA)	0,59	1,33	2,18	7,05
C22:1 (n9)	0,57	1,26	1,78	4,33
C22:2	0,52	1,16	2,25	5,23
C23:0	0,47	0,89	3,46	19,12
C24:0	0,52	1,03	5,57	22,65
C24:1	0,58	1,53	2,03	11,56
C22:6 (n3) (DHA)	0,67	1,34	1,71	13,16

Preciznost koncentracija određenih na svakoj razini ne smije prijeći 15 % osim za LLOQ gdje ne smije prijeći 20 %. Rezultati u tablici 16 pokazuju dobru preciznost, ipak relativne standardne devijacije od 19,12 % za C23:0 te 22,65 % za C24:0 pokazuju slabiju preciznost.

3.2.4. Prikladnost sustava

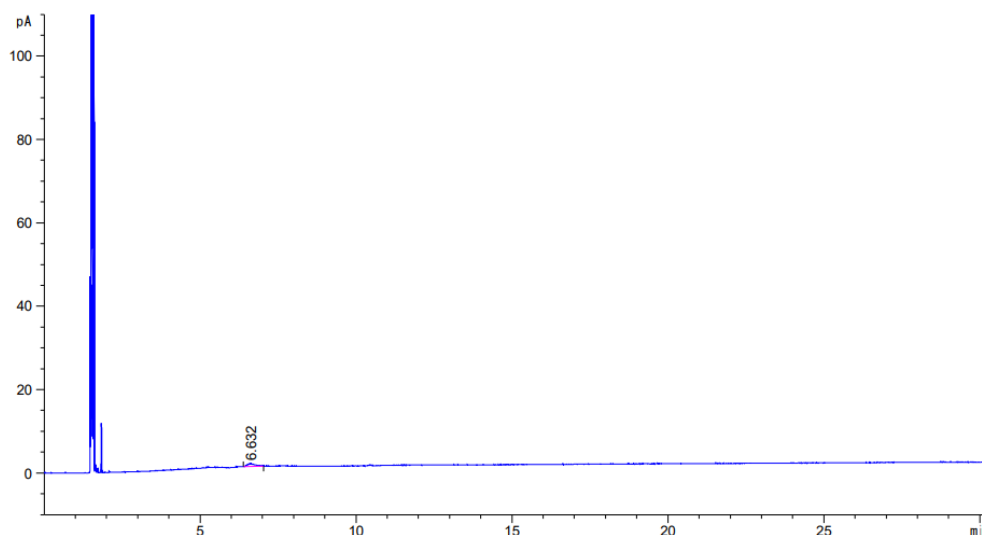
Testovi prikladnosti sustava vrše se radi provjere jesu li mjerni sustav i analitičke operacije povezane s analitičkom metodom prikladni za namjeravanu analizu.¹¹ Prikladnost sustava utvrđena je preciznošću injektiranja na način da je odabrana otopina MQC injektirana je u instrument pet puta. Određene su koncentracije za pet mjerenja prema kojima je prikladnost sustava izračunana i izražena kao relativno standardno odstupanje (RSD). U tablici 17 dane su vrijednosti prikladnosti sustava za sve estere masnih kiselina. Može se uočiti da metil-lignocerat ima najniži RSD u vrijednosti od 0,43 % dok najvišu vrijednost RSD od 1,39 % ima metil-tridekanoat. Vrijednosti relativnog standardnog odstupanja niske su za sve analite pa se može ocijeniti da je sustav prikladan za odabranu metodu.

Tablica 17. Prikladnost sustava.

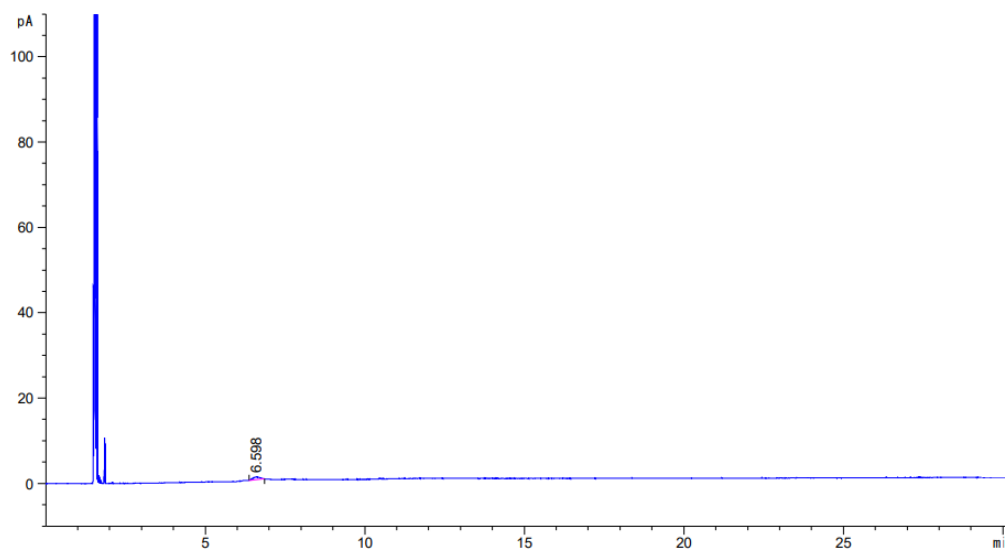
Oznaka masne kiseline	Prikladnost sustava RSD (%)
C4:0	0,45
C6:0	0,44
C8:0	0,50
C10:0	0,50
C11:0	0,54
C12:0	0,53
C13:0	1,39
C14:0	0,55
C14:1	0,50
C15:0	0,59
C15:1	0,50
C16:0	0,52
C16:1	0,51
C17:0	0,49
C17:1	0,61
C18:0	0,51
C18:1 <i>trans</i> (n9)	0,58
C18:1 <i>cis</i> (n9)	0,47

C18:2 <i>trans</i> (n6)	0,48
C18:2 <i>cis</i> (n6)	0,48
C18:3 (n6)	0,56
C18:3 (n3)	0,53
C20:0	0,55
C20:1 (n9)	0,57
C20:2	0,51
C21:0	0,48
C20:3 (n6)	0,51
C20:4 (n6) (ARA)	0,50
C20:3 (n3)	0,59
C22:0	0,47
C20:5 (n3) (EPA)	0,52
C22:1 (n9)	0,60
C22:2	0,50
C23:0	0,49
C24:0	0,43
C24:1	0,53
C22:6 (n3) (DHA)	0,69

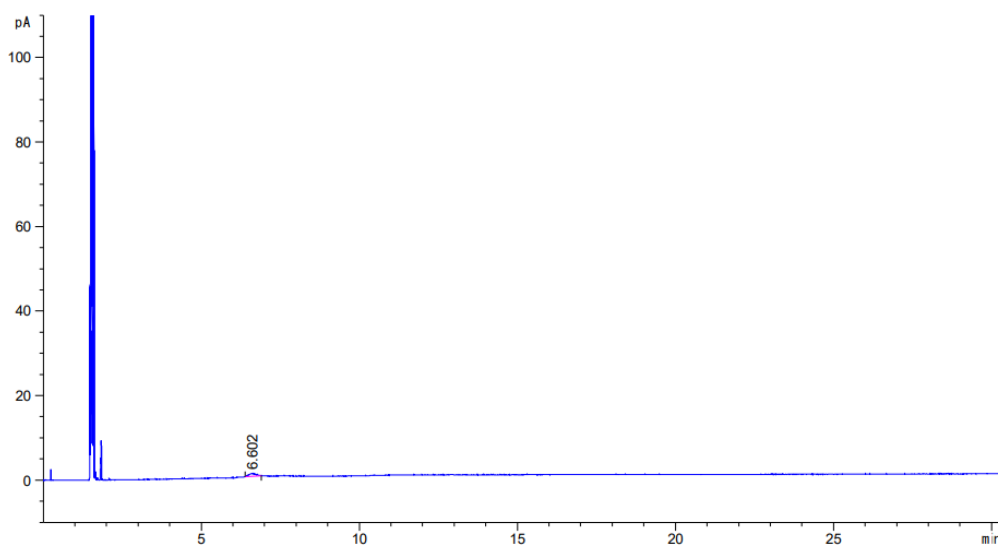
Utjecaj bilo kakvog prijenosa signala analita (engl. *carry-over*) koji se dogodi tijekom analize uzorka potrebno je procijeniti i prijaviti. Detektira se mjerenjem slijepog uzorka zadanom metodom, odnosno propusti se samo otapalo kroz kromatografsku kolonu nakon analize HQC uzorka. Ovo ispitivanje vršilo se tri puta. Prijenos u slijepim uzorcima ne smije biti veći od 20 % odgovora analita na HQC.



Slika 16. *Carry-over* prvo mjerenje.



Slika 17. *Carry-over* drugo mjerenje.

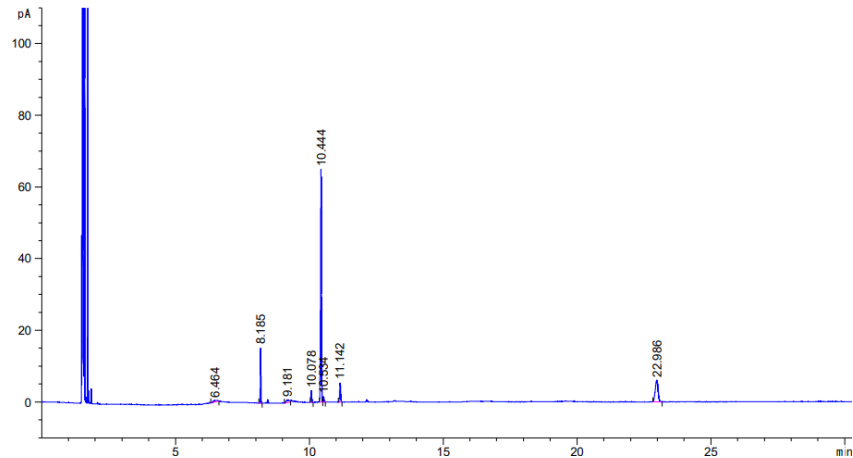


Slika 18. *Carry-over* treće mjerenje.

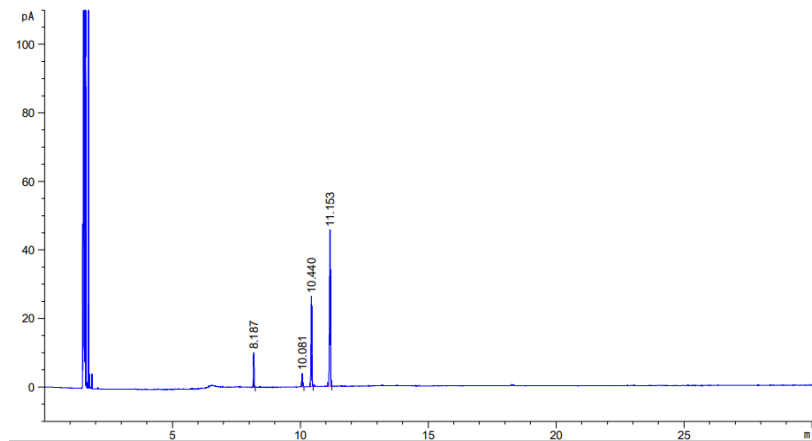
Prikazani kromatogrami ne sadržavaju signale analita što potvrđuje da nije došlo do prijenosa signala. Signal niskog odziva koji eluira na 6,6 minuti vjerojatno je nečistoća u otapalu budući da to vrijeme zadržavanja ne odgovara nijednom od 37 estera masnih kiselina.

3.3. Analiza realnih uzoraka

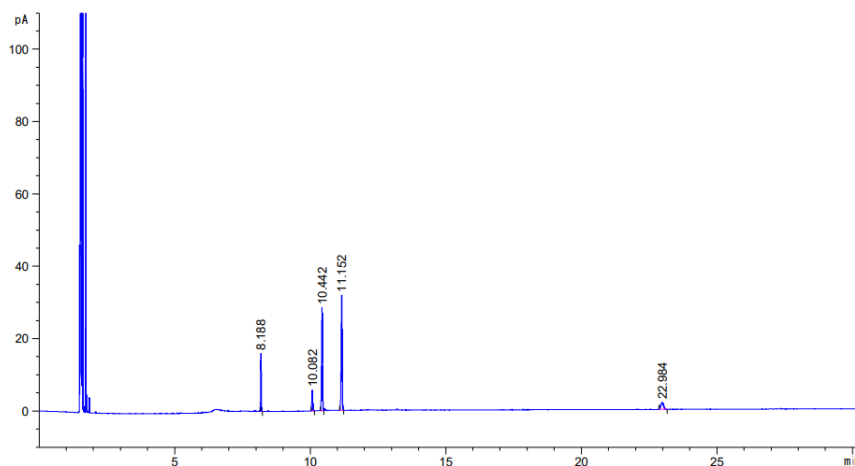
Razvijena metoda ispitana je na uzorcima maslinovog, suncokretovog, bućinog, kokosova i ribljeg ulja čija je priprava opisana u poglavlju 2.4. Uzorci su injektirani automatskim uzorkivačem u GC-FID te su njihovi kromatogrami masnih kiselina s pripadajućim signalima dani na sljedećim slikama.



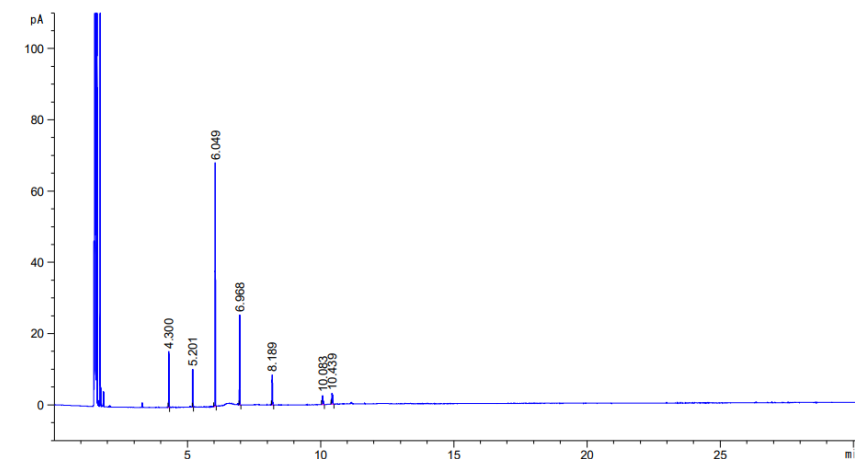
Slika 19. Maslinovo ulje.



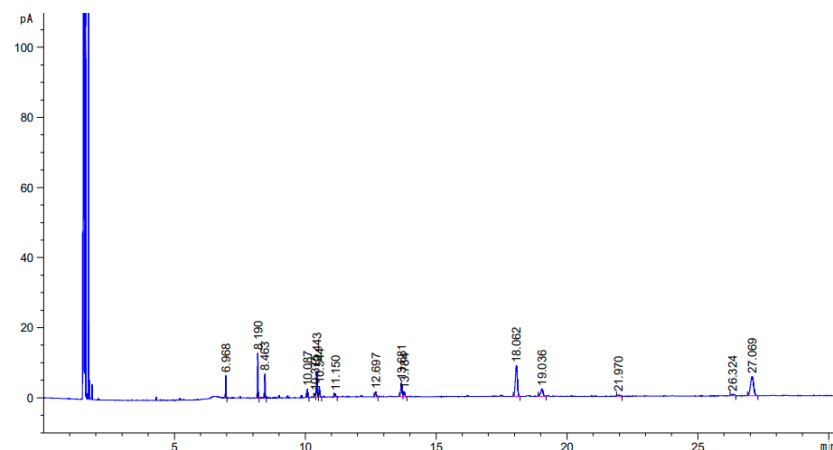
Slika 20. Suncokretovo ulje.



Slika 21. Bučino ulje.



Slika 22. Kokosovo ulje.



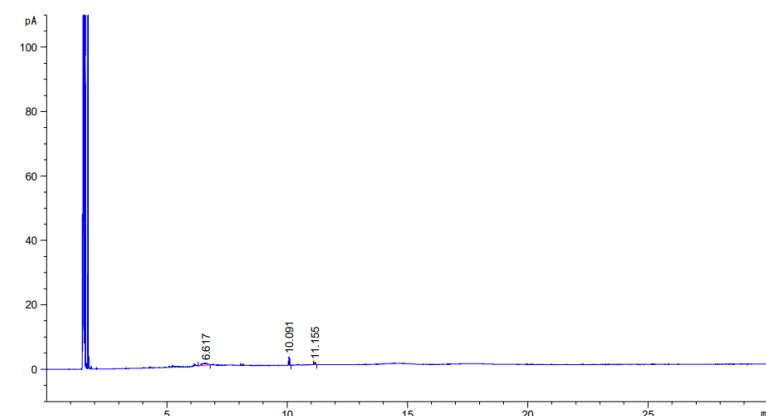
Slika 23. Riblje ulje.

Kromatogram ribljeg ulja na slici 23. potvrđuje da se zamijenio slijed eluiranja estera masnih kiselina C22:6 (n-3) i C24:1 (vidi poglavlje 3.1.). Vidljivo je da najprije izlazi

C22:6 (DHA), a zadnji signal koji predstavlja C24:1 nije detektiran. DHA ovdje ima izraženiji signal jer je jedna od glavnih komponenti ribljeg ulja.

Kromatogrami pokazuju svega par signala niskog odziva koji su se mogli kvalitativno odrediti, dok kvantitativna analiza nije relevantna. Očekivani su bogatiji spektri za odabrane uzorke te se može pretpostaviti da je razlog tomu neuspjela derivatizacija masnih kiselina odnosno da nije u potpunosti izvršena pretvorba masnih kiselina u metilne estere (FAME). Kod same pripreve 2M KOH u metanolu, teško se KOH otapao i ostajao je gusti bijeli talog na dnu tikvice. Iz toga se razloga posezalo za ultrazvučnom kupelji kako bi se poboljšalo otapanje. Mogući problem loše derivatizacije ispitan je na standardima stearinske (C18:0) i linolne (*cis* C18:2) masne kiseline te standardu metil-palmitata kao primjera metilnog estera.

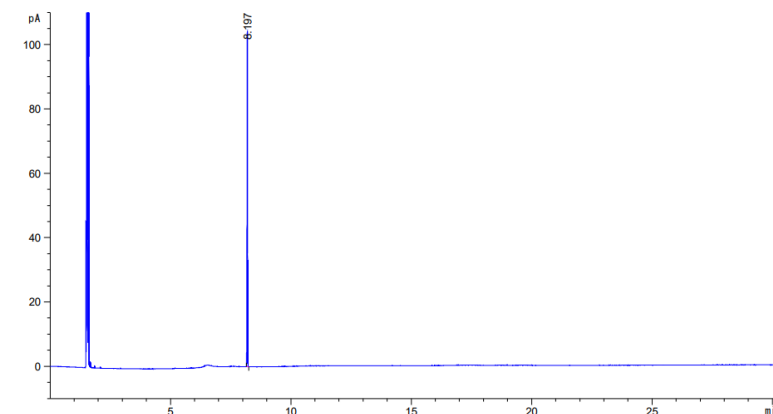
Na slici 24 prikazan je kromatogram standarda stearinske i linolne masne kiseline.



Slika 24. Kromatogram standarda stearinske i linolne masne kiseline.

Uzorci standarda pripremljeni su jednakim principom s istim otopinama kao i uzorci ulja. Zatim su analizirani u GC-FID-u primjenom jednake metode. Ipak, kromatogram pokazuje dosta niske odzive signala za oba standarda. Kako bi se s apsolutnom sigurnošću utvrdilo da je problem derivatizacija, korišten je standard metil-palmitata koji već postoji kao metilni ester te nije potrebno vršiti proces derivatizacije. Pripravljena je otopina metil-palmitata koncentracije 500 $\mu\text{g/mL}$ (unutar raspona) te prenesena u bočicu za analizu u GC-FID-u.

Kromatogram metil-palmitata dan je na slici 25.



Slika 25. Kromatogram standarda metil-palmitata.

Kromatogram na slici 25 pokazuje signal visokog odziva na vremenu zadržavanja koje odgovara metil-palmitatu te je moguća njegova kvantizacija pomoću krivulje umjeravanja. Time je potvrđeno da je razvijena metoda primjenjiva za određivanje metilnih estera masnih kiselina, ali pokazuje da postupak derivatizacije uzoraka ulja nije zadovoljavajuć. S obzirom da se KOH otopio u metanolu potrebno je razviti bolji postupak pripreve 2M KOH u metanolu kako bi se mogla uspješnije provesti metilacija masnih kiselina u estere.

4. ZAKLJUČAK

Plinska kromatografija s plamenoionizacijskim detektorom (GC-FID) prikladna je tehnika za odjeljivanje i određivanje masnih kiselina u obliku metilnih estera masnih kiselina (FAME). Razvijena metoda optimizirana je promjenom temperaturnog programa za uspješno pojedinačno kvalitativno i kvantitativno određivanje 37 masnih kiselina (C4-C24, različitog stupnja zasićenosti). Na odjeljivanje signala behenske kiseline i eikosapentaenske kiseline (EPA) te nervonske kiseline i dokosaheksaenske kiseline (DHA) utjecalo je smanjenje brzine porasta temperature u temperaturnom programu. Navedene masne kiseline promijenile su redoslijed eluiranja s kolone u odnosu na kromatogram dobiven metodom predloženom od strane proizvođača kolone.

Početna otopina standarda 37 masnih kiselina razrijeđena je na sedam različitih koncentracija te su za svih 37 analita konstruirane krivulje umjeravanja i definirani koncentracijski rasponi. Krivulje umjeravanja pokazuju dobru linearnost, s obzirom da se R^2 vrijednosti kreću između 0,9995 - 0,9997.

Ispitivanje točnosti, srednje preciznosti, ponovljivosti i prikladnosti sustava pokazuje zadovoljavajuće rezultate te je time potvrđena primjenjivost metode za određivanje masnih kiselina. Izabrane su četiri koncentracijske razine (LLOQ, LQC, MQC i HQC) koje su se koristile prilikom vrednovanja metode. Točnost metode, iskazuje se u obliku standardne relativne pogreške i prihvatljiva je za sve analite. Preciznost izražena kao ponovljivost i srednja preciznost, iskazuje se relativnim standardnim odstupanjem koje je također prihvatljivo i uglavnom vrlo nisko. Prikladnost sustava iskazana kao ponovljivost injektiranja pokazuje nisku vrijednost standardnog odstupanja (srednja vrijednosti RSD iznosi 0,55 %) dok prijenos analita u slijepim probama nije detektiran. Može se ocijeniti da je sustav prikladan za namjeravanu primjenu.

Razvijena metoda korištena je za analizu realnih uzoraka maslinovog, suncokretovog, bućinog, kokosovog i ribljeg ulja. Dobiveni kromatogrami pokazuju niske odzive i siromašan spektar masnih kiselina u analiziranim uljima. Analizom standarda metilpalmitata potvrđena je prikladnost metode. Međutim, analizom standarda stearinske i linolne masne kiseline, kojoj je prethodila derivatizacija na isti način kao kod uzoraka ulja, nisu dobiveni dobri rezultati. Navedeno ukazuje na problem u procesu prevođenja masnih kiselina u metilne estere i potrebu za modifikacijom postupka derivatizacije prije mjerenja na GC-FID-u. Analizom ribljeg ulja također je potvrđeno da dolazi do promjene u redoslijedu eluiranja određenih masnih kiselina s kolone.

5. LITERATURA

1. URL: <https://www.britannica.com/science/fatty-acid> (14.10.2024.).
2. *A. C. Rustan, C. A. Drevon*, Fatty Acids: Structures and Properties u Encyclopedia od Life Sciences; Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, SAD, (2005.), str. 1-7, doi: [10.1038/npg.els.0003894](https://doi.org/10.1038/npg.els.0003894)
3. *F. D. Gunstone*, Fatty Acid and Lipid Chemistry, **1**, Chapman & Hall Publ., (1996) 1-33, doi: [10.1007/978-1-4615-4131-8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4131-8)
4. *R. Ackman*, Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils, **2**, CRC Press Inc., Boca Raton (1989), str. 104 – 113.
5. *C. C. Akoh, D. B. Min*, Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Food Science and Technology, 3rd Edition, CRC Press Inc, Boca Raton, (2008), str. 3-15.
6. URL: <https://ipi.oregonstate.edu/mic/other-nutrients/essential-fatty-acids> (1.10.2024.).
7. *Nj. Radić, L. Kukoč Modun*, Uvod u Analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 628-663.
8. *D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch*, Principles of Instrumental Analysis, 7. izdanje, Cengage Learning, Boston, (2016.), str. 253 – 273
9. URL: <https://www.britannica.com/science/gas-chromatography> (2.10.2024.)
10. URL: <https://scioninstruments.com/us/blog/gc-fid-gas-chromatography-flame-ionization-detector/> (2.10.2024.)-
11. ICH Harmonised guideline, Bioanalytical method Validation and Study Sample Analysis M10, 2022.
12. ICH Harmonised guideline, Validation of Analytical procedures Q2(R2), 2022.
13. *M. T. Stauffer*, Ed., ‘Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches’. InTech, Apr. 25, 2018. doi: [10.5772/intechopen.69918](https://doi.org/10.5772/intechopen.69918).
14. *H. C. Kofeler*, Nomenclature of Fatty Acids, Encyclopedia of Lipidomics, (2016), str. 1 – 3, doi: [10.1007/978-94-007-7864-1_15-1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_15-1)
15. *G. C. Burdge, P. C. Calder*, Introduction to Fatty Acids and Lipids, Intravenous Lipid Emulsions, World Rev. Nutr: Diet., **112**, Basel, Karger, (2015.), str. 1-16.

16. EU regulation 2568/91, *Official Journal EU*, document L248, 5/9/1991.
17. *Y. Zou, H. Wu*, Improving the Analysis of 37 Fatty Acid Methyl Esters, Application note, Agilent Technologies, Inc. USA, (2023.).
18. *H. Zhang, Z. Wang, O. Liu*, Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids, *J. Pharm. Anal.* **5**, (2015.), str. 223 – 230 doi: [10.1016/j.jpha.2015.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.005)