

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.438>

<https://orcid.org/0000-0002-3676-7110>

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

Birutė Bugelytė

Viršerdvės dujų chromatografija karboksirūgščių ir heksanalio nustatymui

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Chemija (N 003)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2016 – 2022 metais Vilniaus universitete.

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.438>

<https://orcid.org/0000-0002-3676-7110>

VILNIUS UNIVERSITY

CENTER OF PHYSICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

Birutė Bugelytė

Headspace gas chromatography for the determination of carboxylic acids and hexanal

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Chemistry (N 003)

VILNIUS 2022

This dissertation was written between 2016 and 2022 at Vilnius university.

Academic supervisor:

Prof. Dr. Vida Vičkačkaitė (Vilnius university, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1. Viršerdvės dujų chromatografinė analizė.....	11
1.2. Gilūs eutektiniai tirpikliai viršerdvės dujų chromatografinėje analizėje.....	23
1.2.1. Gilių eutektinių tirpiklių tipai.....	25
1.2.2. Gilių eutektinių tirpiklių sintezė.....	27
1.2.3. Gilių eutektinių tirpiklių savybės	28
1.3. Lipidų oksidacijos indikatoriai.....	31
1.3.1. Lipidų oksidacija.....	32
1.3.2. Lipidų oksidacijos nustatymo metodai.....	37
1.3.3. Heksanalis – lipidų oksidacijos indikatorius.....	40
1.4. Karboksirūgštys	42
1.4.1. Karboksirūgščių savybės.....	42
1.4.2. Karboksirūgščių nustatymo metodai.....	46
2. EKSPERIMENTO METODIKA	51
2.1 Reagentai.....	51
2.2 Tirpalai	51
2.3 Mėginiai ir jų paruošimas	52
2.4 Įranga ir aparatūra	53
2.5 Dujų chromatografinės analizės sąlygos nustatant heksanalį.....	54
2.6 Dujų chromatografinės analizės sąlygos nustatant karboksirūgštis ...	55
2.7 Analizės rezultatų įvertinimas.....	55
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	58
3.1 Karboksirūgščių viršerdvės dujų chromatografinė analizė	58
3.1.1. Acto, propano, oksalo ir gintaro rūgščių viršerdvės dujų chromatografinė analizė	58

3.1.2. Pieno, obuolių, citrinų, oksalo ir gintaro rūgšties dujų chromatografinė analizė.....	64
3.2 Heksanolio viršerdvės dujų chromatografinė analizė.....	70
3.2.1. Heksanolio nustatymas augaliniuose aliejuose	70
3.2.2. Heksanolio nustatymas riebalingame maiste.....	78
3.2.3. Heksanolio nustatymas panaudojant mikrobangas ir GET	83
IŠVADOS.....	95
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	99

SANTRUMPOS

BSTFA – bistrimetilsililtrifluoroacetamidas

ChCl – cholino chloridas

DEE – dietileteris

DMF – dimetilformamidas

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazinas

DVDCChA – dinaminė viršerdvės dujų chromatografinė analizė

Eg – etilenglikolis

GET – gilūs eutektiniai tirpikliai (*angl.* deep eutectic solvent)

Glu – gliukozė

Gly – glicerolis

HGET – hidrofobiniai gilūs eutektiniai tirpikliai

KFME – kietafazė mikroekstrakcija

MTBSTFA – N-metil-N-butildimetilsililtrifluoroacetamidas

pAnS – p-anizidino skaičius

PS – peroksidų skaičius

SF – simetriškumo faktorius

SVDCChA – statinė viršerdvės dujų chromatografinė analizė

TBAHS – tetrabutilamonio hidrosulfatas

VA – vandenilinio ryšio akceptorius (*angl.* hydrogen bond acceptor)

VD – vandenilinio ryšio donoras (*angl.* hydrogen bond donor)

VDChA – viršerdvės dujų chromatografinė analizė

ĮVADAS

Daugiausiai laiko ir sąnaudų reikalaujanti analizės procedūra yra mėginio paruošimas. Ruošiant mėginius analizei ypač populiarūs įvairūs ekstrakcijos metodai. Vienas iš populiariausių skystų medžiagų ekstrakcijos būdų – skysčių-skysčių ekstrakcija. Nors tai vis dar plačiai naudojama technologija dėl savo paprastumo, plataus pritaikymo, tačiau šiam metodui reikalingi dideli kiekiai brangių ir toksiškų organinių tirpiklių. Dar sudėtingiau analizuoti kietus mėginius ir atlikti jų ekstrakciją. Tam paprastai atliekama Soksleto ekstrakcija, kuriai taip pat reikalingi dideli tirpiklių kiekiai, ilgas bandinio paruošimo laikas (analitės ilgą laiką yra aukštoje temperatūroje, gali oksiduotis, pakisti). Ypač sudėtinga, kai tiriamos lakios analitės, jas lengva pamesti tiek analizuojant skystus, tiek kietus mėginius.

Pastaruoju metu lakioms analitėms nustatyti iš kietų ir skystų mėginių vis dažniau taikoma viršerdvės dujų chromatografinė analizė (VDChA). Jos metu mėginys kaitinamas uždareme inde. Lakūs mėginio junginiai pereina į dujinę fazę ir pasiekus pusiausvyrą dalis dujinės fazės įleidžiama į dujų chromatografą. Taip išvengiama nelakių mėginio komponentų patekimo į chromatografinę sistemą ir neužteršiama kolonėlė. Atliekant VDChA sunaudojami nedideli tirpiklių kiekiai, reikalingas trumpesnis analizės laikas bei galima pritaikyti aplinkai draugiškus tirpiklius. Šie viršerdvės dujų chromatografinės analizės privalumai pademonstruoti kuriant trumpą anglies grandinę turinčių karboksirūgščių ir heksanalio nustatymo metodus.

Dažnai karboksirūgštys yra aptinkamos riebaluose, citrusiniuose vaisiuose, fermentuotuose maisto produktuose [1-3]. Taip pat, gali būti papildomai pridedamos į maisto produktus kaip konservantai [4]. Paprastai trumpą anglies grandinę turinčios karboksirūgštys nėra normuojamos maisto produktuose, tačiau yra svarbu atsižvelgti į jų kiekius, kadangi šios medžiagos gali turėti įtakos maisto skoniu, tekstūrai, aromatinėms savybėms [5, 6]. Taip pat kai kurios karboksirūgštys gali būti naudojamos kaip žymekliai galiojimo laikui nustatyti. Todėl svarbu kokybiškai ir kiekybiškai įvertinti šias medžiagas.

Augalinės kilmės riebalai yra labai svarbi žmogaus mitybos dalis. Tai svarbus organizmo energijos šaltinis, juose gausu maistinių medžiagų bei vitaminų, kurie yra tirpūs tik riebaluose. Kai kurios nesočiosios riebalų rūgštys organizme nėra sintetinos, todėl yra laikomos nepakeičiamomis ir yra būtina užtikrinti, kad į organizmą su maistu patektų reikiamas kiekis augalinių riebalų [7, 8]. Tačiau nesočiosios riebalų rūgštys linkusios oksiduotis [9]. Dėl jų oksidacijos maistas apkarsta, atsiranda nemalonūs

kvapas, sumažėja maistinė vertė, iškyla grėsmė apsinuodyti lipidų oksidacijos produktais.

Vykstant lipidų oksidacijai, susidaro daugybė lipidų oksidacijos produktų. Svarbiausiu oksidacijos produktu yra laikomas heksanalis, kuris yra antrinis linolo rūgšties oksidacijos produktas. Heksanalis laikomas riebalų oksidacijos indikatoriumi [10]. Atliekant heksanalio analizę galima pritaikyti aplinkai draugiškus tirpiklius ir viršerdvės dujų chromatografinę analizę [11, 12].

Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas – ištirti viršerdvės dujų chromatografijos galimybes nustatant trumpą anglies atomų grandinę turinčias karboksirūgštis bei heksanalį kietose ir skystose matricose ir pritaikyti sukurtas metodikas realių mėginių analizei.

Disertacinio darbo uždaviniai:

1. Parinkti derivatizacijos reagentą ir įvertinti derivatizacijos įtaką acto, propano, oksalo ir gintaro rūgščių chromatografinių smailių formai.
2. Paruošti derivatizuotų oksalo, gintaro, pieno, obuolių ir citrinų rūgščių viršerdvės dujų chromatografinio nustatymo metodikas, palyginti karboksirūgščių nustatymą viršerdvės dujų chromatografijos metodu ir dujų chromatografijos metodu analizuojant tirpalus.
3. Pritaikyti paruoštas karboksirūgščių nustatymo metodikas realių mėginių analizei.
4. Parinkti tirpiklį, tinkamą heksanalio kalibravimo tirpalų gamybai, optimizuoti heksanalio viršerdvės dujų chromatografinės analizės sąlygas ir panaudoti paruoštą metodiką heksanalio nustatymui augaliniuose aliejuose.
5. Ištirti galimybę heksanalio ekstrakcijai iš kietų matricų panaudoti gilius eutektinius tirpiklius (GET).
6. Apjungti heksanalio ekstrakciją iš kietų matricų panaudojant gilius eutektinius tirpiklius ir mikrobangas bei gauto ekstrakto viršerdvės dujų chromatografinę analizę. Paruošti greitą heksanalio nustatymo riebalingame maiste metodiką.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

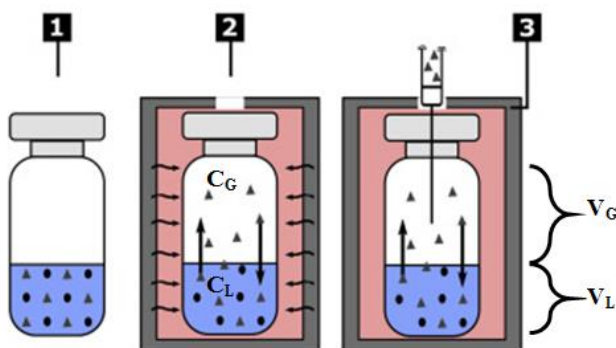
1. Derivatizacija pagerina karboksirūgščių chromatografinių smailių formą.
2. Viršerdvės dujų chromatografija gali būti pritaikyta karboksirūgštims (acto, propano, oksalo, gintaro, pieno, obuolių, citrinų rūgštims) ir heksanaliui nustatyti skystose ir kietose matricose.
3. Gilūs eutektiniai tirpikliai tinka heksanolio ekstrakcijai iš kietų matricų panaudojant mikrobangas.
4. Heksanolio ekstrakcijos mikrobangomis ir viršerdvės dujų chromatografinės analizės apjungimas supaprastina sudėtingų mėginių paruošimo procedūrą ir sutrumpina analizės laiką.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Viršerdvės dujų chromatografinė analizė

Pastaruoju metu analizinėje chemijoje vis dažniau taikoma viršerdvės dujų chromatografinė analizė. Tai metodas, skirtas atskirti lakias medžiagas nuo matricos, kai tiriamoji medžiaga pervedama į virš mėginio esančią dujinę fazę [13]. Analizei mėginys turi būti ruošiamas taip, kad analičių koncentracija viršerdvėje (dujinėje fazėje) būtų kuo didesnė, o kitų matricos komponentų – kuo mažesnė [14].

Viršerdvės dujų chromatografinės analizės metodas gali būti pritaikomas tiek kietiems, tiek skystiems mėginiams analizuoti [15]. Viršerdvės dujų analizės schema pateikiama 1.1 pav.



1.1 pav. Viršerdvės dujų analizės schema [15].

1 – sandarus buteliukas su mėginiu, 2 – mėginio kaitinimas, 3 – lakių junginių surinkimas analizei, C_G – analitės koncentracija dujų fazėje, C_L – analitės koncentracija mėginio fazėje, V_G – dujų fazės tūris, V_L – mėginio fazės tūris.

Mėginys yra talpinamas į sandariai uždaromą stiklinį buteliuką. Buteliukas tam tikrą laiką kaitinamas pasirinktoje temperatūroje. Kaitinant lakūs junginiai dalinai pereina į dujinę fazę, po kurio laiko tarp mėginio bei dujinės fazės nusistovi pusiausvyra. Dujinę fazę labai patogu analizuoti dujų chromatografijos metodu. Toks metodas vadinamas viršerdvės dujų chromatografinė analize [15].

Atliekant viršerdvės dujų chromatografinę analizę, svarbu optimizuoti analičių perėjimui į dujinę fazę įtaką darančius parametrus. Svarbiausi parametrai yra temperatūra ir mėginio tūris. Nuo šių bei kitų parametru priklauso metodo jautrumas bei ekstrakcijos efektyvumas. Šie ir kiti parametrai aptariami 1.1.1 skyrelyje.

1.1.1. Parametrai, turintys įtakos analičių perėjimui į dujinę fazę

Analitės koncentracija viršerdvėje (C_G) yra proporcinga analitės koncentracijai mėginyje (C_o) ir atvirkščiai proporcinga pasiskirstymo koeficiento ir fazių santykio sumai [14]:

$$C_G = \frac{C_o}{K + \beta} \quad (1)$$

C_o – pradinė analitės koncentracija mėginyje;

K – pasiskirstymo koeficientas;

β – dujinės fazės tūrio ir mėginio tūrio santykis.

Kaip matyti iš 1 formulės, vienas iš analitės pasiskirstymą tarp mėginio ir dujinės fazės aprašančių dydžių yra pasiskirstymo koeficientas. Pasiskirstymo koeficientas yra išreiškiamas kaip analitės koncentracijų mėginyje ir dujų fazėje santykis esant pusiausvirai [16]:

$$K = \frac{C_L}{C_G} \quad (2)$$

K – pasiskirstymo koeficientas;

C_L – analitės koncentracija mėginio fazėje;

C_G – analitės koncentracija dujų fazėje.

Tiriamoji medžiaga tuo lengviau ir pilniau pereina į dujinę fazę, kuo pasiskirstymo koeficiento vertė yra mažesnė. Kuo pasiskirstymo koeficiento vertė yra mažesnė, tuo mažesnė ir analitės aptikimo riba.

Didžiausią įtaką pasiskirstymo koeficiento vertei turi **temperatūra**. Paprastai mėginys yra kaitinamas 45 – 150 °C temperatūroje, kuri yra pasirenkama atsižvelgiant į analitę ir matricą [14]. Keliant temperatūrą pasiskirstymo koeficiento vertė mažėja, dujinėje fazėje analitės koncentracija didėja.

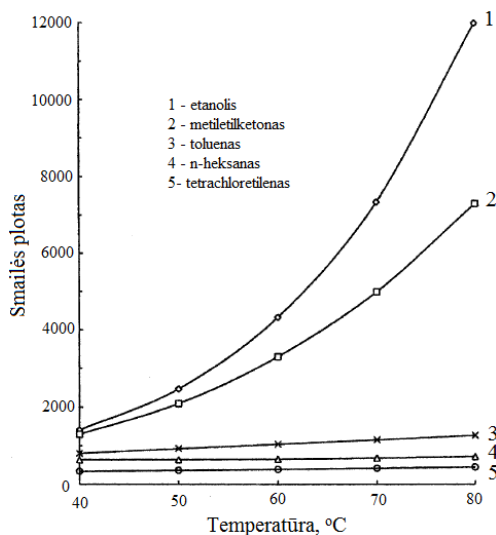
1.1 lentelėje pateikiami kai kurių junginių pasiskirstymo tarp vandens ir oro koeficientai esant skirtingai temperatūrai. Kuo tirpesnė vandenyje medžiaga (kuo didesnė jos K vertė), tuo stipriau tos medžiagos pasiskirstymo koeficientas mažėja keliant temperatūrą (pvz. dioksanas, etanolis). Mažesnė temperatūros įtaka stebima junginiams, kurių K vertė yra maža, pvz., cikloheksanui [17].

1.1 lentelė. Kai kurių junginių pasiskirstymo koeficientai vanduo/oras esant skirtingai temperatūrai [17, 18].

Junginys	40 °C	60 °C	70 °C	80 °C
Dioksanas	1618	642	412	288
Etanolis	1355	511	328	216
n-butanolis	647	238	149	99
Etilacetatas	62,4	29,3	21,8	17,5
Benzenas	2,90	2,27	1,71	1,66
Toluenas	2,82	1,77	1,49	1,27
o-ksilenas	2,44	1,31	1,01	0,99
Dichlormetanas	5,65	3,31	2,60	2,07
n-heksanas	0,14	0,043	0,012	–
Cikloheksanas	0,077	0,040	0,030	0,023

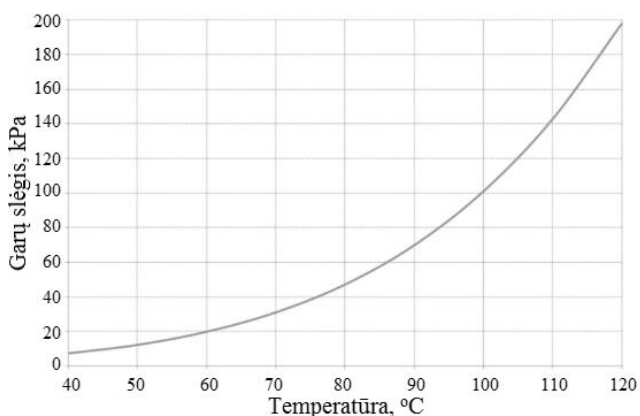
Norint gauti tikslesnius ir geriau atsikartojančius duomenis, svarbu atsižvelgti į naudojamą temperatūrą (ypatingai mėginių, kurių K vertės yra didelės). Pavyzdžiui, jei termostatuojamo buteliuko temperatūra nukrypsta 1 °C nuo nustatytos 60 °C temperatūros etanolio koncentracijos pasikeitimas dujinėje fazėje gali siekti 5 %. Norint gauti tikslesnius ir geriau atsikartojančius duomenis (pvz. apie 0,5 %), buteliuko su mėginiu temperatūra turėtų būti kontroliuojama 0,1 °C tikslumu [18].

B. Kolb ir L. S. Etre [11] nustatinėjo analičių koncentracijas dujinėje fazėje virš vandeninio tirpalo esant skirtingoms temperatūroms. Buvo pasirinktos penkios analitės: etanolis, metiletilketonas, toluenas, tetrachloretilenas ir n-heksanas. Šių junginių pasiskirstymo koeficientai smarkiai skyrėsi (buvo atitinkamai 1355; 139,5; 2,82; 1,48 ir 0,14 kai temperatūra 40 °C). Tyrimui naudota po 5 ml mėginio ($\beta = 3,46$), o pasirinktos tokios analičių koncentracijos, kad esant 40 °C temperatūrai analičių smailių plotai būtų panašūs. Keičiant temperatūrą, pradinė analitės koncentracija (C_0) išliko tokia pati kiekvienam matavimui. Kaip matyti iš 1.2 pav., temperatūros kėlimas reikšmingai padidino polinių junginių (etanolio, metiletilketono) koncentraciją dujinėje fazėje. Šie junginiai pasižymėjo didelėmis K vertėmis. Tuo tarpu junginiams, kurių K vertės mažos, dujinėje fazėje esančių junginių koncentracijai temperatūros įtaka nebuvo žymi.



1.2 pav. Etanolio (1), metiletiketonas (2), tolueno (3), n-heksano (4) ir tetrachloretileno (5) kiekis dujinėje fazėje esant skirtingai temperatūrai [11].

Nors temperatūros didinimas yra veiksmingas būdas padidinti analitės koncentraciją viršerdvėje, tačiau tiek pateiktame, tiek kituose tyrimuose gali būti naudojami mėginiai, kuriuose yra vandens. Atliekant tokių mėginių viršerdvės dujų chromatografinę analizę ir didinant temperatūrą, didėja ir vandens garų kiekis viršerdvėje. Vandens garų slėgio priklausomybė nuo temperatūros pavaizduota 1.3 pav. Matyti, kad esant 40 °C temperatūrai vandens garų slėgis nedidelis, tačiau pasiekus 80 °C temperatūrą, garų slėgis padidėja apie penkis kartus.

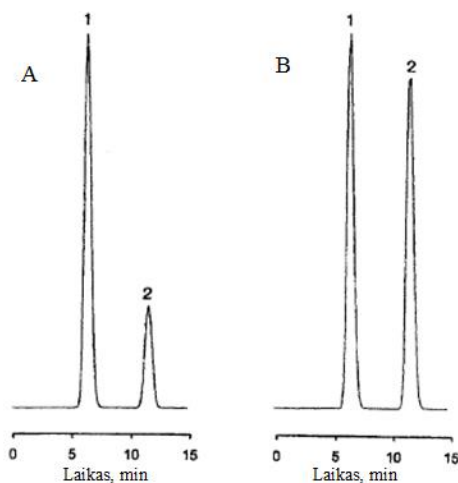


1.3 pav. Vandens garų slėgio priklausomybė nuo temperatūros [11].

Tiek vanduo, tiek kitas lakus tirpiklis padidinus temperatūrą gali sukurti didelį garų slėgį. Susidaręs per didelis slėgis gali sąlygoti dujinės fazės nuotekį arba sukelti priešlaikinį viršerdvėje esančių garų įpurškimą į dujų chromatografą, todėl chromatogramoje gali būti fiksuojamos dvigubos smailės [18].

Pasiskirstymo koeficiento vertė taip pat gali pakisti (dažniausiai sumažėti) į tiriamą mėginį pridėnant **druskų ar tirpiklių** [14, 19, 20]. Pridėjus druskų, tirpalo joninė jėga padidėja, hidrofobinių analizių tirpumas vandenyje sumažėja ir analitės koncentracija viršerdvėje padidėja [14].

Dažnai naudojamos neorganinės druskos, pvz. amonio sulfatas, natrio chloridas, amonio chloridas ir kt. 1.4 pav. pateikiamos cikloheksano ir 1,4-dioksano chromatogramos, gautos termostatuojant mėginį 60 °C temperatūroje, naudojant tą patį mėginio tūrį – 5 ml ir pridėnant po 2 g NaCl bei papildomai nenaudojant druskų. 1,4-dioksano atveju NaCl pridėjimas padidino smailės plotą 3,22 karto, o tuo tarpu cikloheksano smailės plotas padidėjo tik 1,3 % [11]. Cikloheksano *K* vertė yra artima nuliui (žr. 1.1 lentelę) ir šiuo atveju didesnės įtakos turi mėginio tūris. Tuo tarpu 1,4-dioksanas yra poliškesnis junginys ir druskų pridėjimas turi didesnės įtakos.



1.4 pav. Cikloheksano(1) ir 1,4-dioksano (2) vandeninių tirpalų viršerdvės chromatogramos gautos nenaudojant druskų (A) ir pridėjus 2 g NaCl (B) [11].

Druskų pridėjimas gali reikšmingai padidinti polinių junginių koncentraciją viršerdvėje, tačiau turi būti naudojamos didelės druskų

koncentracijos (1 M arba daugiau). Paprastai druskų įtaka nustatoma empiriškai kiekvienai analitei [11].

Panašus efektas stebimas pridėjant vandens į mėginius, kurie yra organiniame tirpiklyje. Šiuo atveju organinis tirpiklis turi maišytis su vandeniu. Dažniausiai tiriami organiniai junginiai geriau tirpsta organiniuose tirpikliuose nei vandenyje, todėl šių junginių pasiskirstymo koeficientas organiniame tirpiklyje yra didesnis ir viršerdvėje susidaro mažesnė koncentracija. Pridėjus vandens, tirpumas sumažėja (mažėja ir pasiskirstymo koeficientas) ir viršerdvėje padidėja organinių junginių koncentracija [11]. Pavyzdžiui, tiriant alkoholius (C2-C5) ištirpintus dimetilformamide (DMF) ir pridėjant skirtingą vandens kiekį galima viršerdvėje padidinti tiriamų alkoholių koncentraciją. Atitinkamai esant DMF ir vandens santykiui 60:40, tiriamų analičių smailės plotas padidėja nuo 1,3 iki 6,2 karto [11].

Dar vienas reikšmingas analičių pasiskirstymą tarp mėginio ir dujinės fazės parametras yra *tirpiklis*, kuriame disperguotas ar ištirpintas mėginys. Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas alternatyviems tirpikliams, pvz. joniniams skysčiams ar giliems eutektiniams tirpikliams. Šie tirpikliai gali būti gera ir saugi alternatyva tradiciniams organiniams lakiesiems tirpikliams [20]. Plačiau apie GET rašoma 1.2 skyriuje.

Kitas svarbus analičių perėjimą į dujinę fazę įtaką darantis veiksnys yra dujinės ir mėginio **fazių santykis β** [21]. Jis yra aprašomas formule:

$$\beta = \frac{V_G}{V_S} \quad (3)$$

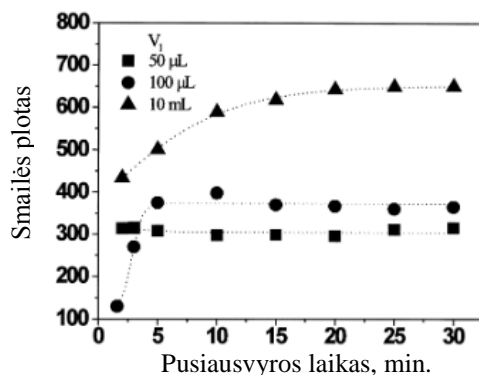
β – dujinės fazės tūrio ir mėginio tūrio santykis;

V_G – dujinės fazės tūris;

V_S – mėginio tūris.

Dažniausiai kuo didesnis mėginio tūris (mažesnės β vertės), tuo didesnis atsakas. Tačiau fazių santykio įtaka labai priklauso nuo analizuojamo mėginio komponentų. Kai analizė gerai tirpi mėginyje (jos K didelis), o mėginyje daug junginių, linkusių pereiti į dujinę fazę (jų K maži), gali būti, kad esant didesniam mėginio tūriui, dujinėje fazėje esanti didelė pašalinių lakių junginių koncentracija trukdys mažiau lakiai analitei pereiti į viršerdvę ir analizės koncentracija viršerdvėje sumažės. Be to esant didesniam mėginio tūriui reikalingas ilgesnis pusiausvyros tarp mėginio fazės ir dujinės fazės nusistovėjimo laikas [11].

Analitės pusiausvyros nusistovėjimo tarp mėginio ir viršerdvės laikas pasiekiamas greičiau, kai mėginys yra kaitinamas arba naudojamas mažesnis mėginio tūris [14, 22]. Kaip matyti iš 1.5 pav., analizei naudojant mažesnius mėginio tūrius pusiausvyra tarp mėginio ir viršerdvės pasiekama greičiau. Tačiau naudojant didesnius mėginio tūrius, fiksuojamos didesnės analitės koncentracijos [22]. Todėl yra svarbu parinkti tinkamą mėginio tūrį, kad būtų gaunamos pakankamos analičių koncentracijos ir optimalus pusiausvyros nusistovėjimo laikas.



1.5 pav. Metanolio smailės ploto priklausomybė nuo pusiausvyros nusistovėjimo laiko esant skirtingam mėginio tūriui [22].

Kaip matyti iš 1 formulės, junginio koncentracija viršerdvėje yra proporcinga pradinei koncentracijai mėginyje ir atvirkščiai proporcinga K ir β verčių sumai. Jei K vertė yra maža (junginys linkęs pereiti į viršerdvę), tai β vertė (mėginio tūris) turi reikšmingos įtakos analitės koncentracijai viršerdvėje. Ir atvirkščiai, jei K vertė yra didelė (junginys nelinkęs pereiti į viršerdvę), tuomet β neturės reikšmingos įtakos [11]. Galima išskirti kelias mėginių grupes:

- Jei $K = 0,20$ ir buteliukas užpildomas mėginiu iki 80 % jo tūrio, analitės koncentracija viršerdvėje gali būti 10 kartų didesnė nei tada, kai buteliukas užpildomas mėginiu tik 20 %.
- Kai $K = 1,0$, analitės koncentracija viršerdvėje kinta keičiant mėginio tūrį. Galimas keturių kartų skirtumas kai buteliukas mėginiu užpildomas 20 arba 80 %.
- Kai $K = 20$, keičiant mėginio tūrį analitės koncentracija viršerdvėje gali skirtis 1,18 karto.

- Kai $K = 250$, analitės koncentracija viršerdvėje praktiškai nekinta. Didesnis mėginio tūris gali padidinti analitės koncentraciją viršerdvėje tik 1,02 karto.

Cikloheksanas ir dioksanas yra junginiai, kurie turi skirtingas K vertes (žr. 1.1 lentelę). Atliktas tyrimas [11] kai termostatuojant $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje cikloheksaną ir dioksaną bei naudojant skirtingus mėginio tūrius – 1 ir 5 mL, dioksano smailės ploto vertė pakinta tik 1,3 %, o cikloheksano net 5,5 karto. Galima pastebėti, kad naudojant junginius, kurių K vertė yra maža, mėginio tūrio parinkimas yra svarbus parametras ir turi reikšmingos įtakos analizės rezultatams.

Apibendrinant: norint pasiekti gero analizės rezultatų pasikartojamumo, būtina išlaikyti tas pačias ekstrakcijos į dujinę fazę sąlygas (temperatūrą, mėginio matricą, mėginio ir dujinės fazės tūrį bei kita).

1.1.2. Dujinės fazės chromatografinės analizės būdai

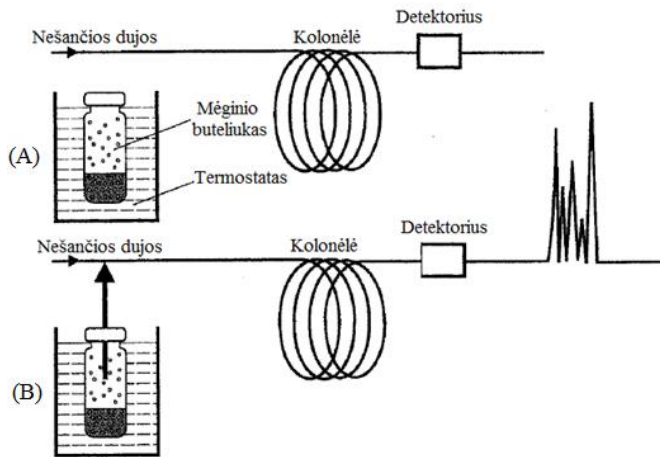
Kaip jau buvo minėta, dujinę fazę labai patogu analizuoti dujų chromatografijos metodu. Viršerdvės dujų chromatografinė analizė gali būti skirstoma į statinę (SVDChA) arba dinaminę (DVDChA) viršerdvės dujų chromatografinę analizę [14]. Šie analizės metodai yra gana paprasti ir laikoma, kad tai vieni iš metodų, kurie atitinka žaliosios chemijos standartus. Todėl jie sulaukia vis didesnio susidomėjimo. Prieš atliekant dujų chromatografinę analizę, dujinėje fazėje esančias analites galima sukonzentruoti. Tam taikomi miniatiurizuoti sukonzentravimo būdai, pvz. kietafazė mikroekstrakcija (KFME) ar mikroekstrakcija tirpiklio lašu [23, 24].

1.1.3. Statinė viršerdvės dujų chromatografinė analizė

Paprastas viršerdvės dujų chromatografinės analizės metodas yra SVDChA. Tai vieno žingsnio dujų analizė. Dujinėje fazėje esanti analizė tiesiogiai įvedama į dujų chromatografą [14]. Tai galima atlikti naudojant specialų švirkštą [25]. Nors tai paprastas ir didelių išlaidų nereikalaujantis metodas, tačiau gana netikslus. Šiuo būdu atliekant analizę yra gaunamas prastas rezultatų atsikartojamumas. Dalis analitės gali būti prarandama ištraukus švirkštą iš indelio ir pernešant jį į chromatografą. Be to, analizė gali kondensuotis šaltame švirkšte.

Naudojant automatinį mėginio įleidimą, palaikoma tiksli mėginio kaitinimo bei mėginio paėmimo adatos temperatūra, todėl reikiamas mėginio tūris paimamas tiksliau, mėginys į chromatografą įvedamas greičiau ir

gaunami tikslesni ir geriau pasikartojantys rezultatai [14]. Supaprastinta SVDCChA schema pateikiama 1.6 pav.



1.6 pav. SVDCChA schema. (A) mėginio termostatavimas, (B) mėginio įleidimas [11, 25].

Kaip matyti iš 1.4 (A) pav., pirmiausiai mėginys yra termostatuojamas. Pasiekus pusiausvyrą, mėginio paėmimo adata praduria mėginio indelį dengiančią tarpinę. Tuomet į indelį yra paduodamos inertinės dujos (žr. 1.4 (B) pav.) ir sukuriamas 1,5 – 2 atmosferų slėgis. Po 1 – 2 minučių suspausta dujinė fazė įleidžiama į dujų chromatografą [25]. Įprastai dujinė fazė dozuoja kilpa. Šiuo atveju, norint pakeisti įleidžiamo mėginio tūrį, reikia keisti kilpą. PerkinElmer pasiūlė slėgiu reguliuojamą mėginio įleidimą (žr. 1.7 pav.) [26].

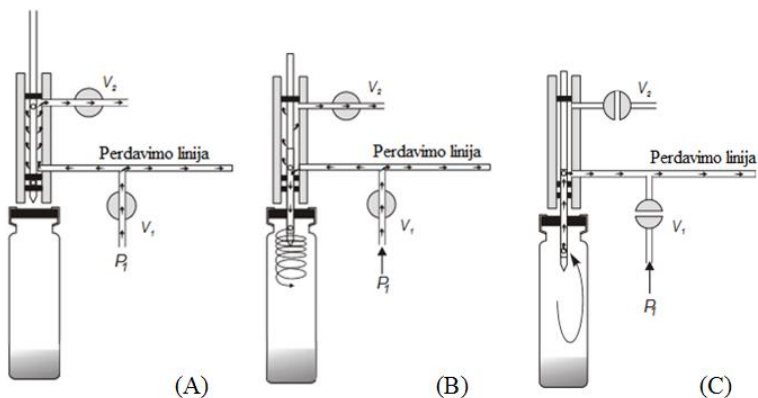
Slėgiu reguliuojamas mėginio įleidimas užtikrina greitą analičių perdavimą į dujų chromatografą nenaudojant švirkšto. Naudojama sistema (adata) yra sandari ir taip išvengiama viršerdvės dujų praradimo. Mėginio įleidimas vyksta trimis etapais [27]:

1. *Termostataavimo etapas.* Jo metu (parengties režime) mėginio paėmimo adata yra pakelta. Nešančios dujos praeina per solenoidinį vožtuvą V_1 į kolonėlę bei tuo pačiu metu nedideliu kryžminiu srautu praeina per adatos cilindrą ir praleidžiamos per jį solenoidiniu vožtuvu.

2. *Suslėgimo etapas.* Pasibaigus termostataavimo etapui, mėginio paėmimo adata pasilenka į apačią ir praduria mėginio buteliuko pertvarą. Nešančios dujos patenka į buteliuko viršutinę sritį, sudarydamos slėgį.

3. *Mėginio įleidimo etapas.* Po slėgio sudarymo etapo solenoidiniai vožtuvai V_1 ir V_2 yra uždaromi ir sustabdomas nešančių dujų srautas į mėginio viršerdvės sritį. Buteliuke esančios dujos plečiasi ir keliauja į

kolonėlę (SVDChA atveju) arba gaudyklę (DVDChA atveju). Praėjus nustatytam įleidimo laikui, solenoidiniai vožtuvai V_1 ir V_2 atidaromi.

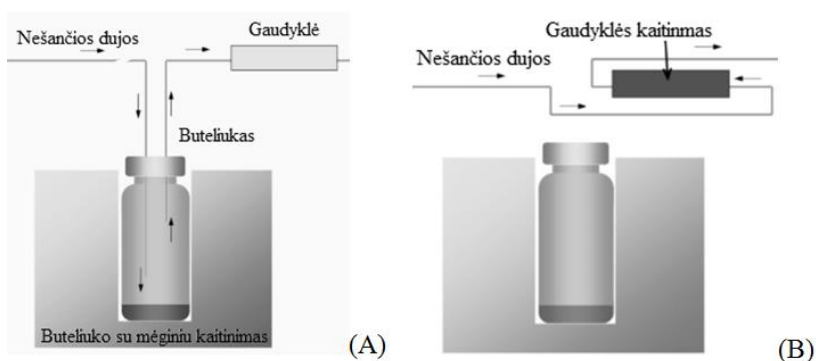


1.7 pav. Slėgiu reguliuojamas mėginio įleidimas pagal PerkinElmer technologiją: (A) termostataavimo, (B) suslėgimo ir (C) mėginio įleidimo etapai. V_1 ir V_2 – solenoidiniai vožtuvai, P1 – nešančiųjų dujų srautas [27].

Nepriklausomai nuo to, koku būdu į chromatografą įvedamas dujinis mėginys, statinės viršerdvės analizės metodo privalumai yra jo paprastumas ir greitis, o pagrindinis trūkumas – gana mažas jautrumas.

1.1.4. Dinaminė viršerdvės dujų chromatografinė analizė

Siekiant, kad analizės jautrumas būtų kuo didesnis galima naudoti dinaminę viršerdvės dujų chromatografinę analizę. Šiuo atveju indelio su mėginiu tarpinė praduriama dviem adatomis [18]. Supaprastinta DVDChA schema pateikiama 1.8 pav.



1.8 pav. Dinaminės viršerdvės dujų chromatografinės analizės schema: (A) viršerdvės dujų patekimas į gaudyklę, (B) gaudyklės kaitinimas [18].

Viena adata naudojama įleisti inertines dujas į indelį, o kita – dujoms išeiti. Kitaip nei statinės viršerdvės dujų analizės metu, išėjusios dujos patenka į gaudyklę, kurioje yra sulaikomos (žr. 1.8 (A) pav.). Gaudyklėje tiriamoji analizė yra sukoncentruojama. Baigus leisti dujas, gaudyklę kaitinama, analizės termiškai desorbuojamos ir nešančių dujų srauto nunešamos į dujų chromatografą, kur toliau atliekama analizė (žr. 1.8 (B) pav.) [6].

Net dirbant žemesnėse temperatūrose dinaminė viršerdvės dujų chromatografinė analizė leidžia pasiekti mažas aptikimo ribas ir tuo pačiu išvengti mėginių terminės degradacijos.

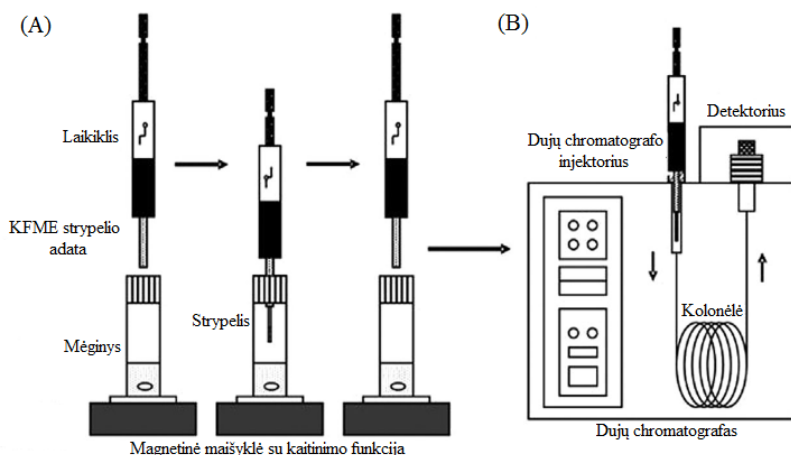
Atliekant DVDC_{hA} reikia optimizuoti ekstrakcijos temperatūrą, mėginio tūrį, praeinančių pro mėginį dujų tūrį. Taip pat svarbu parinkti tinkamą gaudyklės sorbentą [14].

1.1.5. Mikroekstrakcija viršerdvės dujų chromatografinėje analizėje

Kai matricos sudėtingos, o analičių koncentracijos mažos, analizėms sukoncentruoti vis dažniau naudojama mikroekstrakcija – kietafazė mikroekstrakcija ir mikroekstrakcija tirpiklio lašu.

Kietafazė mikroekstrakcija – tai gana paprastas, efektyvus metodas, kurį pasiūlė C. L. Arthur ir J. Pawliszyn [28]. Šis metodas remiasi analičių pasiskirstymu tarp mėginio ir kieto sorbento. Po ekstrakcijos mėginys desorbuojamas ir pasirinktu metodu analizuojamas. KFME yra miniatiūrizuotas kietafazės ekstrakcijos variantas.

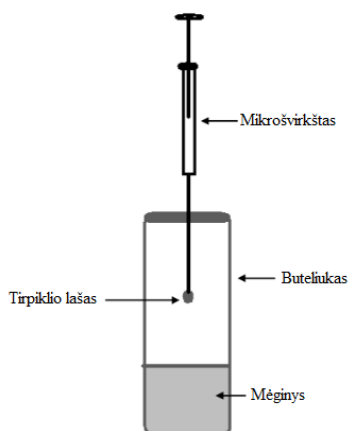
KFME prietaisas sudarytas iš kvarcinio strypelio, padengto polimeriniu sorbentu [29]. Strypelis pritvirtintas prie stūmoklio, įtaisyto nerūdijančio plieno adatoje, kuri tvirtinama prie prietaiso korpuso (žr. 1.9 pav.). Ekstrakcijai atlikti adata praduriama indelį su mėginiu dengianti tarpinė, sorbentu padengta strypelio dalis išstumiamą iš adatos į dujinę fazę. Nusistovėjus analičių pusiausvyrai tarp mėginio, dujinės fazės ir strypelio dangos, strypelis įtraukiamas į adatą, adata ištraukiamą iš mėginio indelio, ja praduriama chromatografo garintuvo tarpinė. Strypelis su sorbentu įstumiamas į karštą garintuvą, kuriame įvyksta analičių terminė desorbcija. Norint, kad metodas būtų efektyvus, būtina nustatyti optimalias sąlygas, t. y. ekstrakcijos ir desorbcijos temperatūrą, analizuojamo tirpalo pH vertę, maišymo greitį, joninę jėgą, ekstrakcijos ir desorbcijos trukmę bei pasirinkti tinkamą dangą.



1.9 pav. Kietafazės mikroekstrakcijos principinė schema: (A) ekstrakcija, (B) desorbcija ir įleidimas [30].

Kitas viršerdvės dujų analizėje naudojamos mikroekstrakcijos variantas yra ekstrakcija tirpiklio lašu. Tai 1996 metais pasiūlytas metodas [31]. Ekstrakcija tirpiklio lašu yra paprastas ir pigus metodas, kadangi nereikia jokios papildomos įrangos, sunaudojami nedideli kiekiai ekstrahento (dažniausiai 1 μ l). Tinkamai pasirinkus ekstrahentą, pasiekiamas didelis ekstrakcijos atrankumas bei analitės gerai sukonzentruojamos.

Ekstrakcija tirpiklio lašu dažniausiai atliekama praduriant mėginio indelio tarpinę su adata (žr. 1.10 pav.). Iš mikrošvirkšto adatos tiesiogiai išspaudžiamas tirpiklio lašas į dujinę fazę (ekstrakciją galima atlikti ne tik iš viršerdvės, bet ir tiesiogiai iš tirpalo). Nusistovėjus pusiausvyrai tarp mėginio, dujinės fazės ir tirpiklio lašo, tirpiklio lašas įtraukiamas atgal į adatą. Adata ištraukiama iš ekstrakcijos indelio ir ja praduriama chromatografo garintuvo tarpinė. Tirpiklio lašas įleidžiamas į garintuvą ir atliekama chromatografinė analizė.



1.10 pav. Ekstrakcijos tirpiklio lašu viršerdvėje schema [23].

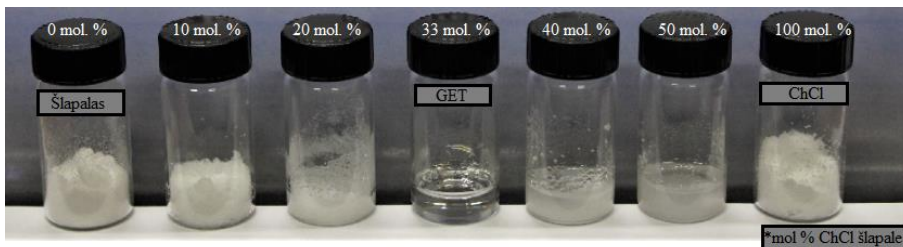
Kaip ir kietafazės mikroekstrakcijos atveju mikroekstrakcijai tirpiklio lašu įtakos turi ekstrakcijos ir dujų chromatografo garintuvo temperatūra, analizuojamo tirpalo pH vertė, maišymo greitis, joninė jėga, ekstrakcijos trukmė, pasirinktas ekstrahentas, ekstrahento tūris [32].

1.2. Gilūs eutektiniai tirpikliai viršerdvės dujų chromatografinėje analizėje

Šiuolaikinėje analizėje ekstrakcija tirpikliais yra viena iš dominuojančių medžiagų išskyrimo ir sukonzentravimo metodų. Tradiciniai organiniai tirpikliai dažniausiai yra lakūs bei toksiški. Todėl pastaraisiais metais ypač daug dėmesio skiriama naujų, mažiau toksiškų, efektyvesnių ir atrankesnių tirpiklių paieškai. Vis didesnį populiarumą įgauna naujos klasės junginiai – gilūs eutektiniai tirpikliai, kurie pasižymi labai pigia ir paprasta sinteze, aukšta virimo temperatūra, žemu garų slėgiu bei yra draugiški aplinkai. Keičiant sudedamąsias dalis, galima pagaminti įvairiausių savybių tirpiklius.

Gilūs eutektiniai tirpikliai yra tirpikliai, kurie gaunami maišant du junginius, kurie vienas su kitu sąveikauja sudarydami vandenilinius ryšius ir taip suformuodami eutektinį tirpiklį, kurio lydymosi temperatūra yra žymiai žemesnė, nei kiekvieno jo atskiro komponento lydymosi temperatūros. Pirmasis tai pastebėjo ir aprašė A. P. Abbott su bendraautoriais [33]. Jie užfiksavo mišinio lydymosi temperatūros sumažėjimą, kai buvo kaitinamas cholino chlorido (ChCl) ir ZnCl_2 mišinys. Tyrimo metu buvo nustatyta žemiausia lydymosi temperatūra ($23 - 25\text{ }^\circ\text{C}$), kai kietos agregatinės būsenos druskos virsta skystu mišiniu. Gavus šiuos rezultatus, tyrimas buvo

praplėstas ir toliau ištirti kiti eutektiniai mišiniai. 1.8 pav. pateikiamas gilaus eutektinio tirpiklio, sudaryto iš cholino chlorido ($T_L \approx 302 \text{ }^\circ\text{C}$) ir šlapalo ($T_L \approx 133 \text{ }^\circ\text{C}$), nuotrauka esant skirtingiems medžiagų santykiams. Žemiausia lydymosi temperatūra ($12 \text{ }^\circ\text{C}$) pasižymėjo mišinys, kuriame ChCl-šlapalo santykis buvo 1:2. Kambario temperatūroje šis mišinys yra skystis [34].



1.11 pav. ChCl ir šlapalo mišinių nuotrauka esant skirtingiems medžiagų santykiams ($T = 29,85 \text{ }^\circ\text{C}$) [34].

Dėl panašių fizikinių savybių gilūs eutektiniai tirpikliai dažnai priskiriami joniniams skysčiams. Tiek GET, tiek joniniai skysčiai pasižymi dideliu terminiu stabilumu, mažu lakumu, nedideliu garų slėgiu. Tačiau jų cheminės savybės yra skirtingos. Gilūs eutektiniai tirpikliai yra lengviau sintetinami, o atliekama sintezė yra pigi [35]. Dažnai gautas GET mišinys ir jį sudarantys atskiri komponentai lengvai suyra gamtoje ir yra mažiau toksiški nei joniniai skysčiai [12]. Nors joninių skysčių ir gilių eutektinių tirpiklių savybės panašios, tačiau būtina atskirti, jog tai yra dvi skirtingos tirpiklių rūšys [36].

Pastaruoju metu gilių eutektinių tirpiklių pritaikymas analizėje plečiasi. GET analizėje naudojami [37]:

- 1) (mikro)ekstrakcijai;
- 2) nanodalelių ir silicio dioksido modifikavimui siekiant pagerinti ekstrakcijos efektyvumą;
- 3) kietų mėginių tirpinimui;
- 4) chromatografijoje naudojami kaip judrios fazės priedas ar modifikatoriai.

VDChA gilūs eutektiniai tirpikliai dažniausiai yra naudojami kaip ekstrahentai miniaturizuotuose variantuose bei kaip nauji sorbentai kietafazėse mikroekstrakcijose [27].

B. Tang ir bendraautorių darbe [38] aprašyta viršerdvės dujų chromatografinė analizė, kai naudojama mikroekstrakcija skysčiais. Kaip ekstrahuojantis tirpiklis naudojamas GET sudarytas iš etilenglikolio ir

cholino chlorido. Šios analizės metu analizuoti lakūs bioaktyvūs terpenoidai: linalolis, α -terpineolis ir terpinilo acetatas. Taip pat gilūs eutektiniai tirpikliai sudaryti iš cholino chlorido ir vandenilio ryšio donoro (oksalo rūgštis, šlapalo, glicerolio) buvo pritaikyti viršerdvės dujų chromatografinėje analizėje apjungtoje su mikroekstrakcija tirpiklio lašu. Naudojant šiuos GET buvo atlikta policiklinių aromatinių angliavandenilių ekstrakcija iš vandeninių mėginių. Atliekant ekstrakciją buvo naudojama 50 °C temperatūra ir 2000 aps./min. maišymo greitis [39].

J. Nie ir bendraautorių darbe [40] panaudojant gilius eutektinius tirpiklius sudarytus iš etilenglikolio ir CHCl_3 , buvo analizuojami lakūs organiniai junginiai tabake. Šiame darbe dar papildomai naudojama ekstrakcija mikrobangomis ir kietafazė mikroekstrakcija.

Z. Triaux ir bendraautorių darbe [41] taip pat pateikiamas GET pritaikymas viršerdvės dujų chromatografinėje analizėje. Šiame darbe aprašomas gilių eutektinių tirpiklių pritaikymas analizuojant terpenus tokiose prieskoniuose kaip cinamonas, kmynai, pankoliai, gvazdikėliai, čiobreliai ir muskato riešutai.

Dauguma analizių, kurių metu yra naudojami gilūs eutektiniai tirpikliai, atitinka žalosios chemijos standartus. Gilūs eutektiniai tirpikliai pasižymi geru ekstrakcijos efektyvumu, gali būti pritaikyti sudėtingoms matricoms analizuoti [39].

1.2.1. Gilių eutektinių tirpiklių tipai

2014 metais A. P. Abbott ir bendraautoriai pasiūlė bendrą formulę, aprašančią GET: $\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zY}$ (1) [42]. Cat^+ yra amonio, fosfonio arba sulfonio katijonas, o X^- dažniausiai halogenido anijonas. Y gali būti Luiso bazė arba Brionstedo rūgštis, o z yra Y molekulių skaičius, kuris reaguoja su anijonu.

Nemažai tyrinėti GET, į kurių sudėtį įeina ketvirtiniai amonio ir imidazolio katijonai, bet ypatingai didelis dėmesys skiriamas praktiškesniems tirpikliams, kurie sudaryti naudojant cholino chloridą. Priklausomai nuo eutektinio tirpiklio komponentų galima išskirti keturis eutektinių tirpiklių tipus [35]:

I tipas: $\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x$, kur $M = \text{Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In}$.

II tipas: $\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x \cdot y\text{H}_2\text{O}$, kur $M = \text{Cr, Co, Cu, Ni, Fe}$.

III tipas: $\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zRZ}$, kur $Z = \text{CONH}_2, \text{COOH, OH}$.

IV tipas: $\text{MCl}_x + \text{RZ} = \text{MCl}_{x-1}^+\cdot\text{RZ} + \text{MCl}_{x+1}^-$, kur $M = \text{Al, Zn}$, o $Z = \text{CONH}_2, \text{OH}$.

Gilūs eutektiniai tirpikliai sudaryti iš ketvirtinės amonio druskos ir metalo halogenido komplekso (MCl_x) yra priskiriami I tipui. Nehidratuoti metalų halogenidai turi žemą lydymosi temperatūrą, tačiau jų panaudojimo galimybės yra nedidelės dėl tirpumo vandenyje. Amonio druskos ir hidratuotų metalo druskų kompleksai yra priskiriami II tipui. Dėl palyginti nedidelės hidratuotų metalų druskų kainos ir atsparumo drėgmei/orui šio tipo gilūs eutektiniai tirpikliai yra perspektyvūs pramoniniuose procesuose [42].

Gilių eutektinių tirpiklių III tipas dažniausiai yra formuojamas iš cholino chlorido ir vandenilio ryšio donoro. Šio tipo GET pasižymi savybe ištirpinti kai kuriuos pereinamųjų metalų junginius, įskaitant chloridus ir oksidus [43, 44]. III tipo gilių eutektinių tirpiklių vandenilio ryšio donorais gali būti organinės medžiagos, pvz. amidai, karboksirūgštys, alkoholiai. Gauti GET mažai reaguoja arba nereaguoja su vandeniu, dauguma lengvai suyra gamtoje ir pasižymi paprasta sinteze ir maža kaina. Tai leidžia šio tipo gilius eutektinius tirpiklius plačiai pritaikyti, pvz. metalų oksidų perdirbime, celiuliozės komponentų sintezėje ir kita [42].

Nors neorganiniai katijonai dėl didelio krūvio tankio dažniausiai neformuoja eutektinių tirpiklių, tačiau atliktas tyrimas, kurio metu parodyta, kad tam tikri pereinamieji metalai gali sudaryti gilius eutektinius tirpiklius [44]. Darbe tirtas $ZnCl_2$, kuris sudarė gilius eutektinius tirpalus su šlapalu, acetamidu, etilenglikoliu ir 1,6-heksandiolu. Pagaminti GET yra priskiriami IV GET tipui. IV tipas formuojamas iš metalo chlorido ir vandenilio ryšio donoro. 2011 metai Y. H. Choi ir bendraautoriai pasiūlė naudoti terminą „natūralūs gilūs eutektiniai tirpikliai“ [45]. Natūralūs gilūs eutektiniai tirpikliai yra sudaryti iš cholino chlorido, karboksirūgščių, cukrų, aminorūgščių. Kaip trečias komponentas gali būti naudojamas vanduo.

Dauguma gilių eutektinių tirpiklių yra sudaryti naudojant ketvirtines amonio druskas, pvz. cholino chloridą. $ChCl$ yra netoksiškas ir gana pigus lyginant su imidazoliu ar piridinu. Europoje šis junginys yra priskiriamas provitaminams ir yra plačiai naudojamas kaip priedas pašarams.

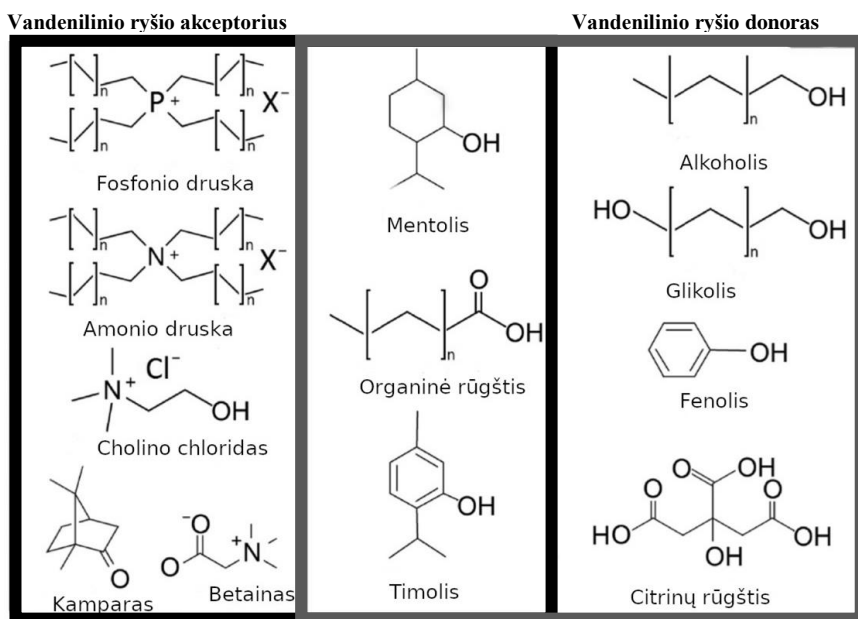
Ilgą laiką didelis dėmesys buvo skiriamas tik hidrofiliškas, gerai besimaišantiems su vandeniu giliems eutektiniams tirpikliams ir tik 2015 metais olandų mokslininkai publikavo pirmą darbą [46], kuriame pateikiami hidrofobiniai gilieji eutektiniai tirpikliai (HGET). Jie pristatė kelis HGET, sudarytus iš ketvirtinės amonio druskos (tetrautilamonio, tetraheptilamonio ir tetraoktilamonio) ir dekanų rūgšties. Tai inicijavo tolimesnius tyrimus ir platesnes gilių eutektinių tirpiklių pritaikymo galimybes. Hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai yra tinkamesni ekstrakcijai iš vandeninės terpės nei hidrofiliškieji GET. Hidrofiliškas tirpiklius kontaktuojant su vandeniu,

silpnėja hidrofilinių eutektinių tirpiklių komponentų tarpusavio sąveika ir keičiasi eutektinio tirpiklio struktūra.

1.2.2. Gilių eutektinių tirpiklių sintezė

Hidrofobinių tirpiklių sintezei naudojamų junginių spektras yra gerokai siauresnis nei hidrofilinių. Pagal naudojamo vandenilinio ryšio akceptoriaus (VA) prigimtį, hidrofobiniai tirpikliai yra skirstomi į joninius ir nejoninius.

Dažniausiai joniniuose hidrofobiniuose giliuose eutektiniuose tirpikliuose vandenilinio ryšio akceptoriumi būna ilgagrاندžiai ketvirtinio amonio junginiai (pvz. cholinas, tetrabutilamonis, tetraheksilamonis), o vandenilinio ryšio donoru (VD) sočiosios ir nesočiosios karboksirūgštys (pvz. oktano, dekan, oleino) arba alkoholiai. Nejoniniuose tirpikliuose vandenilinio ryšio akceptoriumi gali būti tokie junginiai kaip mentolis arba timolis, o vandenilinio ryšio donorais ilgagrاندės karboksirūgštys (pvz. heksano, oktano, dekan, palmitino) [47]. 1.12 pav. pateikti tokie junginiai kaip mentolis, organinės rūgštys ir timolis gali būti naudojami kaip vandenilinio ryšio donoras ir kaip vandenilinio ryšio akceptorius [48].



1.12 pav. Gilių eutektinių tirpiklių sintezei dažniausiai naudojami vandenilinio ryšio akceptoriai ir donorai [42].

Nors paprastai hidrofobiniai eutektiniai tirpikliai sintetinami iš dviejų junginių (vandenilinio ryšio akceptoriaus ir donoro), tačiau galima sintezė

naudojant tris komponentus. J. Cao ir bendraautorių darbe [49] kaip vandenilio ryšio akceptorius naudojamas metiltrioktilamonio chloridas, o kaip donoras naudojamas oktanolis ir oktano rūgštis, sumaišant juos moliniu santykiu atitinkamai 1:2:3.

Gilūs eutektiniai tirpikliai pasižymi pigia, labai paprasta ir greita sinteze [50]. Atliekant sintezę visi komponentai yra sumaišomi reikiamu moliniu santykiu. Populiariausias akceptorius/donoro molinis santykis yra 1:2, žymiai rečiau sintetunami tirpikliai moliniu santykiu 2:1, 1:1, 1:3, 1:4. Toliau komponentai yra intensyviai maišomi kol susidaro skaidrus homogeniškas skystis. Tai dažniausiai atliekama 50 – 100 °C temperatūroje. Sintezė dažniausiai trunka iki vienos valandos. Proceso metu yra nereikalingos papildomos medžiagos, o sintezės metu nesusidaro šalutiniai produktai, todėl nereikalingas papildomas susintetinto tirpiklio gryninimas [48].

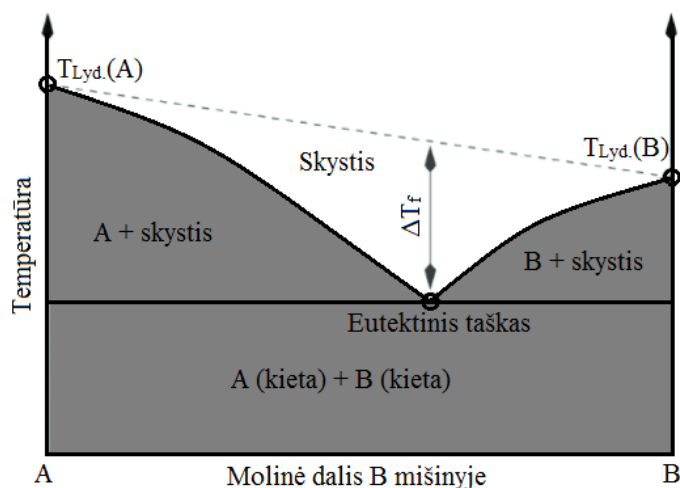
Taip pat galimas ir kitas sintezės būdas. Naudojamas akceptorius ir donoro mišinys gali būti trinamas grūstuvėje iki homogeniško skysčio susidarymo. Tačiau šis metodas taikomas gana retai.

1.2.3. Gilių eutektinių tirpiklių savybės

Hidrofobinių eutektinių tirpiklių savybės (hidrofobiškumas, tankis, klampa, lydymosi ir stingimo temperatūros, laidumas ir kita) priklauso nuo naudojamų vandenilinio ryšio donorų ir akceptorių kombinacijų.

Vienas iš minėtų parametrų yra – **hidrofobiškumas**. Eutektinių tirpiklių hidrofobiškumą didele dalimi nulemia tirpiklį sudarantys komponentai. Dėl vandenilinio ryšio susidarymo tarp vandenilio donoro ir akceptorius dauguma gilių eutektinių tirpiklių yra hidrofiliniai [48]. Bendru atveju dažnai galioja principas: kuo ilgesnes alkilo grandines turi kiekvienas tirpiklio komponentas, tuo mažesniu tirpumu vandenyje pasižymi toks eutektinis tirpiklis. Pavyzdžiui, tirpumas vandenyje mažėja: tetrabutilamonio chloridas ir dekarboksirūgštis (1:2) < tetraheptilamonio chloridas ir dekarboksirūgštis (1:2) < tetraoktilamonio chloridas ir dekarboksirūgštis (1:2) [48].

Pagal pradinį apibrėžimą gilių eutektinių tirpiklių **lydymosi ir stingimo temperatūros** yra žymiai mažesnės nei juos sudarančių komponentų (žr. 1.13 pav.). Tai yra siejama su vandenilinio ryšio susidarymu ir Van der Valso sąveika, atsirandančia tarp vandenilio donoro ir akceptorius.



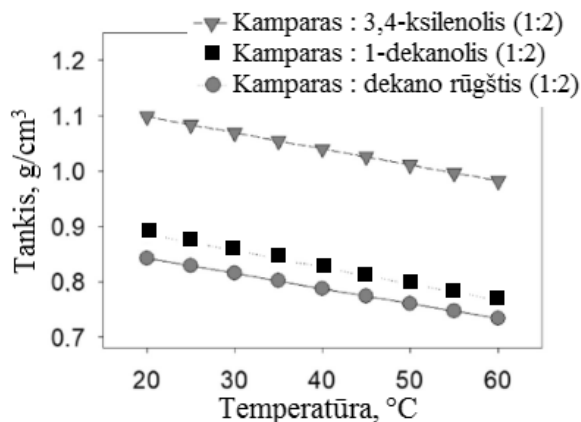
1.13 pav. Fazių diagrama: eutektinių tirpiklių susiformavimas naudojant A ir B komponentus. A – vandenilinio ryšio akceptorius, B – vandenilinio ryšio donoras, $T_{\text{Lyd.}}$ – lydymosi temperatūra [51].

Daugumos hidrofobinių GET lydymosi temperatūra yra žemesnė nei 20 °C, todėl kambario temperatūroje šie tirpikliai yra skysti. Ši savybė palengvina ekstrakcijos procesą, kadangi nereikalingas papildomas tirpiklio paruošimas. Lydymosi/stingimo temperatūra joniniams HGET didėja ilgėjant alkilo grandinėms, esančioms tetraalkilamonio/fosfonio ketvirtinėse druskose ir vandenilinio ryšio donorose. Žemiausia lydymosi temperatūra joniniams HGET yra -39 °C (betanas/heksafluoroizopropanolis (1:2) [52], o nejoninių HGET -44 °C (DL-kamparas/timolis (1:1) [48]. HGET sudaryti iš organinių rūgščių, turi tą pačią tendenciją kaip ir tirpikliai sudaryti iš tetraalkilamonio druskų.

Ekstrakcijos metu labai svarbus parametras yra **tirpiklio tankis** [53]. Kadangi nemaža dalis mėginių yra vandeninėje terpėje, svarbu, kad naudojami eutektiniai tirpikliai turėtų didesnę arba mažesnę tankį nei vanduo. Priešingu atveju po ekstrakcijos sudėtinga atskirti vandeninę fazę nuo tirpiklio.

Dažnai 25 °C temperatūroje ir atmosferos slėgyje gilių eutektinių tirpiklių tankis yra tarp 1,0 – 1,35 g/cm³ [53]. Pavyzdžiui IV tipo GET (ZnCl₂-VD) pasižymi tuo, kad jų tankis yra didesnis už 1,3 g/cm³ (ZnCl₂-šlapalas (1:3,5) ir ZnCl₂-acetamidas (1:4) yra atitinkamai 1,63 ir 1,36 g/cm³) [50]. Yra gilių eutektinių tirpiklių, kurių tankis yra mažesnis už 1 g/cm³, pvz. kamparo/dekano rūgštis ir kamparo/1-dekanolis(1:2) tankis atitinkamai yra 0,85 ir 0,87 g/cm³ [53]. Taip pat yra pastebėta, kad daugumos tirpiklių tankis

mažėja keliant temperatūrą. Vienas iš pavyzdžių pateiktas 1.14 pav. Kaip matyti iš pateikto paveikslo, tankio vertė mažėja tiesiškai, kai temperatūra didėja. Taip atsitinka dėl to, kad kylant temperatūrai vandenilinis ryšys silpnėja ir mažėja atstumas tarp molekulių.



1.14 pav. Gilių eutektinių tirpiklių tankio priklausomybė nuo temperatūros [53].

Klampa yra dar vienas svarbus parametras, kuris turi įtakos ekstrakcijai. Eutektiniai tirpikliai turi pasižymėti mažu klampumu, kad būtų greičiau pasiekiamas analičių pusiausvyros nusistovėjimas tarp mėginio ir tirpiklio bei vykdant ekstrakciją, jis „neliptų“ prie indo sienelių. Tačiau daugumos hidrofobinių eutektinių tirpiklių klampa kambario temperatūroje yra gana didelė (> 100 mPa·s) [48].

Lakumas. Gilūs eutektiniai tirpikliai nėra lakūs arba pasižymi mažu lakumu. W. Chen ir bendraautorių darbe [54] pateikiama, kad aukštoje temperatūroje dėl susilpnėjusių vandenilinių ryšių GET gali skilti ar garuoti. Pavyzdžiui, dažnai naudojamas vandenilinio ryšio akceptorius yra cholino chloridas. Šis junginys skyla kai temperatūra pasiekia 250 °C. Taip pat atliktas tyrimas [55], kurio metu GET lakumas vertinamas esant kambario temperatūrai ir aplinkos slėgiui. Tyrimui pasirinktas GET sudarytas iš ChCl ir N-metilacetamido. Pastebėta, kad N-metilacetamidas yra linkęs garuoti iš ChCl:N-metilacetamido tirpalo iki 190 min. Po 190 min. N-metilacetamido garavimo nebepastebima. Šio tyrimo rezultatai aktualūs kai norima laikyti, naudoti ar transportuoti GET. Šiuo metu dar trūksta duomenų ir tyrimų apie kitų GET lakumą.

1.3. Lipidų oksidacijos indikatoriai

Lipidai yra hidrofobiniai organiniai junginiai, kurie netirpsta vandenyje, tačiau tirpsta organiniuose tirpikliuose. Kadangi lipidams priskiriami organiniai junginiai neturi bendros struktūros ir organizme jų funkcijos yra labai įvairios, jų klasifikacija tampa labai sudėtinga [56]. Lipidų grupei gali būti priskiriami šie organiniai junginiai: vašakai, riebalai, fosfogliceridai, sfingolipidai ir glikolipidai, prostaglandinai, terpenai, riebaluose tirpūs vitaminai ir steroidai.

Riebalų rūgščių ir glicerolio esteriai (trigliceridai) vadinami riebalais. Jie gali būti augalinės arba gyvulinės kilmės [57]. Paprastai riebalai kartu su baltymais bei angliavandeniais yra vieni svarbiausių maisto medžiagų. Taip pat riebalai yra daugelio ląstelių struktūriniai elementai ir energijos atsargos [58].

Gyvūninės kilmės riebaluose vyrauja sočiosios riebalų rūgštys. Šių rūgščių randama mėsoje, svieste, taukuose, pieno produktuose ir kt. Augalinės kilmės riebalai randami tokiose produktuose kaip avokadas, kokosas, riešutai, alyvuogės, sėklos ir kita [59].

Augalinės kilmės riebalai sudaryti iš nesočiųjų riebalų rūgščių, tokių kaip oleino rūgštis (omega-9), linolo rūgštis (omega-6) bei α -linoleno rūgštis (omega-3). Kai kurios nesočiosios riebalų rūgštys žmogaus organizme nėra sintetamos, todėl yra nepakeičiamos ir turi būtinai būti maisto racione [60]. Pagrindinės dvi nepakeičiamos nesočiosios riebalų rūgštys yra linolo ir α -linoleno [61]. Šių rūgščių cheminės ir fizikinės savybės pateiktos 1.2 lentelėje.

1.2 lentelė Linolo ir α -linoleno rūgščių cheminės ir fizikinės savybės [62].

Medžiaga	Agregatinė būseną	M , g/mol	$T_{Lyd.}$, °C	ρ , kg/m ³
Linolo rūgštis, $H(CH_2)_4(CH_2CH=CH)_2(CH_2)_7COOH$	Bespalvis skystis	280,53	-5,21	903,8
α-linoleno rūgštis, $CH_3(CH_2CH=CH)_3(CH_2)_7COOH$	Bespalvis skystis	276,4	-10,87	904,6

Kaip matyti iš lentelės, abi rūgštys yra bespalviai skysčiai. Linolo rūgštis – tai polinesočioji riebalų rūgštis, kuri yra randama augaluose. Daugiausia jos randama saulėgrąžų, sojų sėmenų, kanapių aliejuje. Taip pat linolo rūgštis aptinkama daržovėse, sėklose, riešutuose ir kai kuriuose riebaluose, pvz., taukuose, lajuje, svieste. α -linoleno rūgštis randama sėmenų, kanapių,

perilių aliejuje, taip pat sojos produktuose ir žuvies gaminiuose bei taukuose [63].

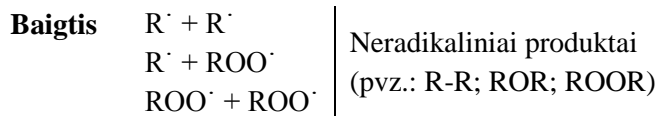
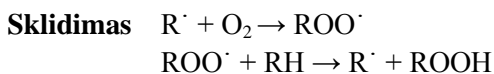
Riebalų poreikis žmonėms priklauso nuo amžiaus, lyties ir fizinio aktyvumo. Atlikta daug tyrimų, patvirtinančių, kad omega-3 riebalų rūgščių vartojimas turi teigiamos įtakos širdies ir kraujagyslių sistemos ligų prevencijai, padeda gydant astmą, artritą, išsėtinę sklerozę, įvairias psichikos ligas [64-67]. G. Grosso ir bendraautorių atliktame tyrime nustatyta, kad omega-3 riebalų rūgščių vartojimas naudingas depresijos prevencijai ir gydymui [68].

Nors augalinės kilmės riebalai yra naudingi žmogaus organizmui, tačiau reikia užtikrinti, kad maistas, kuriame yra aptinkama nesočiųjų riebalų rūgščių yra tinkamas vartoti. Nesočiosios riebalų rūgštys yra linkusios oksiduotis. Dėl lipidų oksidacijos maistas apkarsta, pakeičia spalvą, atsiranda nemalonūs kvapas, sumažėja maistinė vertė bei vartojimo trukmė, iškyla grėsmė apsinuodyti lipidų oksidacijos produktais [69, 70]. Dėl šios priežasties svarbu gebėti greitai nustatyti riebalų oksidaciją.

1.3.1. Lipidų oksidacija

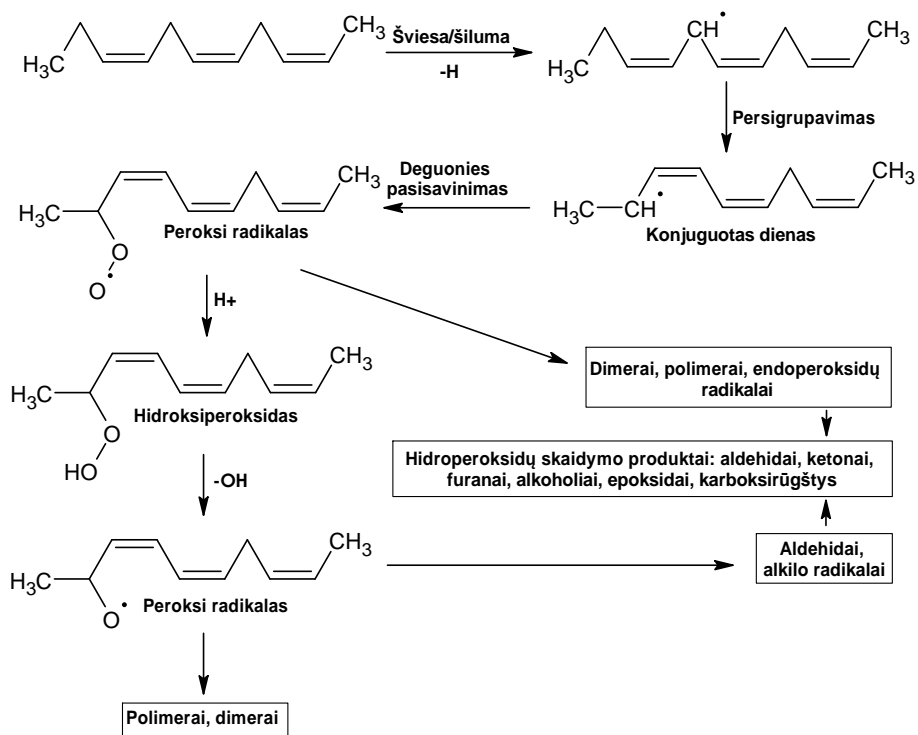
Lipidų oksidacija apima eilę reakcijų, kurios sąlygoja įvairius cheminius ir fizikinius produkto pokyčius. Oksidacija gali vykti keliais būdais: autooksidacija, fotosensibilizatoriaus sukeltu deguonies oksidavimu bei fermentine lipidų oksidacija [71].

Nesočiųjų riebalų rūgščių **autooksidacijos** procesą sudaro laisvųjų radikalų grandininė reakcija, kurią inicijuoti gali šviesa, šiluma, jonizuojančioji spinduliuotė, metalų jonai bei fermentai (pvz. lipoksigenazė, citochromos P450) [71-74]. Autooksidacijos procese galima išskirti tris etapus: iniciaciją, sklidimą ir baigtį [75]:



Pirmiausiai vyksta iniciacija, kurios metu nuo dvigubą ryšio yra atplėšiamas vandenilio atomas ir susiformuoja laisvasis vandenilio radikalas

(H•) ir alkilo radikalas (R•). Aplinkoje esant deguonies formuojasi peroksiradikalai (ROO•). Susidaręs peroksiradikalas toliau gali reaguoti su pradiniu junginiu vėl atskeliant vandenilio atomą. Taip susiformuoja pirminis oksidacijos produktas – hidroperoksidas (ROOH) [75]. Pirminiai oksidacijos produktai nėra stabilūs ir greitai suskyla į aldehydus, ketonus ir alkoholius [71]. Reakcija baigiasi, kai susijungia du laisvieji radikalai ir susidaro stabilūs produktai (žr. pav. 1.15).



1.15 pav. Nesočiųjų lipidų autooksidacijos galimų produktų susidarymo schema [72].

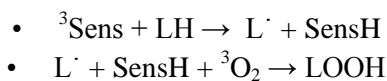
Fotooksidacijos proceso metu daugiausia susiformuoja alifatiniai ir aromatiniai oksiduoti junginiai (pvz. ketonai, aldehidai, karboksirūgštys, riebiosios rūgštys, esteriai, epoksidai, sulfoksidai, sulfonai, fenoliai, anhidridai ir alkoholiai) [76]. Norint, kad vyktų fotooksidacija, reikalingi fotosensibilizatoriai, kurie padeda suskaidyti deguonies tripletą į deguonies singletą [71].

Esant saulės spinduliutei fotooksidacija gali pradėti vykti dar neapdorotuose ir jau rafinuotuose aliejuose. M. Ahmed ir bendraautorių apžvalgoje yra pateikiama, kad nesočiosios riebalų rūgštys nesugeria šviesos,

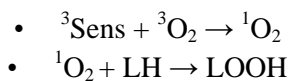
jei spinduliuojamos šviesos bangos ilgis yra mažesnis negu 220 nm [71]. Tačiau, jei yra naudojamas sensibilizatorius (pvz. chlorofilas, porfirinas ar dažai dar žinomi kaip „Bengalijos rožė“) šviesos energija sugerama ir tripletinis sensibilizatorius paverčiamas į singletinį sensibilizatorių.

Lipidų fotooksidacija gali vykti dviem mechanizmais, kadangi sensibilizatoriaus molekulės skleidžia fluorescencinę šviesą ir suformuoja sensibilizatoriaus tripletą [71].

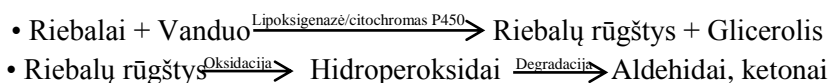
Pirmuoju mechanizmu tripletinis sensibilizatorius ($^3\text{Sens}$) reaguoja su lipidais (LH), taip sudarydamas laisvą alkilo radikalą (L^\cdot) ir singletinį sensibilizatorių (SensH). Susidaręs mišinys toliau reaguoja su tripletiniu deguonimi sudarydamas hidroperoksidus, kurių skilimo produktai yra panašūs kaip autooksidacijos metu:



Antruoju mechanizmu tripletinis sensibilizatorius reaguoja su tripletiniu deguonimi sudarydami singletinį deguonį. Singletinis deguonis toliau reaguoja su nesočiųjų lipidų dvigubaisiais ryšiais suformuodamas hidroperoksidus. Susidarę hidroperoksidai skiriasi nuo autooksidacijos produktų, kadangi nėra susidariusių laisvųjų radikalų:



Dar vienas iš galimų lipidų oksidacijos metodų yra **fermentinė oksidacija**. Maisto produktuose riebalų fermentinė oksidacija vyksta dalyvaujant fermentui (pvz. lipoksigenazei), susidarant riebalų rūgštims ir gliceroliui [71]:



Lipoksigenazės inicijuotos riebalų rūgščių oksidacijos metu susidaro specifiniai hidroksiperoksida. Lipoksigenazės fermente yra geležies, kurios dėka vyksta 1,4-cis,cis-pentadieno oksidacija į pentadienilo radikalą, kuris toliau reaguoja su deguonimi suformuojant peroksiradikalus ir galiausiai hidroperoksidus. Susidarę hidroperoksida yra prekursoriai kitoms fermentinėms ir cheminėms reakcijoms [71].

Autooksidacijos, fotooksidacijos ir fermentinės oksidacijos metu susidarę hidroperoksidai yra pirminiai oksidacijos produktai, kurie gali būti toliau skaidomi. Pirminiai hidroperoksidai gali turėti įtakos maisto produktų kokybei, o jų irimo produktai gali pakeisti skonį, kvapą, išvaizdą ir maistinę vertę.

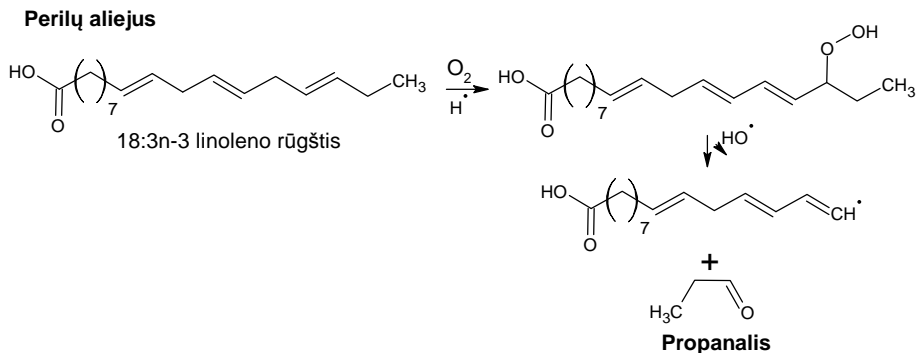
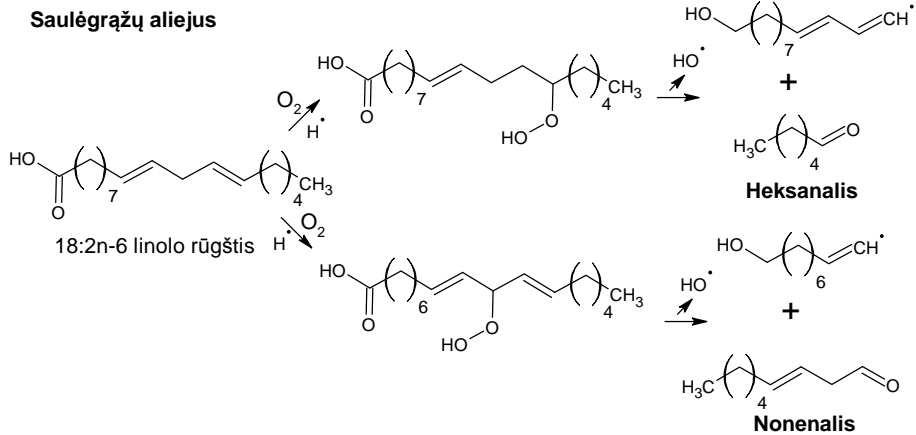
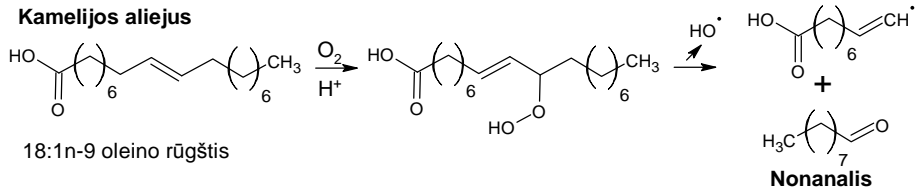
Lipidų oksidacijos kontrolė yra itin svarbi maisto pramonėje norint nustatyti maisto kokybę bei galiojimo trukmę. Kadangi nepakeičiamos rūgštys (linolo ir α -linoleno rūgštys) turi būti gaunamos kartu su maistu, svarbu laiku indikuoti prasidėjusį oksidacijos procesą.

Didžiausi šių rūgščių kiekiai yra randami augaliniuose aliejuose. J. Cao ir bendraautorių tyrime yra analizuojami keturi aliejai: palmių, kamelijos, saulėgražų ir perilos [77]. Kaip matyti iš 1.3 lentelės, palmių aliejuje daugiausia aptinkama palmitino (38,23 mg/kg) ir oleino rūgšties (43,05 mg/kg), o kamelijos aliejuje dominuoja oleino rūgštis (80,14 mg/kg). Saulėgražų ir perilos aliejuje daugiausia yra atitinkamai linolo (55,24 mg/kg) ir α -linoleno (54,37 mg/kg) rūgšties.

1.3 lentelė. Keturių augalinių aliejų riebalų rūgščių sudėtis [77].

	Palmių aliejus	Kamelijos aliejus	Saulėgražų aliejus	Perilos aliejus
Palmitino rūgštis, mg/kg	38,23 ± 1,18	7,80 ± 0,01	6,27 ± 0,02	6,02 ± 0,10
Stearino rūgštis, mg/kg	4,49 ± 0,07	2,42 ± 0,07	3,94 ± 0,07	2,76 ± 0,07
Oleino rūgštis, mg/kg	43,05 ± 0,88	80,14 ± 0,08	29,50 ± 0,03	21,97 ± 0,25
Linolo rūgštis, mg/kg	10,33 ± 0,35	6,98 ± 0,01	55,24 ± 0,11	12,73 ± 0,12
α-linoleno rūgštis, mg/kg	0,14 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,07 ± 0,01	54,37 ± 0,29

Vykstant riebalų oksidacijai, iš vienos riebalų rūgšties gali susidaryti daug oksidacijos produktų. Analizuojant šiuos keturis aliejus buvo padaryta išvada, kad susidarę antriniai oksidacijos produktai (aldehidai) tokie kaip heksanalis, nonanalis, propanalis, nonenalis gali būti laikomi riebalų oksidacijos indikatoriais [77, 78]. 1.16 pav. pateikiama oleino, linolo ir α -linoleno rūgšties galima oksidacijos schema iki nonalio, heksanalio, nonenalio ir propanalio.



1.16 pav. Oleino, linolo ir α -linoleno rūgšties oksidacijos schema [77].

Susidarę riebalų oksidacijos produktai turi įtakos sveikatai. Didesnis hidroperoksidų kiekis gali sukelti kai kurių vitaminų ir riebalų rūgščių trūkumą. Dėl to gali padidėti odos pralaidumas vandeniui.

Lipidų oksidacija yra natūralus procesas, kurį galima kontroliuoti. Įvairūs faktoriai gali lemti lipidų oksidaciją, ją pagreitinant ar slopinant. Pagrindinis veiksnys yra nesočiųjų riebalų rūgščių nesotumo laipsnis. Kuo jis didesnis, tuo oksidacija greitesnė. Taip pat riebalų oksidaciją spartina temperatūros didėjimas, šviesa, metalų jonai (pvz. varis, geležis, nikelis, alavas ir kt.) [79].

Lipidų oksidacija gali būti slopinama mažinant deguonies koncentraciją. Tai galima padaryti naudojant vakuumą arba deguonį pakeičiant inertinėmis dujomis.

Riebalų oksidacijos sustabdyti neįmanoma, tačiau ją galima sulėtinti. B. Chen ir bendraautorai [80] pristatė metodą kaip apsaugoti augalinės kilmės aliejus nuo oksidacijos, naudojant koloidines struktūras sudarytas iš fosfolipidų.

Viena iš labiausiai naudojamų priemonių, kuri leidžia sumažinti riebalų oksidacijos greitį, yra antioksidantų naudojimas. Tai medžiagos, kurios prailgina maisto produktų galiojimo terminą ir apsaugo juos nuo gedimo, kurį sukelia oksidacija [69]. Naudojami antioksidantai gali būti sintetiniai ir natūralūs [81].

Natūraliems antioksidantams priskiriama askorbo rūgštis (E 300) ir jos junginiai – askorbatai (E 301, E 302, E 315 – 316) [82]. Askorbo rūgštis stabdo augalinių produktų fermentinio rudavimo reakcijas ir slopina riebių produktų (pvz. sviesto, margarino, aliejaus, majonezo) riebalų rūgščių skilimą. Tokoferoliai (pvz. E 306, E 309) taip pat priskiriami natūraliems antioksidantams. Jie pasižymi vitamino E savybėmis: gali apsaugoti ląsteles nuo žalingo laisvųjų radikalų poveikio. Šios medžiagos yra randamos augaliniuose (kviečių ar kukurūzų gemaluose, aliejuje) bei gyvuliniuose riebaluose [82]. Abi šios antioksidantų grupės priskiriamos nekenksmingoms. Šiuo metu didelis dėmesys skiriamas natūralių antioksidantų šaltiniams: prieskoniams ir prieskoniniams augalams.

Sintetiniams antioksidantams priskiriamas butilhidroksianizolis (E 320) ir galo rūgšties esteriai – galatai (pvz. E 310 – 312). Butilhidroksianizolis nėra plačiai naudojamas Europos Sąjungoje, tačiau labai dažnai naudojamas JAV. Šis sintetinis antioksidantas, patekęs į organizmą, kaupiasi riebaliniame audinyje, slopina imuninę sistemą ir pasižymi kancerogeniniu poveikiu. Tai labai lakus, fenolio kvapo junginys, tirpus riebaluose ir netirpus vandenyje bei išgaruojantis aukštoje temperatūroje. Galatai pasižymi labai stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, tačiau taip pat pasižymi kancerogeniniu poveikiu ir sukelia ląstelių biocheminius pokyčius. Jie yra dažniausiai naudojami gaminant margariną ir aliejų.

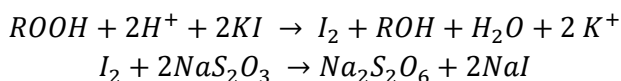
1.3.2. Lipidų oksidacijos nustatymo metodai

Lipidų oksidacija apima eilę reakcijų, kurių metu kinta maisto produktų cheminės ir fizikinės savybės. Norint tai įvertinti yra naudojami įvairūs lipidų oksidacijos nustatymo metodai. Šiame skyrelyje aprašomi dažniausiai

naudojami metodai: peroksidų, p-anizidino (*pAnS*), Totox skaičiaus nustatymas, TBR testas (tiobarbitūrinės rūgšties) [83-85].

Peroksidinis skaičius (PS). Kaip jau buvo minėta ankstesniuose skyriuose, maisto produktuose vykstant lipidų oksidacijai pirmiausiai susidaro pirminiai oksidacijos produktai – hidroperoksidai. Nustatomas peroksidinis skaičius parodo hidroperoksidų kiekį tiriamuose produktuose ir yra vienas iš labiausiai paplitusių riebalų ir aliejaus kokybės rodiklių, nustatomų gamybos ir laikymo metu [84]. Tai galima nustatyti jodometriniu, kolorimetriniu ar kitais metodais [83].

Dažniausiai naudojamas jodometriniu metodu. Jie remiasi tuo, kad hidroperoksidai rūgščioje terpėje reaguoja su kalio jodidu sudarydami jodą. Jodo kiekis nustatomas titruojant tirpalą natrio tiosulfatu [83]:

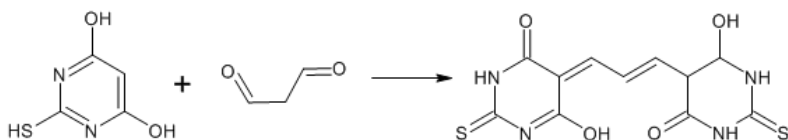


PS yra išreiškiamas aktyvaus deguonies miliekivalentais 1 kg riebalų. Paprastai maksimali leistina peroksidų skaičiaus vertė rafinuotiems aliejams yra 10,0 mekv/kg, taukams 3,0 mekv/kg, margarinui 4,0 mekv/kg, sviestui 4,5 mekv/kg [86].

Nors jodometriniu metodu yra gana paprastas, tačiau turi ir tam tikrų trūkumų. Šiam metodui atlikti reikia daug laiko ir pastangų, reikalingas gana didelis reagentų kiekis bei sugeneruojama nemažai atliekų [83, 87].

TBR testas. Tai vienas iš plačiausiai naudojamų metodų, kuris skirtas nustatyti antrinių oksidacijos produktų kiekį. Maisto produktuose esančios nesočiosios riebalų rūgštys reaguodamos su 2-tiobarbitūrine rūgštimi sudaro spalvotus junginius, kuriuos galima nustatyti kolorimetriniu metodu.

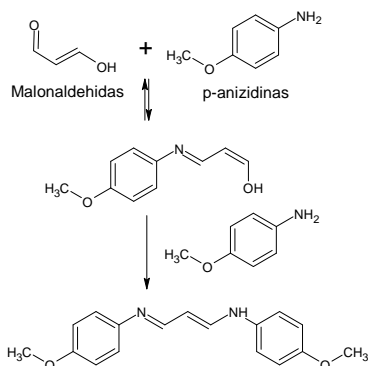
Vienas iš lipidų oksidacijos metu susidarančių junginių yra malonaldehidai, kuris reaguodamas su tiobarbitūrine rūgštimi sudaro rožinės spalvos kompleksinį junginį (žr. 1.17 pav.). Susidariusio kompleksinio junginio kiekį galima išmatuoti spektrofotometriškai, 530 – 535 nm bangos ilgyje. Gauti TBR testo rezultatai paprastai išreiškiami mg malonaldehido/kg.



1.17 pav. 2-tiobarbitūrinės rūgšties ir malonaldehido reakcijos lygtis [83].

TBR testas yra geras metodas, kuriuo galima palyginti lipidų oksidaciją maisto produktuose. Tačiau analizuojant aliejuje esančių lipidų oksidaciją dažniau naudojamas p-anizidino skaičiaus nustatymas.

p-anizidino skaičius. Tai riebalų ir aliejų turinčio maisto produktų oksidacijos tyrimo metodas. Šiuo metodu nustatomi aldehydai (daugiausiai 2-alkenalių ir 2,4-alkadienų), kurie susidaro skylant hidroperoksidams. Dalyvaujant acto rūgščiai, p-anizidinas reaguoja su aldehydais, sudarydamas gelsvos spalvos produktus (žr. 1.18 pav.). Spalvos intensyvumas išmatuojamas esant 350 nm bangos ilgiui.



1.18 pav. p-anizidino ir malonaldehido reakcijos lygtis [83].

pAnS yra apibrėžiamas kaip absorbcija, kai 1 g riebalų, ištirpintų izooktane (100 ml), sureaguoja su p-anizidinu (0,25 % ledinėje acto rūgštyje).

p-anizidino skaičiaus nustatymo metodas yra jautresnis analizuojant nesočiuosius aldehydus nei sočiuosius.

Totox vertė. Dar žinoma kaip bendra oksidacijos vertė. Šis dydis parodo bendrą pirminių ir antrinių oksidacijos produktų kiekį [88]. Totox vertė apskaičiuojama įvertinus peroksidų ir p-anizidino skaičius pagal formulę [89]:

$$Totox = 2 \times PS + pAnS \quad (4)$$

kur *PS* – peroksidų skaičius,

pAnS – p-anizidino skaičius.

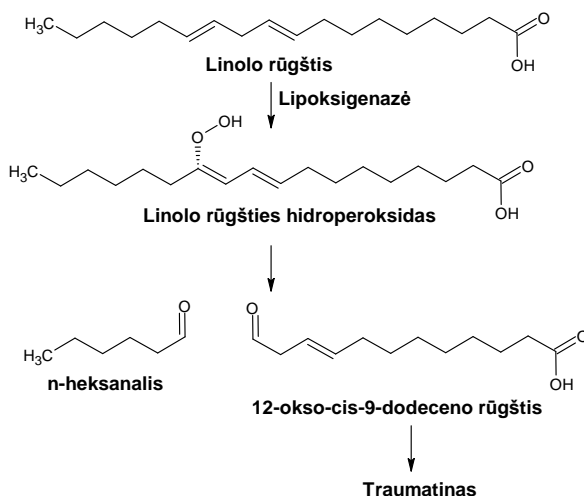
Aliejai, kurių $PS \leq 10$ mekv/kg ir $pAnS \leq 0,6$ mg/g yra laikomi neoksiduotais, o kurių PS yra 10 mekv/kg, o $pAnS \geq 0,6$ mg/g priskiriami oksiduotiems aliejams [90].

1.3.3. Heksanalis – lipidų oksidacijos indikatorius

Lipidų oksidacijai nustatyti ieškoma naujų, paprastesnių, ekonomiškesnių ir aplinkai draugiškesnių analizės metodų.

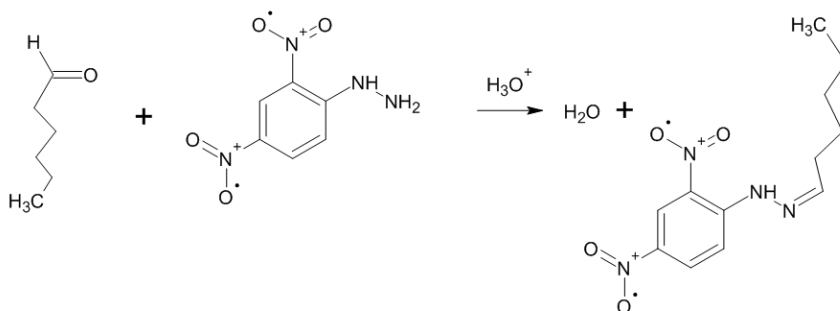
Kaip jau buvo minėta, vykstant lipidų oksidacijai, susidaro daug lipidų oksidacijos produktų. Tai gali būti pirminiai oksidacijos produktai – hidroperoksidai ar antriniai produktai [85, 91]. Susidarę lakūs antriniai oksidacijos produktai (pvz. aldehydai, ketonai, alkoholiai, trumpos karboksirūgštys ir angliavandeniliai) pasižymi specifiniu kvapu, o tai dažnai yra susiję su maisto skonio pablogėjimu ar net maisto produktų sugedimu. Kai kurie susidarę antriniai oksidacijos produktai gali būti laikomi specifiniais indikatoriais, pvz. propanalis gali būti pagrindinis n-3 riebalų rūgščių oksidacijos indikatorius, o heksanalis ir pentanalis yra laikomi n-6 riebalų rūgščių oksidacijos indikatoriais. Tiek propanalis, tiek heksanalis yra dažnai naudojami identifikuoti lipidų oksidaciją maiste. Dažniau naudojamas heksanalis, nes šio junginio paprastai susidaro didesnis kiekis nei kitų antrinių oksidacijos produktų [92].

Heksanalis yra antrinis linolo rūgšties oksidacijos produktas. Tai skaidrus bespalvis skystis, turintis aštrų kvapą. Heksanolio virimo temperatūra $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, lydymosi temperatūra $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, o tankis $0,815\text{ g/cm}^3$. 1.19 pav. pateikiama galima linolo rūgšties oksidacijos schema vykstant fermentinei oksidacijai.



1.19 pav. Fermentinė linolo rūgšties oksidacija iki heksanolio [93].

Heksanalio nustatymui dažniausiai naudojami chromatografiniai metodai: efektyvioji skysčių chromatografija ir dujų chromatografija. Vienas iš populiariausių efektyviosios skysčių chromatografijos detektorių yra diodinės matricos detektorius. Kadangi heksanalis neturi chromoforinių grupių, jo negalima tiesiogiai detektuoti naudojant šį detektorių. Tam, kad būtų galima atlikti analizę, yra reikalinga derivatizacija. Derivatizacijos reagentais dažniausiai yra naudojami hidrazino turintys junginiai (pvz. 2,4 – dinitrofenilhidrazinas (DNPH), O-(2,3,4,5,6-penta-fluorobenzil) – hidroksilamino hidrochloridas ir N-metil-4-hidrazino-7-nitrobenzofurazanas). Heksanalio derivatizacijos reakcijos su DNPH lygtis pateikta 1.20 pav.



1.20 pav. Heksanalio derivatizacijos DNPH reakcijos lygtis [94].

Heksanalio nustatymui dažnai naudojama dujų chromatografija. Dujų chromatografija yra tinkamiausias metodas kiekybiškai įvertinti lakiuosius junginius ir juos identifikuoti panaudojant masės spektrometrinį detektorių. Taikant tradicinę dujų chromatografiją, kai į dujų chromatografą leidžiamas skystas mėginys, būtina papildomai paruošti mėginį. Dažniausiai mėginiai ekstrahuojami panaudojant tirpiklius. Ekstraktas yra išvalomas nuo nelakių chromatografinę sistemą galinčių užteršti medžiagų panaudojant kiekafazę ekstrakciją [85].

Skysčių-skysčių ekstrakcija nėra tinkamiausias metodas lakiems junginiams išgauti iš tiriamosios medžiagos, kadangi tai daug laiko ir tirpiklių sąnaudų reikalaujantis procesas. Šiuo metu yra siūlomi ir taikomi nauji metodai siekiant supaprastinti procesą ir norint gauti kuo geresnius analizės rezultatus. Tam pasiekti yra naudojamas distiliavimas ar sumažinto slėgio distiliavimas vandens garais. Šiais metodais galima analizuoti gana aukštų virimo temperatūrų junginius, o taikant sumažinto slėgio distiliavimą vandens garais galima dirbti ir žemesnėse temperatūrose [95]. Kadangi

lakiosios frakcijos paprastai gerai tirpsta organiniuose tirpikliuose, tai naudojant abu šiuos metodus, galima pasiekti dideles ekstrakcijos išeigas [96]. M. A. Ferhat ir bendraautorai lakių medžiagų ekstrakcijai pasiūlė pritaikyti mikrobangas [97].

Lakius junginius ypač patogiu būdu nustatinėti viršerdvės dujų chromatografijos metodu. Prieš dujų chromatografinę analizę analites galima sukcentruoti panaudojus kietafazę mikroekstrakciją ar mikroekstrakciją tirpiklio lašu [85]. Apie tai plačiau aprašyta 1.1.5. skyriuje.

1.4. Karboksirūgštys

Karboksirūgštys – tai organiniai junginiai, kurių struktūroje yra karboksi grupė (R-COOH) [98]. Šie junginiai gali būti skirstomi pagal karboksi grupių skaičių: monokarboksirūgštys (pvz., acto rūgštis CH_3COOH , benzenkarboksirūgštis $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$), dikarboksirūgštys (pvz., oksalo rūgštis HOOC-COOH , ftalio rūgštis $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOH})_2$), trikarboksirūgštys (pvz., citrinų rūgštis $\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$) arba polikarboksirūgštys (pvz., melito rūgštis $\text{C}_6(\text{COOH})_6$). Taip pat karboksirūgštis galima skirstyti pagal karboksigrupę prisijungusios anglies atomų grandinės tipą į sočiąsias (pvz. acto rūgštis), nesočiąsias (pvz. fumaro rūgštis $\text{HOOCCH}=\text{CHCOOH}$) ir aromatinės karboksirūgštis (pvz. benzenkarboksirūgštis) [3].

Monokarboksirūgštys, turinčios ilgą anglies atomų grandinę ir įeinančios į riebalų sudėtį, vadinamos riebalų rūgštimis. Monokarboksirūgštys būna sočiosios ir nesočiosios. Pagrindinis skirtumas tarp sočiųjų ir nesočiųjų riebalų rūgščių yra dvigubųjų ryšių skaičius grandinėje. Nesočios riebalų rūgštys grandinėje gali turėti vieną ar daugiau dvigubųjų ryšių, o sočiosios dvigubųjų ryšių neturi [79, 99].

Pati paprasčiausia karboksirūgštis yra metano rūgštis dar žinoma kaip skruzdžių [100]. Ji randama ne tik skruzdėse, bet ir uogose, vaisiuose, meduje ar dilgėlese [101, 102]. Dėl savo savybių tiek metano, tiek dauguma kitų karboksirūgščių turi platų pritaikymą, dažnai yra įprastos gėrimų ir maisto produktų sudedamosios dalys. Toliau plačiau aprašomos dažnai naudojamos karboksirūgštys (acto, propano, oksalo, gintaro, pieno, obuolių, citrinos rūgštis) ir jų dariniai.

1.4.1. Karboksirūgščių savybės

Acto rūgštis (etano rūgštis) yra viena iš paprasčiausių karboksirūgščių. Ši rūgštis turi aitrų kvapą [103]. Acto rūgštis garai dirgina nosies gleivinę, kvėpavimo takus, akis, gali sukelti perštelimą gerklėje, o daugiau kaip 30 %

koncentracijos vandeniniai tirpalai nudegina odą ir gleivinę. Gryna bevandenė etano rūgštis, dar žinoma kaip ledinė acto rūgštis, yra skystis, o žemesnėje nei 16,7 °C temperatūroje virsta bespalviais kristalais [104-106].

Acto rūgštis yra plačiai naudojama visame pasaulyje. 2015 metų duomenimis, per vienerius metus pagaminama apie 13 milijonų tonų acto rūgštis. Prognozuojama, kad šios rūgštis poreikis kiekvienais metais tik didės [107].

Acto rūgštis gali būti naudojama maisto pramonėje kaip konservantas prieš bakterijas ir grybus (E260) [103, 108-110]. Taip pat ši rūgštis yra skirta sureguliuoti maisto rūgštingumą marinuotose daržovėse, aštriuose padažuose, pagamintose salotose bei gali būti naudojama kaip aromato komponentas [111]. Acto rūgštis turi daugelis vaisių, taip pat ji yra randama visuose raugintuose produktuose (pvz. rūgpienyje), nes bakterijos ir grybai geba suskaidyti organines medžiagas iki acto rūgštis. Iš vyno mikroorganizmai gali pagaminti vyno actą.

Lietuvoje yra patvirtintas įsakymas (galioja nuo 2002-01-01) dėl privalomųjų acto kokybės reikalavimų [112]. Šiame įsakyme apibrėžiami acto kokybės rodikliai. Vienas iš jų – bendras rūgštis kiekis: vyno acte ne mažiau kaip 60 g/dm³ (skaičiuojant acto rūgščiai); acte (išskyrus vyno actą) ne mažiau kaip 50 g/dm³ (skaičiuojant acto rūgščiai). Acto rūgštis neturi būti daugiau negu natūraliai gaunama actarūgščio rauginimo būdu, o leidžiamas acto rūgštis masės nuokrypis ± 0,2 % [112].

Siekiant gerinti darbuotojų saugą ir sveikatą yra patvirtinti cheminių medžiagų ribiniai dydžiai [113]. Šiame dokumente yra įtraukta acto rūgštis, jai yra taikomas ilgalaikio poveikio ribinis dydis: 25 mg/m³, 10 ppm. Į higienos normą taip pat įtraukta propano ir oksalo rūgštis. Propano rūgščiai yra taikomas trumpalaikis ribinis poveikis: 62 mg/m³, 20 ppm, o ilgalaikio poveikio ribinis dydis yra 31 mg/m³, 10 ppm. Oksalo rūgščiai ilgalaikio poveikio ribinis dydis yra 1 mg/m³ (žr. 1.4 lentelę) [113].

1.4 lentelė. Kai kurių organinių rūgščių leistini ribiniai dydžiai [113].

		Ribinis dydis					
		Ilgalaikio poveikio ribinis dydis		Trumpalaikio poveikio ribinis dydis		Neviršytinas ribinis dydis	
Pavadinimas	CAS Nr.	mg/m ³	ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³	ppm
Acto rūgštis	64-19-7	25	10	-	-	-	-
Propano rūgštis	79-09-4	31	10	62	20	-	-
Oksalo rūgštis	144-62-7	1	-	-	-	-	-

Propano rūgštis nedideliais kiekiais yra randama daugelyje produktų. Ši rūgštis gali būti naudojama maisto pramonėje kaip dirbtinis konservantas prieš grybus (E280) kepinuose (pvz. duonoje, sausainuose) [2, 114]. Ji natūraliai aptinkama sūriams bręstant, pvz. Šveicariškame sūryje. Nacionalinis darbuotojų saugos ir sveikatos institutas yra nustatęs leistinas šios rūgšties ribas. Propano rūgšties turinčių produktų reiktų vengti sergantiems astma ir alergiškiems asmenims [115].

Propano rūgštis yra naudojama ne tik maisto pramonėje, bet ir kosmetikoje (pvz. kaip repelentas nuo bičių), buitinės chemijos produktuose (pvz. balikliuose kaip analogas oksalo rūgščiai), gyvulinkystėje siekiant apsaugoti pašarus nuo pelėsių ir kai kurių bakterijų augimo [100-102]. Ši rūgštis yra efektyvesnė prieš pelėsius ir mieles nei skruzdžių ar acto rūgštis.

Oksalo rūgštis dar žinoma kaip rūgštynių rūgštis. Ši rūgštis turi dvi karboksigrupes ir yra gana stipri organinė rūgštis (stipresnė už acto rūgštį). Gryna oksalo rūgštis yra bespalviai kristalai, kurie lydosi 189 °C temperatūroje. Oksalo rūgšties dihidratas staigiai šildant lydosi 101,5 °C temperatūroje [116].

Oksalo rūgštis ir oksalatai yra plačiai paplitę junginiai. Nemažai šių junginių randama augaluose: rūgštynėse, kiškio kopūstuose, rabarbaruose ir kt. [117]. Ši rūgštis naudojama vandens nukalkinimui, medienos pramonėje naudojama balinti, šviesinti medieną [118]. Oksalo rūgštis gali būti naudojama bitininkystėje kovojant su varoze, kurią sukelia Varoatozės erkės (*Varroa destructor*) [119]. E. Akyol ir H. Yeninar darbe [120] pateikiama, kad 5 % oksalo rūgšties tirpalas apsaugo nuo varozės.

Oksalo rūgštis lengvai jungiasi su metalais, todėl ilgalaikis maisto su dideliais šios rūgšties kiekiais vartojimas gali sukelti maistinių medžiagų trūkumą, pvz. kalcio. Saikingas oksalo rūgšties vartojimas neturėtų kenkti sveikatai, tačiau perteklius gali dirginti virškinamojo trakto sienelės, o vartojimas dideliais kiekiais jau gali būti kenksmingas (paprastai mirtina dozė suaugusiam žmogui būna 15 – 30 g) [121].

Gintaro rūgštis yra daugumoje vaisių bei daržovių [1]. Maisto pramonėje ši rūgštis naudojama kaip maisto priedas E363, kuris skirtas rūgštingumo reguliavimui ar kaip kvapioji medžiaga. Dažniausiai E363 galima rasti alkoholiniuose gėrimuose – degtinėje, aluje ir vyne, taip pat sausų gėrimų koncentratuose, sriubose ir sultiniuose [122]. Be maisto pramonės, gintaro rūgštis naudojama kosmetikoje kaip antimikrobinė medžiaga, plastiko pramonėje gali būti naudojama kaip monomeras bioskaidžių plastikų gamyboje, sodininkystėje ir daržininkystėje – kaip

augimo stimulatorius. Taip pat ši rūgštis gali būti pritaikoma gyvulininkystėje (pvz. kaip pašarų priedas) ir kt. [1, 123, 124].

Kita trumpagrandė organinė rūgštis – **pieno rūgštis**. Tai bespalvis arba gelsvos spalvos skystis, kuriam būdingas rauginto pieno kvapas. Pieno rūgštis pasižymi tuo, kad dalyvauja įvairiuose biocheminiuose procesuose. Pavyzdžiui, pieno rūgštis randama raumenyse. Sportuojant šios rūgštis kiekis didėja, todėl jaučiamas skausmas raumenyse. Tuo tarpu ilsintis pieno rūgštis kiekis mažėja [125].

Pieno rūgštis yra randama rauginto pieno produktuose, tokiose kaip kefyras, rūgpienis, sūris ar jogurtas [125]. Maisto pramonėje ši rūgštis naudojama kaip maisto konservantas, kietiklis ar kvapioji medžiaga, kuri yra žymima E270 [126, 127].

Pieno rūgštis buitinėje chemijoje dažnai naudojama kaip nukalkinimo ar antimikrobinė priemonė (pvz. kaip ekologiška priemonė skirta nukalkinti kavos aparatus). Gana plačiai pieno rūgštis naudojama gyvulininkystėje. Ji yra pritaikoma gyvulių odos priežiūrai arba kaip maisto priedas. Pieno rūgštis pagerina žolėdžių gyvūnų virškinimą. Ši rūgštis gyvulininkystėje taip pat gali būti naudojama kaip kvapioji medžiaga bei rūgštingumo reguliatorius. Pieno rūgštis ir amonio bikarbonato junginiai yra naudojami uodų pritraukimo priemonėse [128, 129].

Obuolių rūgštis yra rūgštis, randama daugelyje vaisių ir daržovių [2]. Ši rūgštis turi du optiškai aktyvius izomerus: L-obuolių rūgštis ir D-obuolių rūgštis. Gamtoje randama tik L(-) obuolių rūgštis [130].

Obuolių rūgštis maisto pramonėje žymima kaip maisto priedas E 296, tai dirbtinė konservavimo ir rūgštingumą reguliuojanti medžiaga. Ši rūgštis suteikia aštrų skonį, todėl dažnai dedama į saldumynus ir kai kuriuos bulvių traškučius bei naudojama brandinant vyną [131]. Per didelis šios rūgštis naudojimas gali sudirginti, o didelės obuolių rūgštis koncentracijos kūdikių maiste yra neleidžiamos, kadangi mažų vaikų organizmas negeba suskaidyti didesnių šios rūgštis kiekių [132, 133].

Maisto pramonėje dažnai naudojama ir **citrinos rūgštis** (2-hidroksi-1,2,3-propanetrikarboksirūgštis, $C_6H_8O_7$). Ši rūgštis žymima kaip konservantas E330. Gali būti naudojama kaip rūgštingumą reguliuojanti medžiaga bei aromato stipriklis [2]. Citrinos rūgštis naudojama tiek maistui, tiek odos priežiūros produktuose. Daugumoje kosmetikos produktų ši rūgštis yra naudojama siekiant sureguliuoti pH vertę.

Buitinėje chemijoje yra naudojama kaip priemonė kompleksiniams junginiams sudaryti. Efektyviai valo kalkių nuosėdas vandens garinimo įrenginiuose, katiluose (boileriuose), kavos aparatuose, virduliuose ir kt.

Citrinų rūgštis ir kitos trumpagrandės organinės rūgštys patenka į Europos parlamento ir tarybos reglamento Nr. 1333/2008 II priedą (maisto priedų sąrašas) [5, 6]. Sąraše pateikiamos medžiagos, kurios gali būti naudojamos maisto produktuose neribotai arba su apribojimais. Acto rūgštis ir jos produktai yra nenormuojami išskyrus riebalų rūgščių mono- ir digliceridų acto rūgšties esterių naudojimą sausainiuose, džiovėsiuose, grūdiniuose maisto produktuose bei maiste kūdikiams (didžiausias leistinas kiekis yra 5000 mg/l arba mg/kg). Propano rūgštis ir jos produktai yra nenormuojami išskyrus duoną ir smulkius konditerinius kepinius (pvz. desertui *Christmas pudding* leistinas kiekis yra 1000 mg/l arba mg/kg). Tam tikriems duonos gaminiams didžiausias leistinas propano rūgšties kiekis yra 1000 – 3000 mg/l arba mg/kg. Didžiausi leistini gintaro rūgšties kiekiai aromatizuotose raugintose pieno gaminiuose, įskaitant termiškai apdorotus gaminius ir desertus yra 6000 mg/l arba mg/kg. Sriubose ir sultiniuose šios rūgšties leistinas kiekis yra iki 5000 mg/l arba mg/kg, o milteliuose aromatizuotiems gėrimams ruošti – 3000 mg/l arba mg/kg. Pieno rūgšties kiekis tokiose produktuose kaip mozzarella sūris, riebalai ir aliejus, skardinėse arba stiklainiuose konservuoti vaisiai ir daržovės, aukščiausios rūšies džemai ir aukščiausios rūšies želė, vaisių arba daržovių užtepai, švieži makaronai, duona, pradiniai mišiniai kūdikiams (tik L(+) formos), alaus ir salyklo gėrimams yra nenormuojamas, tuo tarpu vaisių nektarams bei daržovių nektarams ir panašioms produktams didžiausias leistinas kiekis yra 5000 mg/l arba mg/kg. Obuolių rūgšties kiekiai daugumoje produktų yra nenormuojami išskyrus ananasų sultis (didžiausias leistinas kiekis yra 3000 mg/l arba mg/kg). Didžiausias leistinas citrinų rūgšties kiekis vaisių nektarams, kakavos ir šokolado produktuose yra 5000 mg/l arba mg/kg, o vaisių ir daržovių sultims – 3000 mg/l arba mg/kg [6].

1.4.2. Karboksirūgščių nustatymo metodai

Trumpą anglies atomų grandinę turinčios karboksirūgštys gali natūraliai atsirasti daugelyje maisto produktų, daugiausia fermentuotuose produktuose. Jos atsiranda dėl metabolizmo, hidrolizės, gamybos proceso ar laikymo sąlygų [3]. Taip pat organinės rūgštys yra naudojamos maisto pramonėje kaip konservantai, kadangi pasižymi antimikrobiniu poveikiu, geba sumažinti maisto pH [4]. Propano rūgštis ir jos dariniai Vokietijoje, Šveicarijoje ir Austrijoje buvo uždrausti kaip nereikalingi ir gadinantys

skoni, tačiau dabar Europos sąjungos šalyse ją vėl leidžiama vartoti (iki 3000 mg/kg) [5].

Daugumos kitų rūgščių kiekiai yra neribojami (pvz. acto, pieno, obuolių, citrinų ir kt.), tačiau svarbu nustatyti jų kiekius, kadangi karboksirūgštys turinčios trumpą anglies atomų grandinę daro įtaką skoniui, tekstūrai, aromatinėms savybėms, bakterijų augimui, gali turėti antimutageninį poveikį ar būti kaip žymekliai nustatant galiojimo laiką ar autentiškumą [134-136].

Šiuo metu yra nemažai metodų skirtų nustatyti organinėms rūgštims maiste. Siekiant nustatyti karboksirūgštis galima naudoti titrimetrijos, spektrofotometrijos ar fermentinius metodus. Pritaikant fermentinius metodus, galima atlikti kiekybinę organinių rūgščių analizę. Tam yra naudojami fermentai, kurie katalizuoja reakciją su tam tikra organine rūgštimi. Stebimas kofermentų redukuoto nikotinamido adenino dinukleotido (NADH) ir redukuoto nikotinamido adenino dinukleotido fosfato (NADPH) absorbcijos padidėjimas arba sumažėjimas (ties 340 nm bangos ilgiu). Šis metodas yra specifiškas, todėl gali nustatyti ir konkrečios karboksirūgšties L ir D izomerus (pvz. obuolių rūgštis, pieno rūgštis) [137]. Vienas iš šio metodo trūkumų yra tas, kad tyrimo metu nustatoma tik viena organinė rūgštis. Naudojami mėginiai yra nestabilūs, todėl analizė turi būti atliekama kuo greičiau [138].

Dažnai konkrečios karboksirūgšties kokybinė ir kiekybinė analizė yra atliekama naudojant kapiliarinę elektroforezę ir chromatografinius metodus, t. y. naudojant skysčių ar dujų chromatografiją [139, 140]. Kapiliarinės elektroforezės metu galima nustatyti kelias organines rūgštis vienu metu. P. Brugnerotto ir bendraautoriai [141] atliko tyrimą, kurio metu tyrė organines rūgštis esančias meduje. Analizės metu buvo aptikta 14 organinių rūgščių. Nors šiuo metodu vienu metu galima aptikti daugiau nei vieną organinę rūgštį, tačiau šis metodas nėra pakankamai tikslus ir jautrus lyginant su skysčių ar dujų chromatografija [141, 142].

Chromatografiniai metodai yra dažnai taikomi kokybinei ir kiekybinei organinių rūgščių analizei maisto produktuose [143]. Vienu metu galima nustatyti kelis junginius bei aptikti mažus medžiagų kiekius [144]. Naudojant skysčių chromatografiją dažnai susiduriama su papildomomis procedūromis, kurios yra reikalingos paruošiant mėginį analizei. Tai užima laiko ir reikalauja papildomų sąnaudų [142, 145].

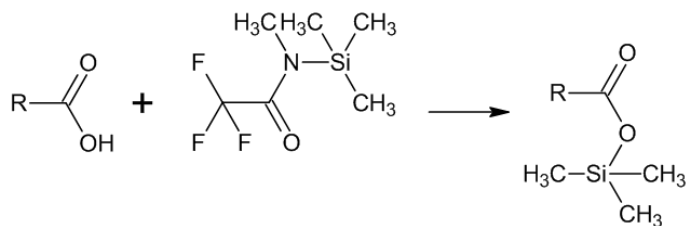
Nors organinių rūgščių nustatymui gana plačiai taikoma kapiliarinė elektroforezė ir skysčių chromatografija, tačiau dėl paprastumo, gero efektyvumo, puikaus jautrumo ir atrankumo dažnai pasirenkama dujų chromatografija. Analizuojant trumpagrandes karboksirūgštis dažniausiai

naudojami masių spektrometrinis ir liepsnos fotometrini detektoriai [137]. Mokslininkų komanda iš Ispanijos tyrė organines rūgštis dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu maisto produktuose [146]. Jiems pavyko identifikuoti 29 organines rūgštis, tarp kurių buvo ir tokios karboksirūgštys kaip acto, pieno, obuolių, gintaro, citrinos.

Trumpą anglies atomų grandinę turinčios karboksirūgštys gali būti nustatomos tiesiogiai mėginį leidžiant į dujų chromatografą. M. H. Yang ir Y. M. Choong atliko tyrimą [135], kurio metu priatikė tiesioginį mėginio įleidimą į dujų chromatografo garintuvą. Tačiau taip atliekant analizę gaunamas prastesnis efektyvumas, atsikartojamumas ir išlieka galimybė užteršti kolonėlę. Siekiant pagerinti medžiagų lakumą, analizinio metodo charakteristikas, skiriamąją gebą, prieš dujų chromatografinę analizę atliekama karboksirūgščių derivatizaciją [146].

Derivatizacijos metu cheminių reakcijų pagalba vieni junginiai paverčiami kitais [147-149]. Dujų chromatografinės analizės atveju derivatizacija taikoma nelakiems junginiams paversti lakesniais junginiais, sumažinant polinių grupių skaičių molekulėje (pvz. -SH, -OH, -NH ir -COOH grupių). Dažnai tai būna alkilinimo, acilinimo ar silinimo reakcijos. Analizuojant karboksirūgštis dažniausiai yra atliekamos silinimo ir alkilinimo reakcijos.

Silinimo reakcijos yra vienos iš populiariausių naudojamų derivatizacijos metodų. Silinimo metu įvedama sililo grupė ir susidaro sililo derivatai turintys $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ grupę (žr. 1.21 pav.).



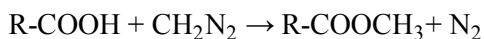
1.21 pav. Karboksirūgščių derivatizacijos schema atliekant silinimo reakciją. Derivatizacijos reagentas – N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamidas (MSTFA) [150].

Silinimo reakcijos metu sumažėja junginio poliškumas ir padidėja jo terminis stabilumas. Silinimo reakcijos tinkamos daugeliui junginių derivatizuoti. Silinimo reagentų pasirinkimas platus, tačiau dažnai silinimo reagentai reikalauja griežtesnių laikymo sąlygų ir yra jautresni aplinkos poveikiui. Naudojant silinimo reagentus, svarbu atsižvelgti į naudojamą

dujų chromatografo kolonėlės tipą. Sililinimo reagentai gali derivatizuoti stacionarios fazės funkcines grupes, turinčias aktyvaus vandenilio [151].

Karboksirūgščių derivatizacijai gali būti naudojami trimetilsililimidazolas (TMSI), bistrimetilsililtrifluoroacetamidas (BSTFA), N-metil-N-butildimetilsililtrifluoroacetamidas (MTBSTFA) ir kiti derivatizacijos reagentai [152]. L. Jarukas ir bendraautoriai [153] pritaikė MTBSTFA derivatizacijos reagentą analizuojant šafrane esančias tris organines rūgštis: pieno, glikolio ir obuolių rūgštis. Visų trijų analizuotų organinių rūgščių aptikimo ribos buvo nuo 0,317 iki 0,410 µg/ml, nustatymo ribos – nuo 0,085 iki 1,53 µg/mL. Didžiausia pieno, glikolio ir obuolių rūgščių išėiga gauta naudojant 0,1 mL MTBSTFA ir derivatizaciją atliekant 90 min. 130 °C temperatūroje.

Kitas metodas yra **alkilinizimas**. Tai metodas, kurio metu aktyvūs vandeniliai pakeičiami alkilo grupe (žr. 1.22 pav.). Alkilinimo reakciją karboksirūgštims galima atlikti naudojant tokius derivatizacijos reagentus kaip DMF ar diazometaną (N₂CH₂), kurie yra naudojami karboksirūgščių esterifikacijai iki metilo esterių, tetrabutilamonio hidroksidą, kuris suformuoja butilo esterius su ilgesėmis sulaikymo trukmėmis ir kitus [152, 154]. Alkilinimui gali būti naudojamas vienas arba keli reagentai. Naudojant kelis reagentus, antrasis būna acilinimo arba silinimo reagentas. Vykdamas esterifikaciją papildomai gali reikėti naudoti katalizatorius. Dažniausiai tai būna neorganinės rūgštys, pvz. HCl [152].



1.22 pav. Karboksirūgščių derivatizacijos schema atliekant alkilinizimo reakciją. Derivatizacijos reagentas – diazometanas [155].

Alkilinimo metu gaunami stabilūs junginiai ir gali būti naudojamas platus pH terpės intervalas. Tačiau alkilinizimui naudojami toksiški reagentai ir privaloma laikytis griežtų atlikimo sąlygų.

Priešingai nei silinimo metu, atliekant alkilinizimą derivatizacija įvyksta greitai ir nereikalingas šildymas ar vandens pašalinimas. Daugumos reagentų kainos yra mažesnės, paprastesnis derivatų atskyrimas nuo mėginio matricos, o tai leidžia mažiau užteršti dujų chromatografijos kolonėlę.

Paskutinis derivatizacijos metodas – **acilinimas**. Šis metodas gali būti naudojamas kaip papildomas etapas prieš karboksirūgščių esterifikaciją. Atliekant acilinimo reakcijas, susidaro šalutiniai produktai. Tai gali būti anhidridai, kuriuos reikia pašalinti kitu tirpikliu prieš dujų chromatografinę

analizē. Karboksirūgšņu acilīnimui gali būti naudojami tokie reagentai kaip pentafluorpropano anhidridas, pentafluoropropanolis ir kiti [152].

2. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1 Reagentai

Riebalų oksidacijos indikatoriaus heksanalio nustatymui viršerdvės dujų chromatografijos metodu naudoti reagentai: n-tetradekanas ($C_{14}H_{30}$, $\geq 99\%$), šlapalas (99%), (\pm)-mentolis (98%), oktano rūgštis (98%), tetrabutilamonio hidrosulfatas (TBAHS) (97%), glicerolis (Gly) (99,5%) pirkti iš Sigma Aldrich (Vokietija), heksanalis (98%), heptanalis (97%), benzaldehidas (99%), cholino chloridas (98%), 1-oktanolis (98%) įsigyti iš Alfa Aesar (Vokietija), N,N-dimetilformamidas (99,8%), D(+)-gliukozė bevandenė (Glu) (99%), oksalo rūgšties dihidratas (99%), etilenglikolis (Eg) ($\geq 99\%$), įsigytas iš Roth.

Karboksirūgščių nustatymui naudoti reagentai: acetonas ($\geq 99,9\%$), heksanas ($\geq 98,5\%$), acto rūgštis (CH_3COOH , $\geq 99\%$), oksalo rūgštis ($\geq 99\%$), propano rūgštis ($\geq 99,5\%$), gintaro rūgštis ($\geq 99\%$), pieno rūgštis ($\geq 98\%$), obuolių rūgštis ($\geq 98\%$), citrinų rūgštis ($\geq 99,5\%$), tributilboratas ($\geq 99,0\%$), vandenilio chloridas (36,5 – 38,0%), dietileteris (DEE) ($\geq 99,5\%$). Reagentai pirkti iš Sigma-Aldrich (Vokietija). N,O-Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamidas ($\geq 98\%$), acetonas ($\geq 99,9\%$) ir dimetilformamidas ($\geq 99,8\%$) įsigyti iš Roth.

Dujų chromatografijai naudotos helio dujos (99,999%).

2.2 Tirpalai

Karboksirūgščių nustatymui neatliekant derivatizacijos, darbiniai standartiniai karboksirūgščių tirpalai (1 mg/ml) ruošiami acetone.

Karboksirūgščių nustatymui naudojant derivatizaciją, pradiniai oksalo, pieno, gintaro, obuolių ir citrinų rūgščių tirpalai (1 mg/ml) ruošiami acetone, DEE ir DMF. Darbiniai karboksirūgščių tirpalai gaminami tyrimo dieną paimant atitinkamus pradinių tirpalų kiekius ir skiedžiant juos atitinkamu tirpikliu.

Riebalų oksidacijos indikatoriaus heksanalio nustatymui viršerdvės dujų chromatografijos metodu naudoti pirminiai standartiniai 2 mg/ml heksanalio tirpalai N,N-dimetilformamide (ruošiami praskiedžiant tiksliai pasvertą heksanalio kiekį su N,N-dimetilformamidu).

Pirminis standartinis 10 mg/ml heksanalio tirpalas n-tetradekane ruošiamas praskiedžiant tiksliai pasvertą heksanalio kiekį reikiamu kiekiu n-tetradekano.

Pirminis standartinis 10 mg/g heksanalio tirpalas kokosų aliejuje ruošiamas praskiedžiant tiksliai atsvertą heksanalio kiekį reikiamu kiekiu kokosų aliejaus. Heksanalio ir benzaldehido mėginiai kokosų aliejuje (5 mg/g) pagaminti praskiedžiant tiksliai pasvertus reikiamus heksanalio ir benzaldehido kiekius kokosų aliejumi. 0,1 mg/g benzaldehido tirpalas kokosų aliejuje pagamintas atskiedžiant tiksliai pasvertą benzaldehido tirpalą kokosų aliejumi. Mažesnių koncentracijų tirpalai gauti skiedžiant atitinkamu tirpikliu pirminius standartinius tirpalus.

Gilūs eutektiniai tirpikliai buvo ruošiami panaudojant mikrobangų reaktorių. Gilaus eutektinio tirpiklio komponentai buvo sumaišyti 2.1 lentelėje nurodytu moliniu santykiu. Visi gilūs eutektiniai tirpikliai buvo sudaryti iš dviejų komponentų, išskyrus ChCl-Glu-H₂O (naudojamas trečias komponentas – vanduo, kuris sudarė 30 %). Reikiamas kiekis komponentų pasvertas ir patalpintas į mikrobangų reaktoriaus indelį. Indelis kaitinamas 80 °C temperatūroje veikiant mikrobangomis 30 s maišant 600 aps./min. greičiu.

2.1 lentelė Gilių eutektinių tirpiklių sudėtis.

Gilus eutektinis tirpiklis	Vandenilinio ryšio akceptorius	Vandenilinio ryšio donoras	Trečias komponentas	Molinis santykis
ChCl-Gly	ChCl	Gly	H ₂ O	1:2 [156]
ChCl-Eg	ChCl	Eg		1:2 [156]
ChCl-Glu-H ₂ O	ChCl	Glu		1:1:7,67 [157]
ChCl-oksalo r.	ChCl	Oksalo r. × 2 H ₂ O		1:1 [158]
ChCl-šlapalas	ChCl	Šlapalas		1:2 [156]
TBAHS-oktanolis	TBAHS	Oktanolis		1:2 [159]
TBAHS-oktano r.	TBAHS	Oktano r.		1:2 [48]
Mentolis-oktano r.	Mentolis	Oktano r.		1:1 [48]

Atliekant heksanalio nustatymą panaudojant GET, naudojamas polipropileno kapiliaras, užpildytas kokosų aliejumi. Buvo naudojamas 27 cm ilgio kapiliaras. Vienas kapiliaro galas (apytiksliai 2 cm) užlydomas ir kapiliaras pripildomas 100 µl kokosų aliejaus panaudojant 100 µl švirkštą.

2.3 Mėginiai ir jų paruošimas

Karboksirūgštys buvo nustatomos kefyre „Naminis“ (Rokiškis), pomidorų padaže „Felix“ (Austrija), pomidorų pastoje „Favorit“ (Lietuva), duonoje „Ajerų“ (Lietuva), kruasane „7 days“ (Europos Sąjunga), sausainiuose „Plikyti“ (Lietuva), virtose rūkytose vištienos dešrelėse „Berlinki“ (Lenkija), gintare. Maisto produktai įsigyti iš artimiausios

parduotuvės, o gintaras gautas iš Palangos pajūrio, Kaliningrado srities ir Japonijos.

Duonos, kruasanų, sausainių, pomidorų padažo, pamidorų pastos ir kefyro mėginiai pasveriami po 0,2 – 0,37 g ir talpinami į viršerdvės dujų chromatografinį indelį. Įpilama 1 ml trubutilborato ir 0,1 ml konc. HCl.

Virtos rūkytos vištienos dešrelės susmulkinamos ir džiovinamos 70 °C temperatūroje 5 val. 50 mg išdžiovinto mėginio talpinama į viršerdvės dujų chromatografinį indelį ir įpilama 30 µl BSTFA.

Grūstuvėje susmulkinamas gintaras, 20 – 30 mg mėginio talpinama į viršerdvės dujų chromatografinį indelį ir įpilama 30 µl BSTFA.

Heksanalis buvo nustatomas šešiuose aliejuose:

- 1) saulėgrąžų aliejus „Zolotaja semečka“, Rostovas prie Dono, Rusija;
- 2) ypatingai grynas alyvuogių aliejus „La Espanola“, Sevilija, Ispanija;
- 3) pirmo spaudimo rapsų aliejus „Floriol“, Lenkija;
- 4) šalto spaudimo nerafinuotas linų sėmenų aliejus, Latvija;
- 5) rafinuotas kokosų aliejus „Naturalisimo“, Olandija;
- 6) rafinuotas palmių aliejus „Ghee Khanum“, Indija.

Heksanalis buvo nustatomas bulvių traškučiuose su krapais „Estrella“, paprikų ir aitriųjų pipirų skonio bulvių traškučiuose „Estrella“ (UAB „Estrella Baltics“, Lietuva), skrudintoje juodoje duonoje „Klaipėdos plikyta“ (UAB „Klaipėdos duona“, Lietuva). Produktai įsigyti parduotuvėje. Keptos/skrudintos bulvės įsigytos kavinėje „Už tvoros“.

Bulvių traškučiai, skrudintos bulvės ir skrudinta juoda duona sutrinamos grūstuvėje. Bulvių traškučiai (neturintys heksanalio) buvo gaunami kaitinant 80 °C temperatūroje 2 val.

2.4 Įranga ir aparatūra

Karboksirūgščių dujų chromatografinė analizė atlikta dujų chromatografu Shimadzu GC-2010 Plus su liepsnos jonizaciniu detektoriumi (Japonija). Chromatografiniam junginių perskyrimui naudota HP-5 kapiliarinė kolonėlė, kurios ilgis 30 m, vidinis skersmuo 0,25 mm, nejudrios fazės sluoksnio storis 0,25 µm (Agilent, JAV).

Karboksirūgščių viršerdvės dujų chromatografinė analizė atlikta naudojant PerkinElmer Clarus 580 dujų chromatografą su liepsnos jonizaciniu detektoriumi ir automatine mėginių įleidimo iš viršerdvės sistema Perkin Elmer Headspace Sampler Turbomatrix 16 (PerkinElmer, JAV). Chromatografiniam junginių perskyrimui naudota Elite 200

kapiliarinė kolonėlė, kurios ilgis 30 m, vidinis skersmuo 0,25 mm, nejudrios fazės sluoksnio storis 0,25 μm (PerkinElmer, JAV).

Riebalų oksidacijos indikatorius heksanalio nustatymui chromatografiniai tyrimai buvo atliekami dujų chromatografu Perkin Elmer, Clarus 580 su liepsnos jonizaciniu detektoriumi bei automatine mėginių įleidimo sistema Perkin Elmer Headspace Sampler Turbomatrix 16 (Perkin Elmer, JAV). Chromatografiniam junginių perskyrimui naudota kapiliarinė kolonėlė Elite 200, kurios ilgis 30 m, vidinis skersmuo 0,25 mm, nejudri fazė trifluoropropilmetilpolisiloksanas, jos sluoksnio storis 0,25 μm (Perkin Elmer, JAV).

Atliekant heksanalio nustatymą naudojant GET chromatografiniam junginių perskyrimui naudota kapiliarinė kolonėlė RxiR-5Sil MS, kurios ilgis 30 m, vidinis skersmuo 0,25 mm, nejudri fazė 1,4-bis(dimetilsiloksi)fenilendimetilpolisiloksanas, kurio sluoksnio storis 0,25 μm (Perkin Elmer, JAV).

Medžiagų svėrimui buvo naudojamos analizinės svarstyklės Sartorius, svėrimo ribos 0,01-210, tikslumas ± 0,01g (Vokietija) ir analizinės svarstyklės KERN&Sohn GmbH.

Tirpalų pH buvo matuojamas pH matuokliu Hanna (India).

Tirpalų maišymui naudota magnetinė maišyklė RSLAB-11NCD (JAV).

Buvo naudojama ultragarso vonelė VWR Ultrasonic cleaner (Malaizija), vandens termostatas MLW UH (Vokietija), magnetinė maišyklė RH 3 (Vokietija), mikrobangų reaktorius Monowave 450 (Anton Paar).

2.5 Dujų chromatografinės analizės sąlygos nustatant heksanalį

Atliekant dujų chromatografinę analizę naudojamas chromatografas Perkin Elmer, Clarus 580 ir automatinė mėginių įleidimo iš viršerdvės sistema Perkin Elmer Headspace Sampler Turbomatrix 16. Mėginiai kaitinami 110 °C temperatūroje 15 min., įleidimo adatos temperatūra 110 °C, perdavimo linijos temperatūra 120 °C, suspaudimo trukmė 1 min., įleidimo trukmė 0,07 min., garintuvo temperatūra 110 °C, detektoriaus temperatūra 250 °C. Chromatografinės kolonėlės termostato temperatūros programavimo režimas: pradinė temperatūra 40 °C laikoma 1 minutę, po to temperatūra keliama 10 °C/min. greičiu iki 250 °C ir laikoma 5 min.

Judria faze buvo naudojamas helio dujų srautas. Nešančių dujų slėgis prieš kolonėlę 16,7 psi, srauto dalijimas 1:10, oro tūrinis greitis 400 ml/min., vandenilio tūrinis greitis 40 ml/min.

2.6 Dujų chromatografinės analizės sąlygos nustatant karboksirūgštis

Atliekant dujų chromatografinę analizę su chromatografu Shimadzu GC-2010 Plus judria faze naudotas helio dujų srautas. Nešančiųjų dujų tūrinis greitis per chromatografinę kolonėlę – 3 ml/min. Chromatografo garintuvo ir detektoriaus temperatūra palaikoma 250 °C. Srautas dalinamas santykiu 10:1. Buvo naudojamas chromatografinės kolonėlės termostato temperatūros programavimo režimas: pradinė temperatūra 40 °C laikoma 1 minutę, po to temperatūra keliama 5 °C/min. greičiu iki 250 °C.

Karboksirūgščių viršerdvės dujų chromatografinė analizė atliekama įdėjus mėginį ir reagentus į viršerdvės dujų chromatografinį indelį, kuris kaitinamas 95 °C temperatūroje 30 minučių. Įleidimo adatos temperatūra 110 °C. Suspaudimo trukmė 2 min., įleidimo trukmė 0,03 min. Judria faze buvo naudojamas helio dujų srautas. Nešančiųjų dujų slėgis prieš kolonėlę 15,3 psi. Garintuvo temperatūra 110 °C, detektoriaus temperatūra 250 °C. Chromatografinės kolonėlės termostato temperatūros programavimo režimas: pradinė temperatūra 40 °C laikoma 1 minutę, po to temperatūra keliama 10 °C/min. greičiu iki 250 °C.

2.7 Analizės rezultatų įvertinimas

Gauti analizės rezultatai buvo įvertinami remiantis matematine statistika.

Duomenų aritmetinis vidurkis (\bar{x}) charakterizuoja atliktų matavimų rezultatų vidutinę vertę, kuri apskaičiuojama pagal formulę:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i \quad (5)$$

kur n – matavimų skaičius;

x_i – i -tojo matavimo vertė.

Matavimų serijos standartinis nuokrypis (S) parodo atskirų matavimo verčių išbarstymą nuo jų aritmetinio vidurkio. Standartinis nuokrypis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

kur n – matavimų skaičius;

x_i – i -tojo matavimo vertė;

\bar{x} – aritmetinis vidurkis.

Santykinis standartinis nuokrypis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$s_r = \frac{S}{\bar{x}} \quad (7)$$

kur S – standartinis nuokrypis;

\bar{x} – aritmetinis vidurkis.

Vidurkių skirtumo t -testas, naudojamas lyginant kokosų aliejų ir rapsų aliejų, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$t = \frac{x_1 - x_2}{s \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \times n_2}}} \quad (8)$$

kur x_1 – pirmo mėginio vidurkis;

x_2 – antro mėginio vidurkis;

s – apjungtas standartinis nuokrypis;

n_1 – pirmo mėginio matavimų skaičius;

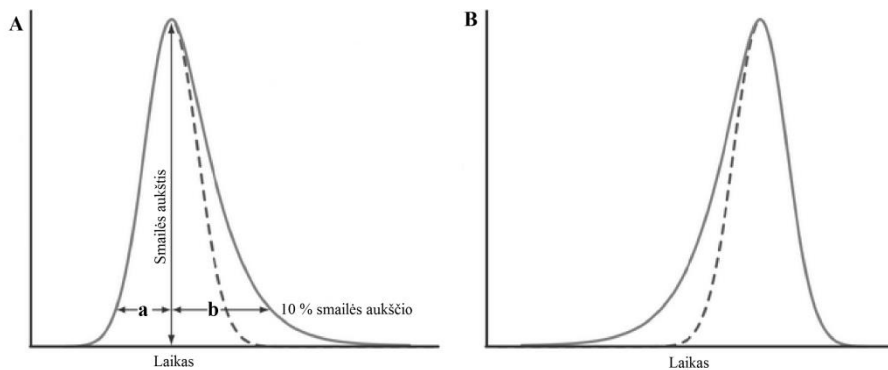
n_2 – antro mėginio matavimų skaičius.

Smailės simetriškumas įvertinamas smailės pločio atkarpų 10 % smailės aukščio tarp smailės kraštų ir statmens, nuleisto iš smailės viršūnės santykiu (žr. 2.1 pav.). Simetriškumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$SF = \frac{b}{a} \quad (9)$$

kur SF – simetriškumo faktorius;

a – atstumas nuo smailės kairiojo šono iki centro 10 % smailės aukščio;
 b – atstumas nuo smailės centro iki dešiniojo šono 10 % smailės aukščio.



2.1 pav. Smailės simetriškumo įvertinimas esant 10 % smailės aukščio. Pateikiama smailė su uodega (A), smailė su frontu (B) ir Gauso formos ideali smailė (brūkšninė linija) [160].

Simetriškos smailės laikomos tuomet, kai $SF = 1$. Labai geras simetriškumas kai SF yra nuo 0,95 iki 1,1 [161].

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Karboksirūgščių viršerdvės dujų chromatografinė analizė

Trumpą anglies atomų grandinę turinčios karboksirūgštys yra randamos maiste. Dėl vykstančių metabolizmo procesų, hidrolizės, gamybos ar laikymo sąlygų jos dažniausiai aptinkamos fermentuotuose maisto produktuose [3]. Taip pat, karboksirūgštys gali būti papildomai pridedamos į maisto produktus kaip konservantai [4].

Nors daugumos trumpą anglies grandinę turinčių karboksirūgščių kiekiai maisto produktuose yra neribojami, tačiau svarbu atsižvelgti į jų kiekius. Kaip buvo minėta literatūros apžvalgoje, esančios maiste ar papildomai pridedamos karboksirūgštys turi įtakos maisto skoniu, tekstūrai, aromatinėms savybėms bei gali būti naudojamos kaip žymekliai galiojimo laikui nustatyti.

Šiuo metu yra nemažai metodų, skirtų karboksirūgščių nustatymui maiste. Dažnai konkrečios karboksirūgštys nustatomos naudojant chromatografinius metodus atliekant tiesioginę analizę arba prieš tai atlikus derivatizaciją. Vis ieškoma naujų metodų, kuriuos pritaikius būtų galima aptikti kuo mažesnes tiriamų junginių koncentracijas, sutrumpinti mėginio paruošimo analizei laiką bei sukurti metodus, kurie būtų draugiškesni aplinkai. Šiame darbe maisto produktuose esančių karboksirūgščių analizei pasiūlyta viršerdvės dujų chromatografinė analizė. Analizuotos septynios karboksirūgštys ir jų dariniai: acto, propano, oksalo, gintaro, pieno, obuolių ir citrinų rūgštys.

Apjungus derivatizaciją (derivatizacijos reagentas – tributilboratas) ir viršerdvės dujų chromatografinę analizę, paruošta metodika acto ir propano rūgščiai nustatyti vandeninėje terpėje. Metodas pritaikytas kepiniams, pomidorų padažui, pomidorų pastai ir kefyrai analizuoti.

Pakeitus derivatizacijos reagentą (naudojant BSTFA), optimizuotos derivatizacijos sąlygos ir metodas pritaikytas citrinų rūgščiai nustatyti. Viršerdvės dujų chromatografija pritaikyta karboksirūgštims identifikuoti kietuose mėginiuose.

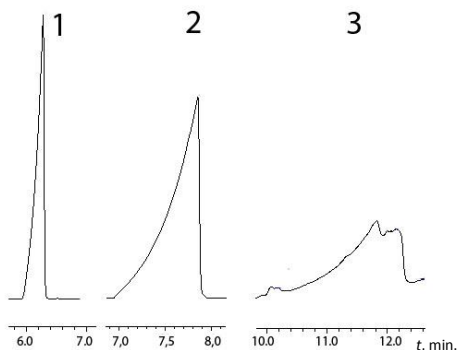
3.1.1. Acto, propano, oksalo ir gintaro rūgščių viršerdvės dujų chromatografinė analizė

Kaip taisyklė, dujų chromatografijos metodu analizuojant polines medžiagas gaunamos asimetriškos, plačios chromatografinės smailės, dėl to nukenčia nustatymo jautrumas ir perskyrimo efektyvumas. Karboksirūgštys

yra polinės, turi stiprų pastovų dipolį stipriai poliarizuojamose karbonilo ir hidroksilo grupėse. Vis dėlto, yra publikuota straipsnių apie laisvos malono rūgšties [162], aminorūgščių [163] dujų chromatografinį nustatymą jų nederivatizavus. Antra vertus, kiti autoriai teigia, kad tai greičiausiai identifikavimo klaida, kad nustatymo rezultatai turi būti patikslinti [164].

I. G. Zenkevich ir N. L. Fakhredinova darbe [165] parodė, kad galima tiesioginė kai kurių karboksirūgščių dujų chromatografinė analizė. Padaroma išvada, kad derivatizacija turi būti naudojama dikarboksirūgštims, tuo tarpu monokarboksirūgštys gali būti nustatomos be derivatizacijos.

Kadangi literatūroje pateikiami rezultatai apie tiesioginį karboksirūgščių dujų chromatografinį nustatymą yra prieštaringi, buvo nuspręsta juos patikrinti eksperimentiškai. Tirtos keturios karboksirūgštys (acto, propano, oksalo ir gintaro rūgštys). Pagaminti karboksirūgščių tirpalai acetone (1 g/l) buvo tiesiogiai įleidžiami į dujų chromatografą, atliekama analizė ir įvertintas smalių simetriškumas. Gauti rezultatai pateikiami 3.1 pav. ir 3.1 lentelėje.



3.1 pav. Nederivatizuotų karboksirūgščių (1 g/l acetone) chromatogramos: 1 – acto rūgštis, 2 – propano rūgštis, 3 – oksalo rūgštis. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.6 skyriuje.

3.1 lentelė. Nederivatizuotų ir derivatizuotų karboksirūgščių smalių simetriškumas esant 10 % smailės aukščio.

	Nederivatizuota	Derivatizuota
Acto rūgštis	0,561	1,033
Propano rūgštis	0,022	0,870
Oksalo rūgštis	–	0,792
Gintaro rūgštis	–	0,913

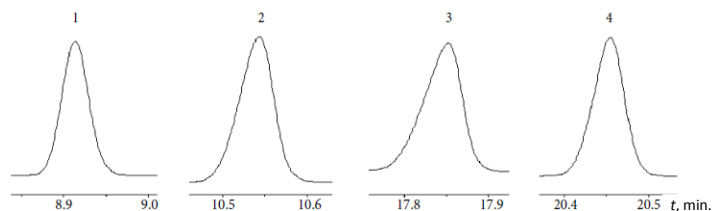
Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, gautos smailės nesimetriškos ir plačios. Acto rūgšties smailės asimetriškumas esant 10 % smailės aukščio – 0,561. Propano rūgšties smailė dar labiau asimetrinė (0,022). Oksalo rūgšties simetriškumą sunku įvertinti, o gintaro rūgšties smailės iš viso nebuvo fiksuota. Šie rezultatai leidžia daryti išvadą, kad pasirinkta chromatografinė kolonėle analizuojant karboksirūgštis, reikalinga derivatizacija.

Literatūros apžvalgoje aprašyti keli karboksirūgščių derivatizacijos būdai. Daugeliu atvejų derivatizacija atliekama bevandeneje terpėje, todėl po derivatizacijos mišinį galima tiesiogiai leisti į dujų chromatografą. Tačiau tokia maisto produktų analizė yra sudėtinga ir ilga – pirmiausiai atliekama analičių ekstrakcija, po to ekstraktas valomas, atliekama derivatizacija. Kadangi naudojamas derivatizacijos reagento perteklius, chromatogramoje matyti didelė derivatizacijos reagento smailė, kuri gali persikloti su analičių smailėmis.

Darbo tikslas buvo paruošti kuo paprastesnį, ekstrakto valymo nereikalaujantį karboksirūgščių nustatymo maisto produktuose būdą, todėl nuspręsta derivatizaciją atlikti vandeninėje terpėje, o susidariusius lakius derivatizacijos produktus pervesti į dujinę fazę ir analizuoti viršerdvės dujų chromatografijos metodu.

Darbe [166] aprašyta alifatinių karboksirūgščių derivatizacija vandeninėje terpėje naudojant derivatizacijos reagentą tributilboratą ir katalizatorių – druskos rūgštį. Sandariame indelyje buvo sumaišoma 0,1 ml karboksirūgšties vandeninio tirpalo, 1 ml tributilborato ir 0,1 ml konc. HCl, kaitinta 95 °C temperatūroje 40 min.

Siekiant įvertinti smailių formą, derivatizacijos produktai ekstrahuoti panaudojus 1 ml heksano, mišinys pilamas į centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojamas 3 min. 5000 aps./min. greičiu. Heksano fazė įleidžiama į dujų chromatografą. Gauti rezultatai pateikiami 3.2 pav. ir 3.1 lentelėje. Iš gautų rezultatų matyti, kad po derivatizacijos gautų karboksirūgščių smailės simetriškesnės ir aptinkamos visos keturios karboksirūgštys.



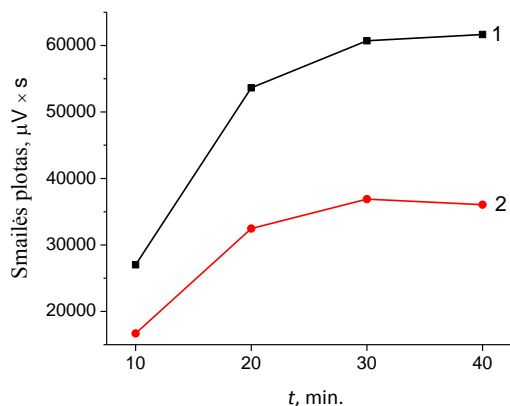
3.2 pav. Tributilboratu derivatizuotų karboksirūgščių (1 g/l) chromatogramos:
1 – acto rūgštis, 2 – propano rūgštis, 3 – oksalo rūgštis, 4 – gintaro rūgštis.
Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.6 skyriuje.

Viršerdvės dujų chromatografijos sąlygų optimizavimas. Kitas darbo etapas – apjungti derivatizaciją ir viršerdvės dujų chromatografinę analizę bei optimizuoti derivatizuotų karboksirūgščių viršerdvės dujų chromatografinės analizės sąlygas.

Vienas iš svarbiausių veiksnių, darančių įtaką derivatizacijai ir analičių perėjimui į dujinę fazę yra temperatūra. Junginių pasiskirstymas tarp mėginio fazės ir dujų fazės priklauso nuo pasiskirstymo koeficiento, kuriam įtakos turi temperatūra. Svarbu, kad mėginiai būtų paruošiami taip, kad kuo didesnė dalis analitės pereitų į dujų fazę (t. y. pasiskirstymo koeficientas būtų kuo mažesnis). Pasiskirstymo koeficiento vertė gali būti sumažinama (analitės koncentracija viršerdvėje padidinama) keliant kaitinimo temperatūrą. Tačiau būtina atsižvelgti į tai, kad atliekant dujų chromatografinę viršerdvės analizę, mėginys kaitinamas uždarame inde. Mėginio temperatūra turi būti mažesnė už pagrindinio mėginio komponento virimo temperatūrą, kadangi slėgis inde gali smarkiai padidėti ir indas gali išsihermetinti ar net sprogti. Taigi analizuojant vandeninius mėginius, indelio kaitinimo temperatūra turi būti mažesnė už 100 °C, t. y., maksimali kaitinimo temperatūra gali būti apie 95 °C. Antra vertus, literatūroje rekomenduojama karboksirūgščių derivatizavimo tributilboratu temperatūra 100 °C [166] yra artima maksimaliai indelio kaitinimo temperatūrai. Dėl to tolimesniam darbui buvo pasirinkta 95 °C temperatūra.

Tyrimai buvo atliekami naudojant 1 g/l vandeninius acto, propano, oksalo ir gintaro rūgšties tirpalus. Į viršerdvės dujų chromatografinį indelį imama 0,1 ml vandeninio rūgšties tirpalo, 0,1 ml konc. HCl ir 1 ml tributilborato. Mišinys kaitinamas 95 °C temperatūroje 40 minučių. Deja, oksalo ir gintaro rūgščių butilo esterių smailių chromatogramose nesimatė. Greičiausiai derivatizacijos produktų lakumas per mažas, kad juos būtų galima nustatyti viršerdvės dujų chromatografijos metodu. Tuo tarpu acto ir propano rūgščių esteriai aptikti, todėl tolimesni derivatizacijos/ekstrakcijos trukmės tyrimai buvo atliekami tik su acto ir propano rūgštimis.

Atliekant viršerdvės dujų chromatografinę analizę siekiama, kad nusistovėtų analičių pusiausvyra tarp mėginio ir viršerdvės. Tai leidžia pasiekti didžiausią ekstrakcijos efektyvumą. Mūsų atveju ekstrakcijos trukmė turi būti ne mažesnė, nei reikalinga derivatizacijai. Buvo ištirta 10 – 40 min. derivatizacijos/ekstrakcijos trukmė. Kaip matyti iš 3.3 pav., acto ir propano rūgščių butilo esterių smailės plotai didėjo ilginant derivatizacijos/ekstrakcijos trukmę iki 30 min., o vėliau nebekito. Tolimesniam darbui pasirinkta 30 min. kaitinimo trukmė.



3.3 pav. Acto (1) ir propano (2) rūgščių derivatizacijos produktų viršerdvėje smalių ploto priklausomybė nuo derivatizacijos/kaitinimo trukmės. Kaitinimo temperatūra 95 °C.

Metodo analizinės charakteristikos. Optimizuotomis derivatizacijos-viršerdvės dujų chromatografijos sąlygomis (derivatizacijos/kaitinimo temperatūra – 95 °C, derivatizacijos/kaitinimo trukmė – 30 min.), nustatytos paruoštų metodikų analizinės charakteristikos. Jos pateiktos 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. Acto ir propano rūgšties derivatizacijos-viršerdvės dujų chromatografinio nustatymo metodikų analizinės charakteristikos.

Charakteristika	Acto rūgštis	Propano rūgštis
Aptikimo riba, mg/l	0,9	3
Nustatymo riba, mg/l	3	10
Tiesiškumas iki, g/l	0,5	0,5
R^2	0,9970	0,9950
$s_r, \% (n = 5, c = 50 \text{ mg/l})$	2,5	3,4

Kalibracinė kreivė buvo sudaroma tris kartus analizuojant septynių koncentracijų acto ir propano rūgšties vandeninius tirpalus. Gautas tiesinis intervalas acto rūgščiai nuo 0,003 g/l iki 0,5 g/l, propano rūgščiai – nuo 0,01 iki 0,5 g/l. Gautos koreliacijos koeficientų vertės didesnės už 0,9950. Rezultatų pasikartojamumas geras, santykinis standartinis nuokrypis 2,5 ir 3,4 % (atitinkamai acto ir propano rūgšties) kai naudojama tirpalo koncentracija 50 mg/l, matavimai atlikti pakartojant po penkis kartus.

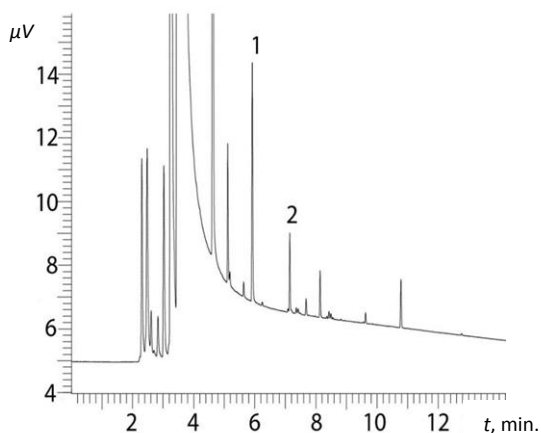
Karboksirūgščių nustatymas realiuose mėginiuose. Metodas pritaikytas analizuoti acto ir propano rūgštį maisto produktuose: trijuose kepinuose (duonoje, kruasanuose ir sausainiuose), pomidorų padaže,

pomidorų pastoje ir kefyre. Tam 0,2 – 0,37 g mėginio buvo patalpinami į viršerdvės analizės indelį, pridėta 1 ml trubutilborato ir 0,1 ml konc. HCl. Indelis sandariai uždarytas ir atliekama analizė optimizuotomis sąlygomis. Gauti rezultatai pateikiami 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Acto ir propano rūgšties kiekiai realiuose mėginiuose.

	Acto rūgštis, g/kg (n = 3; s _r , %)	Propano rūgštis, g/kg (n = 3; s _r , %)
Kefyras	1,8 ± 0,1	0,14 ± 0,01
Pomidorų padažas	7,8 ± 0,4	–
Pomidorų pasta	2,4 ± 0,1	–
Duona	3,9 ± 0,2	–
Kruasanas	1,2 ± 0,1	0,83 ± 0,05
Sausainiai	1,1 ± 0,1	0,49 ± 0,03

Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, acto rūgštis buvo rasta visuose tirtuose mėginiuose. Europos Sąjungoje acto rūgštis maisto produktuose yra nenormuojamas. Acto rūgštis naudojama, norint pasiekti reikiamą pH vertę. Tuo tarpu propano rūgštis aptikta kefyre ir dviejuose kepinių produktuose: kruasanuose ir sausainiuose. 3.4 pav. pateikiama kruasanų viršerdvės dujų chromatograma.



3.4. pav. Kruasanų viršerdvės dujų chromatograma. 1 – acto rūgštis ir 2 – propano rūgštis derivatizacijos produktai. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.6 skyriuje.

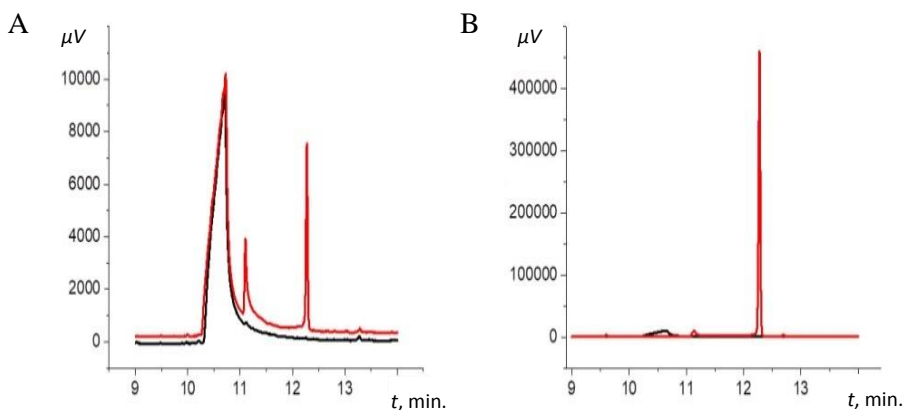
Kruasanai buvo vienintelis produktas, kuriame kalcio propionatas (< 0,1 %) buvo deklaruotas gamintojų. Aptiktas kiekis neviršija konditeriniams gaminiams leistinos 2000 mg/kg normos [5].

Apjungus derivatizaciją ir viršerdvės dujų chromatografiją bei atlikus realių mėginių analizę, toliau nuspręsta praplėsti tyrimą analizuojant ir kitas maisto produktuose dažnai aptinkamas karboksirūgštis: pieno, obuolių ir citrinų.

3.1.2. Pieno, obuolių, citrinų, oksalo ir gintaro rūgšties dujų chromatografinė analizė

Kaip buvo minėta 3.1.1 skyriuje, derivatizuojant tributilboratu viršerdvės dujų chromatografijos metodu pavyko nustatyti tik acto ir propano rūgštis. Siekiant praplėsti metodo ribas, buvo nuspręsta išmėginti naują derivatizacijos reagentą pieno, obuolių, citrinų, oksalo ir gintaro rūgščiai nustatyti maisto produktuose. Derivatizacijos reagentu pasirinktas BSTFA. Naudojant šį reagentą, derivatizacijos reakciją galima vykdyti kambario temperatūroje.

Tiesioginis karboksirūgščių nustatymas panaudojant dujų chromatografiją. Derivatizacijos reagentas BSTFA jautrus drėgmei, todėl pirmiausiai pasirinkta tinkama derivatizacijos terpė. Buvo išmėginti trys tirpikliai: acetonas, DEE ir DMF. Į 1 ml 1 g/l gintaro rūgšties, ištirpintos atitinkamame tirpiklyje, pridėta 50 μ l BSTFA ir po 20 min. mišinys tiesiogiai įleistas į dujų chromatografą. Gauti rezultatai pateikiami 3.5 pav.



3.5 pav. 1 g/l gintaro rūgšties chromatogramos, gautos naudojant acetoną (A) ir DEE (B) prieš (juoda linija) ir po (raudona linija) derivatizacijos BSTFA. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.6 skyriuje.

Analizei naudojant acetoną pastebėta, kad po derivatizacijos susidaro nedidelė gintaro rūgšties derivatizacijos produkto smailė ties 12,25 min., tačiau 10,70 min. fiksuojama smailė, kuri buvo ir prieš derivatizaciją (žr. 3.5 pav. A). Tai rodo, kad derivatizacija vyko nepilnai. Tuo tarpu naudojant

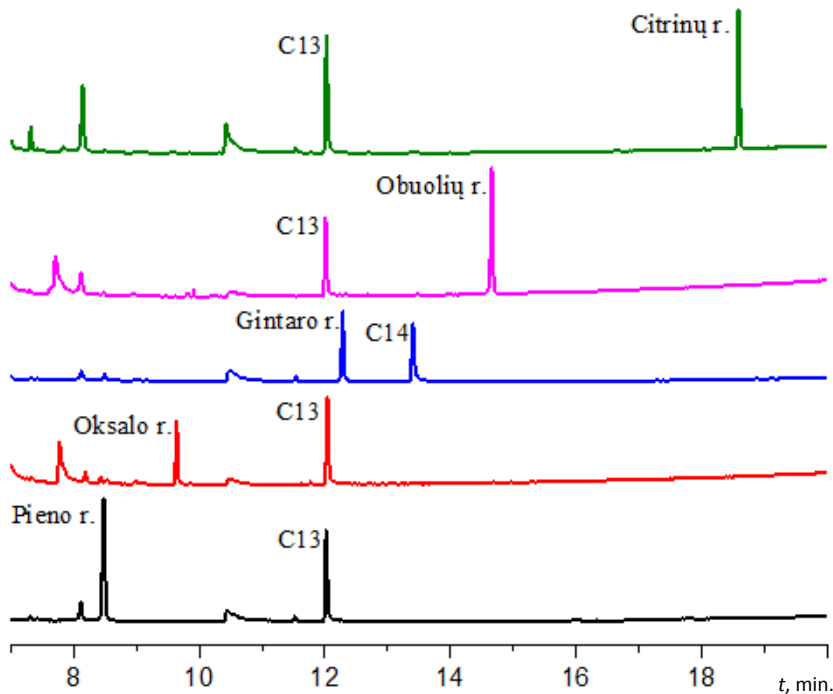
DEE (3.5 pav. B) ar DMF derivatizacija vyko pilnai, kadangi po derivatizacijos fiksuojama tik derivatizacijos produkto smailė.

Kurį iš dviejų tinkamų derivatizacijai tirpiklių – DEE ar DMF – pasirinkti nulėmė poreikis toliau gautą mišinį analizuoti viršerdvės dujų chromatografijos metodu. Norint analizuoti derivatizuotą rūgštį VDChA metodu, būtina atsižvelgti į tirpiklio virimo temperatūrą. DEE virimo temperatūra 34,6 °C, o DMF – 152 °C. Atliekant viršerdvės dujų chromatografinę analizę ir naudojant DEE, indelio kaitinimo temperatūra turėtų būti mažesnė už 34,6 °C. Esant žemai temperatūrai tik nedidelė analitės dalis pereitų į viršerdvę ir aptikimo riba būtų aukšta, todėl viršerdvės dujų analizei tinkamesnis DMF tirpiklis.

Analizei pasirinkus DMF, svarbu parinkti tinkamą derivatizacijos reagento kiekį. Skirtingas BSTFA tūris (nuo 5 iki 50 µl) buvo įdedamas į 1 ml 1 g/l oksalo, pieno, gintaro, obuolių, citrinų rūgšties tirpalus pagamintus DMF ir derivatizacija vykdoma 20 min. Visoms tirtoms karboksirūgštims derivatizuoti pakako 30 µl BSTFA.

Toliau buvo tirta derivatizacijos trukmė keičiant ją nuo 5 iki 60 min. Rezultatai parodė, kad derivatizacijos trukmė neturi įtakos gaunamiems smailių plotams, todėl dujų chromatografinė analizė gali būti atliekama iškart į mėginį pridėjus BSTFA.

Siekiant geresnio rezultatų pasikartojamumo, buvo naudojamas vidinis standartas. Vidiniu standartu naudojama medžiaga neturi būti randama mėginyje (mūsų atveju maisto produktuose), turi būti pilnai atskiriama nuo mėginio komponentų, jos sulaikymo trukmė turi būti artima tiriamų junginių sulaikymo trukmei bei neturi reaguoti su kitais mėginio komponentais. Keturioms iš tirtų rūgščių šiuos reikalavimus atitiko ir vidiniu standartu buvo pasirinktas n-tridekanas. Deja, derivatizuotos gintaro rūgšties smailė persiklojo su n-tridekano smaile, todėl n-tridekanas buvo pakeistas n-tetradekanu. 3.6 pav. pateikiamos gautos chromatogramos su analitėmis ir vidiniu standartu. Vidinio standarto koncentracija karboksirūgščių tirpaluose – 0,01 g/l.



3.6 pav. Derivatizuotų karboksirūgščių (1 g/l) naudojant DMF chromatogramas su vidiniu standartu. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.6 skyriuje.

Metodo analizinės charakteristikos. Optimizuotomis derivatizacijos sąlygomis buvo nustatytos paruošto metodo analizinės charakteristikos, kurios pateiktos 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. Karboksirūgščių nustatymo analizinės charakteristikos.

	Sulaikymo trukmė, min.	s_r , % ($c = 10$ mg/l, $n = 5$)	R^2	Aptikimo riba, mg/l
Pieno rūgštis	8,48	2,2	0,9990	0,27
Oksalo rūgštis	9,61	4,9	0,9960	0,55
Gintaro rūgštis	12,25	4,5	0,9970	0,59
Obuolių rūgštis	14,65	4,2	0,9980	0,51
Citrinų rūgštis	18,58	3,1	0,9990	0,33

Kalibracinė kreivė buvo sudaroma tris kartus analizuojant septynių koncentracijų karboksirūgšties tirpalus. Kalibracinės kreivės visoms analitėms tiesinės iki 1 g/l. Koreliacijos koeficiento vertės didesnės už 0,9960. Rezultatų pasikartojamumas geras, santykinis standartinis nuokrypis

nuo 2,2 iki 4,9 % kai analizės koncentracija 10 mg/l, matavimai atlikti pakartojant po penkis kartus.

Karboksirūgščių viršerdvės dujų chromatografinė analizė. Kitas darbo etapas buvo ištirti galimybę nustatyti pieno, oksalo, gintaro, obuolių ir citrinų rūgštis VDChA metodu. Rūgštims derivatizuoti buvo naudojamos tos pačios optimizuotos derivatizacijos sąlygos kaip ir atliekant tiesioginę dujų chromatografijos analizę.

Pirmiausiai buvo dirbama su grynomis karboksirūgštimis. Tam 10 – 20 mg kiekvienos analizės įdedama į viršerdvės dujų chromatografinį indelį ir pridama 30 µl BSTFA. Indelis kaitinamas 5 min. 200 °C temperatūroje ir atliekama viršerdvės dujų chromatografinė analizė (sąlygos pateikiamos 2.6 skyriuje). Pateiktomis sąlygomis visos penkios karboksirūgštys buvo aptinkamos.

3.5 lentelė. Derivatizuotų karboksirūgščių aptikimo ribos atlikus viršerdvės dujų chromatografinę analizę.

Aptikimo riba, mg/l	
Pieno rūgštis	22
Oksalo rūgštis	19
Gintaro rūgštis	45
Obuolių rūgštis	87
Citrinų rūgštis	–

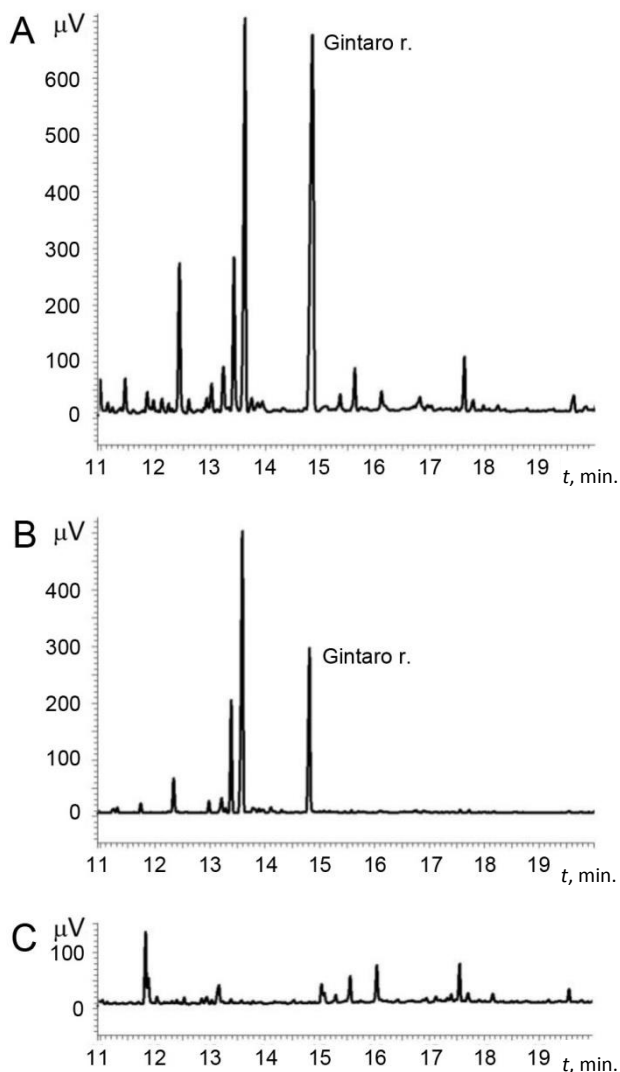
Karboksirūgščių nustatymui toliau kaip tirpiklis naudojamas DMF. Kadangi viršerdvės indelio kaitinimo temperatūra negali viršyti tirpiklio virimo temperatūros (152 °C), viršerdvės analizei pasirinkta 140 °C temperatūra. Norint, kad kuo didesnis analizės kiekis pereitų į viršerdvę, kaitinta 20 min. Kaip matyti iš 3.5 lentelėje pateiktų rezultatų, gautos gana didelės aptikimo ribos (pvz. obuolių rūgštis – 87 mg/l). Citrinų rūgštis iš vis nebuvo aptikta.

Norint gauti mažesnes aptikimo ribas, reikalingas kitas tirpiklis, kurio virimo temperatūra būtų didesnė už DMF.

Nenaudojant tirpiklio, viršerdvės dujų chromatografinė analizė gali būti pritaikoma karboksirūgščių identifikavimui sausuose mėginiuose.

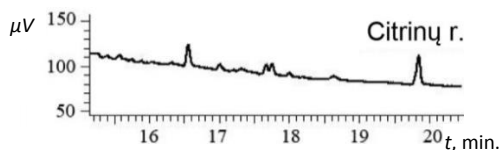
Viena iš pritaikymo sričių galėtų būti gintaro rūgštis nustatymas gintare. Gintaras yra organinės kilmės mineralas, susidaręs sustingus spygliuočių augalų sakams. Jis paplitęs visame pasaulyje, tačiau skiriasi savo sudėtimi. Gintaro rūgštis aptinkama tik Baltijos jūros regiono gintare [167]. Todėl Baltijos jūros gintaras gali būti identifikuojamas jame radus gintaro rūgštis.

Atlikta Japonijos gintaro, gintaro, rasto Palangos pajūryje ir iškasto Kaliningrado srityje analizė. Gintaras buvo sugrūdamas grūstuvėje, į viršerdvės indelį atsveriama 20 – 30 mg, užpilama 30 μ l BSTFA ir atliekama VDChA kaitinant indelį 200 $^{\circ}$ C temperatūroje 15 min. 3.6 pav. pateiktos Palangos (A), Kaliningrado (B) ir Japonijos (C) gintaro chromatogramos. Palangos ir Kaliningrado gintaro chromatogramose aiškiai matyti gintaro rūgšties smailė, o japoniško gintaro chromatogramoje jos nėra.



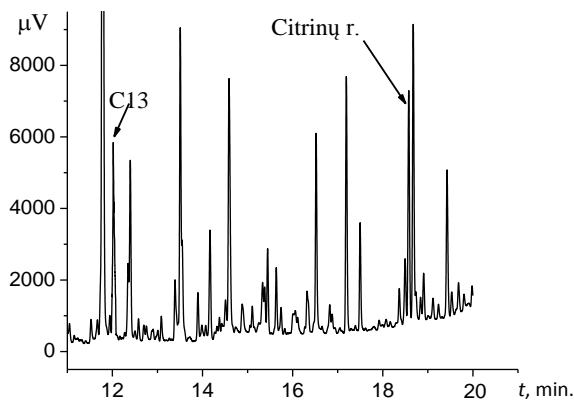
3.6 pav. Palangos (A), Kaliningrado (B) ir Japonijos (C) gintaro viršerdvės dujų chromatogramos. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.6 skyriuje.

Viršerdvės dujų chromatografinė analizė buvo pritaikyta ir aptinkant citrinų rūgštį maisto produktuose (virtose rūkytose vištienos dešrelėse „Berlinki“ (Lenkija). Dešrelėse citrinų rūgštis yra naudojama norint sureguliuoti rūgštingumą. Kadangi BSTFA yra jautrus drėgmei, tai dešrelės prieš analizę buvo susmulkintos ir 5 val. džiovintos 70 °C temperatūroje. 50 mg išdžiovinto mėginio patalpinta į viršerdvės dujų chromatografinį indelį, pridėta 30 μl BSTFA ir 15 min. kaitinta 200 °C temperatūroje. Viršerdvės dujų chromatogramoje matoma derivatizuotos citrinų rūgšties smailė (3.7. pav.).



3.7. pav. Dešrelių viršerdvės chromatograma. Derivatizacijos reagentas BSTFA. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.6 skyriuje.

Kiekybiniam citrinų rūgšties nustatymui dešrelėse pritaikyta tirpalo dujų chromatografinė analizė. Tam į 0,5 g susmulkintų dešrelių pridėta 5 ml DEE ir ekstrahuota 5 min. Mėginys 1 min. centrifuguojamas 5000 aps./min. greičiu. 3 ml ekstrakto išgarinta iki sausos liekanos, pridėta 1 ml vidinio standarto DMF tirpale ir 30 μl BSTFA. Gautas tirpalas įleistas į dujų chromatografą ir atlikta citrinų rūgšties analizė. Chromatograma pateikiama 3.8 pav.



3.8 pav. Dešrelių ekstrakto (DMF) po derivatizacijos BSTFA chromatograma. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.6 skyriuje.

Nustatyta, kad citrinų rūgšties kiekis dešrelėse yra 0,12 mg/g. Pastebėta, kad priešingai nei atliekant viršerdvės dujų chromatografinę analizę, chromatogramoje matyti daug papildomų smailių, o tai turi įtakos dominančios analitės atskyrimui. Gautas prastas rezultatų atsikartojamumas (21,3 %, $n = 3$).

3.2 Heksanolio viršerdvės dujų chromatografinė analizė

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, augalinės kilmės riebaluose esančios nesočiosios riebalų rūgštys yra linkusios oksiduotis. Dėl to pablogėja riebalingo maisto skonis ir išvaizda, sumažėja maistinė vertė, iškyla grėsmė apsinuodyti lipidų oksidacijos produktais. Siekiant užtikrinti gerą maisto kokybę, svarbu gebėti greitai nustatyti riebalų oksidaciją. Vienas iš efektyviausių būdų spręsti apie riebalų rūgščių oksidaciją remiasi heksanolio kiekio nustatymu, kadangi heksanalis yra antrinis n-6 riebalų rūgščių oksidacijos produktas ir laikomas riebalų oksidacijos indikatoriumi.

Heksanalis yra lakus junginys, todėl šio junginio nustatymui galima pritaikyti dujų chromatografiją. Dažnai maisto produktai būna sudėtingi mišiniai, kuriuose yra nelakių junginių. Nelakūs junginiai patekę į chromatografinę sistemą ją užterštų. Dėl to prieš analizę heksanalį būtina atskirti nuo nelakios matricos. Naudojant tradicinius ekstrakcijos metodus, šis procesas yra ilgas ir reikalauja daug darbo sąnaudų.

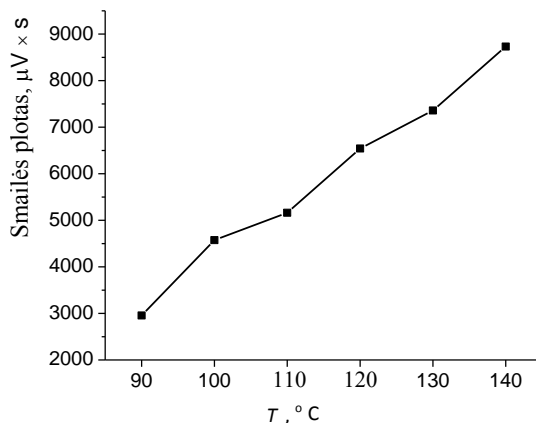
Šiuo metu vienas iš greitų ir efektyvių lakių organinių junginių atskyrimo nuo sudėtingos matricos būdų yra jų pervedimas į dujinę fazę. Dujinę fazę labai patogu analizuoti dujų chromatografijos metodu naudojant, viršerdvės dujų chromatografijos prietaisus, kurie leidžia apjungti ir automatizuoti lakių junginių ekstrakciją į dujinę fazę ir dujų chromatografinį tų junginių nustatymą.

Šiame skyriuje pateikiama galimybė pritaikyti viršerdvės dujų chromatografiją heksanolio nustatymui skystose (augaliniuose aliejuose) ir kietose matricose.

3.2.1. Heksanolio nustatymas augaliniuose aliejuose

Tyrimui pasirinkti keturi dažniausiai naudojami augalinės kilmės aliejai: alyvuogių, saulėgrąžų, rapsų ir linų sėmenų. Kuriant heksanolio nustatymo maistiniuose augaliniuose aliejuose metodiką, reikia parinkti kalibravimui naudojamą tirpiklį, optimizuoti tirpiklio kiekį, mėginio kaitinimo temperatūrą ir trukmę bei dujų fazės įleidimo į dujų chromatografą trukmę.

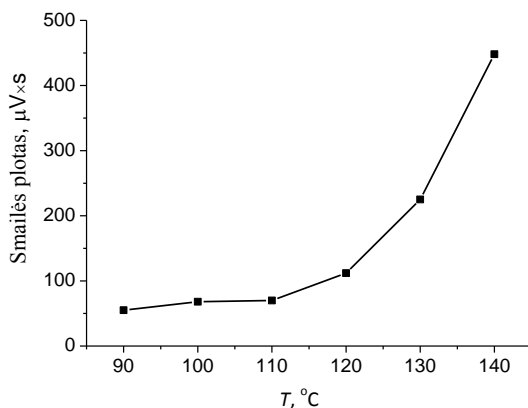
Tirpiklio parinkimas. Vienas iš veiksnių, įtakančių heksanalio kiekį dujinėje fazėje, yra mėginio kaitinimo temperatūra – kuo ji didesnė, tuo daugiau analitės pereina į viršerdvę. Tai buvo parodyta kaitinant heksanalio tirpalą dimetilformamide (1 g/l) 90 – 140 °C temperatūroje 10 min. (3.9 pav.).



3.9 pav. Heksanalio smailės ploto priklausomybė nuo mėginio kaitinimo temperatūros. Heksanalio tirpalo DMF koncentracija 1 g/l, kaitinimo trukmė 10 min.

Iš 3.9 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad kylant mėginio kaitinimo temperatūrai, heksanalio kiekis viršerdvėje didėja. Antra vertus, aukštoje temperatūroje nesočios riebalų rūgštys oksiduojasi, gali papildomai susidaryti heksanalio, kuris yra antrinis linolo rūgšties oksidacijos produktas. Todėl pirmiausiai buvo tirta, iki kokios maksimalios temperatūros galima kaitinti aliejų, kad jis neskiltų. Tyrimams pasirinktas saulėgrąžų aliejus. Jame yra 65 – 78 % linolo rūgšties [168-170], tai daug daugiau nei daugumoje kitų maistinių aliejų. Pavyzdžiui, linolo rūgšties kiekis alyvuogių aliejuje yra 3,5 – 21 % [170, 171], rapsų aliejuje 13,8 – 30 % [169, 170, 172], sėmenų aliejuje 7,6 – 24 % [169, 172, 173]. Taigi saulėgrąžų aliejus yra tinkamiausias stebėti linolo rūgšties skilimą kaitinant.

Buvo nustatyta, kad kaitinant saulėgrąžų aliejų aukštesnėje nei 110 °C temperatūroje, heksanalio kiekis ėmė didėti (3.10 pav.). Taigi maksimali mėginio kaitinimo temperatūra, kuri nesukelia heksanalio susidarymo, yra 110 °C. Tokia temperatūra pasirinkta kaip optimali tolesniam darbui.

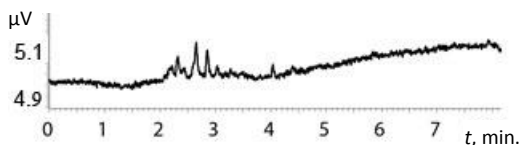


3.10 pav. Temperatūros įtaka heksanalio smalės plotui saulėgražų aliejuje. Aliejus kaitintas 10 min.

Heksanalio kiekis dujinėje fazėje priklauso nuo analičių pasiskirstymo tarp fazių, o tai savo ruožtu priklauso nuo fazių prigimties. Kiekybiniam įvertinimui būtina pasiekti, kad analitės pasiskirstymas tarp kalibravimo tirpalo ir viršerdvės būtų toks pats, kaip tarp mėginio ir viršerdvės. Mūsų atveju mėginiai – neskiesti augaliniai aliejai, todėl kalibravimo tirpalai turi būti jiems giminingi. Literatūroje aprašytose heksanalio nustatymo augaliniuose aliejuose metodikose kalibravimo tirpalais paprastai naudojami švieži atitinkami aliejai arba šviežias rapsų aliejus [30, 174, 175]. Tačiau daugelyje maistingų aliejų yra didelis kiekis nesočiųjų riebalų rūgščių, todėl aliejuose paruošti standartiniai tirpalai turėtų būti laikomi trumpai ir žemoje temperatūroje, kadangi jiems oksiduojantis galėtų susidaryti papildomas heksanalio kiekis.

Siekiant paruošti standartinius heksanalio tirpalus su stabilia ir ilgą laiką nekintančia heksanalio koncentracija, išbandytas kokosų aliejus. Kokoso aliejuje yra didelis sočiųjų riebalų kiekis (> 85 %) [176], todėl šis aliejus lėtai oksiduojasi.

Norint patikrinti kokoso aliejaus tinkamumą kalibracinių heksanalio tirpalų gaminimui, jis buvo kaitintas iki 180 °C temperatūros 30 min. ir analizuojamas viršerdvės dujų chromatografinės analizės metodu. Gauta chromatograma pateikta 3.11 pav. Iš chromatogramos matyti, kad heksanalis nėra aptinkamas (heksanalio sulaikymo trukmė turėtų būti 5,74 min.).



3.11 pav. Kokosų aliejaus viršerdvės dujų chromatograma. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5. skyriuje.

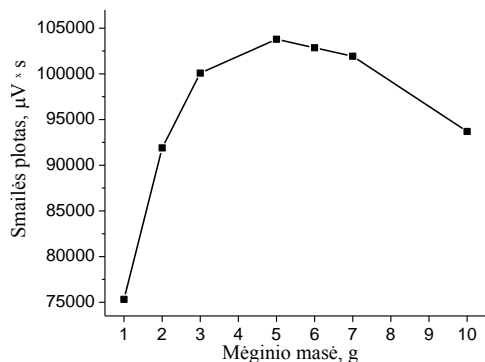
Norint gauti teisingus analizės rezultatus būtina, kad heksanalio pasiskirstymas tarp tiriamo aliejaus ir viršerdvės būtų artimas heksanalio pasiskirstymui tarp kalibravimo tirpalams naudojamam tirpikliui (mūsų atveju kokosų aliejaus) ir viršerdvės.

Lakių medžiagų perėjimas iš skystos fazės į dujinę labai priklauso nuo skystos fazės klampos. Tirtų augalinių aliejų klampos didėja tokia seka: sėmenų aliejus, kokosų aliejus, saulėgrąžų aliejus, alyvuogių aliejus ir rapsų aliejus [177, 178]. Siekiant ištirti kokoso aliejaus tinkamumą heksanalio kalibravimo tirpalams gaminti, buvo paruošti heksanalio tirpalai (1 ir 0,1 g/kg) kokosų aliejuje ir šviežiam rapsų aliejuje. Rapsų aliejus buvo pasirinktas dėl to, kad jo klampa labiausiai skyrėsi nuo kokosų aliejaus klampos. Tikėtina, kad gavus teisingus rezultatus su labiausiai besiskiriančiu klampa aliejumi, jie bus teisingi ir kitiems aliejams.

Po 1 g kiekvieno tirpalo buvo analizuojama VDChA metodu kaitinant 110 °C temperatūroje 20 min. Analizė buvo kartojama tris kartus.

Dviems tos pačios koncentracijos duomenų rinkiniams skirtinguose aliejuose buvo atlikti vidurkių skirtumo t-testas [179]. Testas parodė, kad abiemis tirtoms koncentracijoms nebuvo reikšmingo skirtumo tarp vidutinio heksanalio kiekio kokosų aliejuje ir rapsų aliejuje. Tai įrodo, kad heksanalio kalibravimo tirpalus kokosų aliejuje galima naudoti heksanalio kiekiui nustatyti kituose maistiniuose aliejuose.

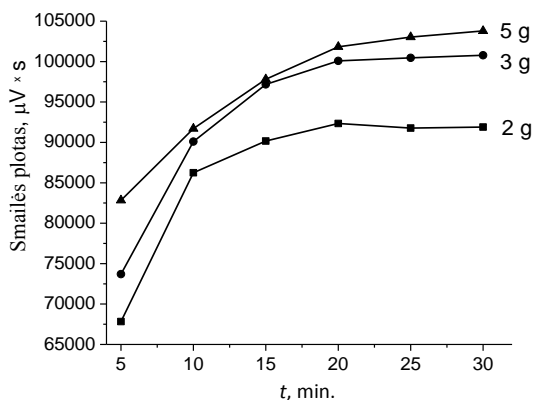
Mėginio kiekio ir kaitinimo trukmės parinkimas. Analizei naudojamas aliejaus kiekis turi įtakos analitės, šiuo atveju heksanalio, koncentracijai viršerdvėje. Dažnai didinant mėginio kiekį, analitės koncentracija viršerdvėje didėja, tačiau taip pat ilgėja pusiausvyros nusistovėjimo trukmė. Siekėme, kad pusiausvyros nusistovėjimo trukmė nebūtų didesnė nei 30 min. Todėl, norint nustatyti tinkamiausią mėginio kiekį, buvo tiriama nuo 1 iki 10 g kokosų aliejaus mėginio, kuriame heksanalio koncentracija 1 g/kg. Mėginiai kaitinami 30 min. 110 °C temperatūroje.



3.12 pav. Heksančio smailės ploto priklausomybė nuo mėginio kiekio. Heksančio koncentracija kokosų aliejuje 0,1 g/kg, pusiausvyros nusistovėjimo temperatūra 110 °C, trukmė 30 min.

Kaip matyti iš gautų rezultatų (žr. 3.12 pav.) didinant mėginio kiekį nuo 1 iki 5 g heksančio smailės plotas didėja, tačiau vėliau pradeda mažėti. Tai parodo, kad didinant mėginio kiekį virš 5 g reikalinga ilgesnė pusiausvyros nusistovėjimo trukmė.

Norint nustatyti, kokia turėtų būti mėginio kaitinimo trukmė buvo analzuojami 2, 3 ir 5 g mėginiai. Skirtingi mėginio kiekiai su 0,1 g/kg heksančio tirpalo kokosų aliejuje buvo kaitinama 110 °C temperatūroje nuo 5 iki 30 min. 1 g mėginio nebuvo analizuojama, kadangi heksančio koncentracija viršerdvėje yra gana maža. Gauti rezultatai pateikiami 3.13 pav.

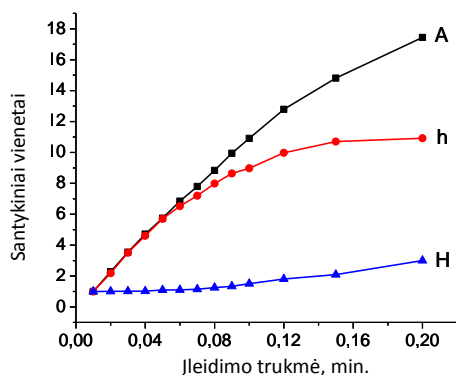


3.13 pav. Heksančio smailio ploto priklausomybė nuo kaitinimo trukmės kai naudojama 2, 3 ir 5 g 0,1 g/kg heksančio tirpalo kokosų aliejuje ir kaitinama 110 °C temperatūroje.

Kaip matyti iš gautų rezultatų, kai analizuojama 2 ir 3 g mėginiai didžiausias heksanalio smailės plotas fiksuojamas po 20 min. Analizuojant 5 g mėginį pusiausvyra nenusistovi net per 30 min. Tiriant 3 ir 5 g mėginius gaunami heksanalio smailių plotai yra gana artimi, todėl tolimesniems tyrimams nuspręsta pasirinkti 3 g mėginį, o kaitinimo trukmė pasirinkta 22 min.

Dujų fazės įleidimo trukmė. Dar vienas iš optimizuojamų parametru – dujų fazės įleidimo į chromatografą trukmė. VDChA prietaise naudojama slėgiu reguliuojama mėginio įvedimo sistema. Ši sistema leidžia pasirinkti, kiek laiko dujos iš viršerdvės indelio tekės į dujų chromatografą. Kuo ilgiau teka mėginys, tuo didesnis analitės kiekis patenka į chromatografą ir tuo mažesnę aptikimo ribą galima pasiekti. Antra vertus, padidėjus įleidžiamos dujų fazės tūriui, smailės gali išplisti ir pasidaryti asimetriškos.

Tyrimui pasirinkta įleidimo trukmė nuo 0,01 iki 0,2 min. Naudojama heksanalio koncentracija kokosų aliejuje 0,1 g/kg.



3.14 pav. Įleidimo trukmės įtaka heksanalio smailės plotui (A), aukščiui (h) ir teorinių lėkštelių aukščiui (H).

Iš gautų rezultatų (žr. 3.14 pav.) matyti, kad esant nedidelei mėginio įleidimo trukmei, smailės plotas ir aukštis proporcingai didėja didinant įleidimo trukmę, o efektyvumas pradeda mažėti, kai viršijama 0,1 min. mėginio įleidimo trukmė. Smailės ploto koreliacijos koeficientas iki 0,09 min. yra gaunamas didesnis už 0,99. Tuo tarpu smailės aukščio tiesiškumas yra mažesnis, kai įleidimo trukmė 0,08 min., koreliacijos koeficiento vertė tampa mažesnė už 0,99 (0,9859). Norint gauti kuo didesnius smailės plotus neprarandant efektyvumo, pasirinkta 0,07 min. įleidimo trukmė.

Metodo analizinės charakteristikos. Optimizuotomis viršerdvės dujų chromatografijos sąlygomis (kaitinimo temperatūra 110 °C, mėginio kiekis –

3 g, kaitinimo trukmė 22 min., įleidimo trukmė 0,07 min.) nustatytos paruoštos heksanalio nustatymo metodikos analizinės charakteristikos. Jos pateiktos 3.6 lentelėje.

3.6 lentelė. Heksanalio viršerdvės dujų chromatografinio nustatymo metodikos analizinės charakteristikos.

Charakteristika	Vertė (kokosų aliejuje)
Aptikimo riba, µg/kg	30
Nustatymo riba, µg/kg	100
Tiesiškumas iki, g/kg	2
R^2	0,9977
s_r , % (n = 5, c = 10 mg/kg)	1,1

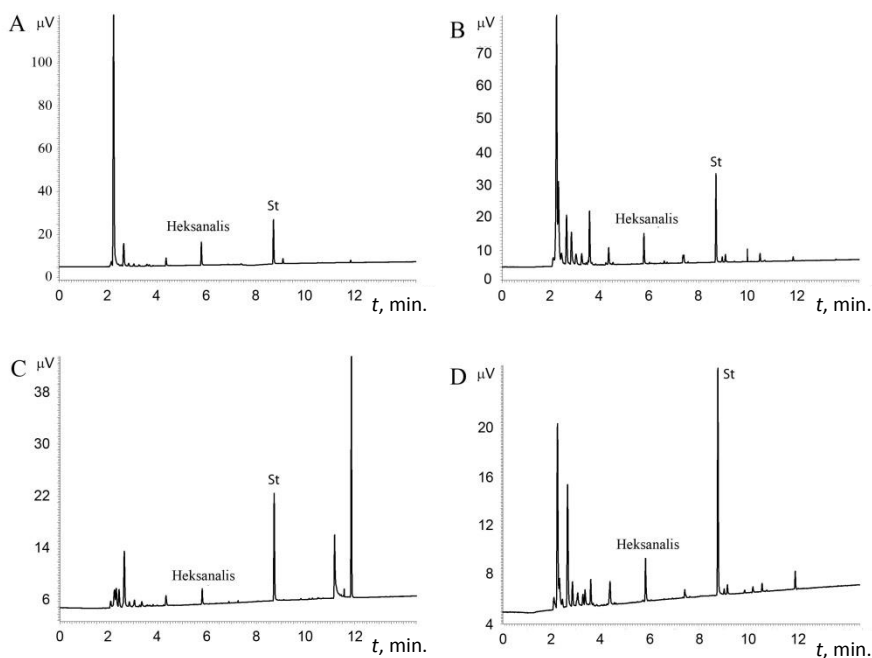
Kalibracinė kreivė buvo sudaroma analizuojant 8 heksanalio tirpalus kokosų aliejuje atliekant po tris pakartojimus. Gautas tiesinis intervalas nuo 100 µg/kg iki 2 g/kg. Koreliacijos koeficientas – 0,9977. Rezultatų pasikartojamumas labai geras, santykinis standartinis nuokrypis neviršija 1,1 %, kai naudojama tirpalo koncentracija 10 mg/kg, o matavimai atlikti pakartojant po penkis kartus.

Heksanalio nustatymas realiuose mėginiuose. Sukurta heksanalio nustatymo viršerdvės dujų chromatografinė metodika pritaikyta heksanalio nustatymui augaliniuose aliejuose. Tyrimui pasirinkti keturi dažnai Lietuvoje maistui naudojami augaliniai aliejai: alyvuogių, rapsų, saulėgrąžų ir linų sėmenų.

Buvo tirti nekaitinti ir kaitinti aliejai. Tam analizei imta po 3 g aliejaus, kaitinta 180 ir 200 °C temperatūroje. Tyrimo metu gauti rezultatai pateikiami 3.7 lentelėje ir 3.15 pav.

3.7 lentelė. Heksanalio kiekis (mg/kg) nekaitintame ir kaitintame saulėgrąžų, alyvuogių, linų sėmenų ir rapsų aliejuose.

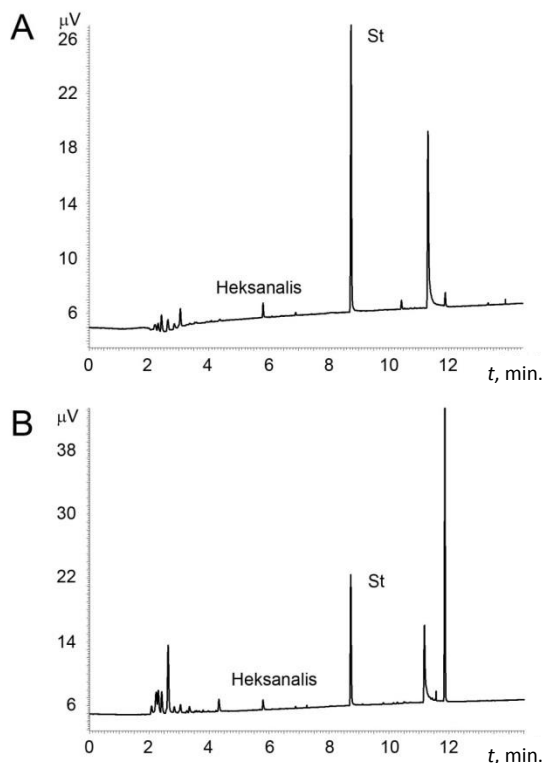
Aliejus	Nekaitintas	180 °C, 10 min.	200 °C, 10 min.	200 °C, 30 min.
Saulėgrąžų	3,3	20,6	31,2	36,1
Alyvuogių	3,1	7,3	26,1	26,9
Linų sėmenų	2,6	10,5	15,8	16,2
Rapsų	2,5	7,7	10,7	11,8



3.15 pav. Saulėgražų (A), alyvuogių (B), linų sėmenų (C) ir rapšų (D) aliejų chromatogramos gautos kaitinant 200 °C temperatūroje 10 min. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5. skyriuje.

Kaip matyti iš pateiktų rezultatų (žr. 3.7 lentelę) heksanalis yra aptinkamas visuose aliejuose, tiek nekaitintuose, tiek kaitintuose. Didinant kaitinimo temperatūrą ir kaitinimo trukmę, heksanolio kiekis didėja visuose tiriamuose aliejuose. Didžiausias heksanolio kiekis aptinkamas kaitintame saulėgražų aliejuje (200 °C temperatūroje kaitinant 30 min. aptinkama 36,1 mg/kg). Kituose aliejuose aptinkamas mažesnis heksanolio kiekis (pvz. rapšų aliejuje 11,8 mg/kg). Gauti rezultatai leidžia daryti išvadą, kad saulėgražų aliejus kepimui nėra tinkamiausias. Geriausia jį naudoti nekaitintą, o kepimui pasirinkti kitą augalinį aliejų, pvz. rapšų.

Įdomu tai, kad kaitintame linų sėmenų aliejuje heksanolio rasta gana mažai (15,8 ir 16,2 mg/kg kaitinant 200 °C temperatūroje atitinkamai 10 ir 30 min.), nors literatūroje rašoma, kad sėmenų aliejus kaitinamas greitai skyla [172, 180], todėl labiausiai tinka gardinti šaltus arba jau pagamintus patiekalus ir nėra tinkamas kaitinti ar kepti. Mažą heksanolio kiekį galima paaiškinti tuo, kad sėmenų aliejuje heksanolio pirmtako linolo rūgšties yra nedaug. Antra vertus, kaitinto sėmenų aliejaus chromatogramoje ties 11,9 min. matosi didelė papildoma smailė (žr. 3.16 pav.). Tai gali būti α -linoleno rūgšties skilimo produktas nonanalis [181] arba 2,4-nonadienalis [182].



3.16 pav. Nekaitinto (A) ir kaitinto 200 °C 10 min. (B) linų sėmenų aliejaus viršerdvės dujų chromatogramos. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5. skyriuje.

α -linoleno rūgštis linų sėmenų aliejuje sudaro 48 – 60 % esančių riebalų rūgščių. Saulėgrąžų aliejuje α -linoleno rūgštis neaptinkama, alyvuogių aliejuje jos yra mažiau nei 1 %, o rapsų aliejuje aptinkama apie 7 % [183, 184]. Pastebėta, kad α -linoleno rūgštis yra labiau linkusi oksiduotis nei linolo rūgštis, todėl linų sėmenų aliejus greičiau praranda savo maistines savybes.

3.2.2. Heksanolio nustatymas riebalingame maiste

Nustatyti heksanalį kietoje matricoje (riebalingame maiste) sudėtingiau, nei skystame aliejuje, kadangi heksanalį pirmiausiai reikia pervesti iš kietos matricos į tirpiklį, o po to į dujinę fazę.

Atliekant heksanolio nustatymą kietose matricose VDChA metodu, matricai disperguoti ir kalibravimo tirpalams paruošti paprastai naudojamas vanduo [185-188].

Siekiant paskatinti lakiosios analitės perėjimą į viršerdvę, mėginys turi būti kaitinamas. Tačiau kaitinimo temperatūra negali viršyti tirpiklio virimo

temperatūros, kitu atveju garų slėgis tampa per didelis, gali atsirasti dujinės fazės nuotėkis arba buteliukas gali sprogti. Be to, kai tirpiklis lakus, didelis jo garų kiekis patenka į viršerdvę. Dėl to heksanalio pusiausvyra pastumiama iš dujinės fazės į tirpalą ir jo koncentracija viršerdvėje mažėja. Dar vienas vandens kaip ekstrahento trūkumas – heksanalis vandenyje prastai tirpsta.

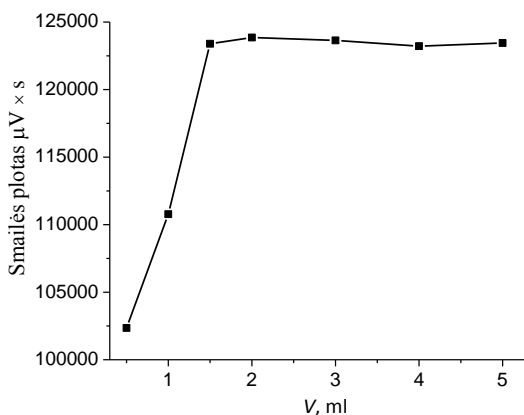
Vandens pakeitimas mažiau lakiu ir gerai heksanalį tirpinančiu tirpikliu turėtų leisti padidinti mėginio kaitinimo temperatūrą, padidinti heksanalio koncentraciją dujinėje fazėje ir taip gauti žemesnes analitės aptikimo ribas.

Šiame darbe pasiūlyta vandenį pakeisti n-tetradekanu. n-tetradekanas yra mažiau lakus nei vanduo (virimo temperatūra yra 253 °C), todėl net taikant aukštesnę pusiausvyros nusistovėjimo temperatūrą n-tetradekano koncentracija dujinėje fazėje yra nedidelė. Be to, hidrofobinis n-tetradekanas turėtų lengvai prasiskverbti į riebalingą matricą ir veiksmingai išekstrahuoti heksanalį.

Kaip buvo parodyta 3.2.1 skyriuje, kuo didesnė viršerdvės indelio kaitinimo temperatūra, tuo daugiau heksanalio pereina į dujinę fazę. Deja, aukštesnėje nei 110 °C temperatūroje riebalingame maiste esanti nesoti linolo rūgštis ima skilti, susidaro antrinis oksidacijos produktas heksanalis. Dėl to mėginyje būtų nustatomi padidinti heksanalio kiekiai. Dėl šios priežasties tolimesniam darbui buvo pasirinkta 110 °C pusiausvyros nusistovėjimo temperatūra.

Tirpiklio kiekio parinkimas. Tirpikliu ekstrakcijai ir kalibraciniams tirpalams pasirinkus n-tetradekaną, toliau svarbu nustatyti reikiamą jo kiekį. Tirpiklio kiekis turi įtakos analitės kiekiui viršerdvėje. Tikėtina, kad didesnis tirpiklio kiekis pagerina ekstrakcijos efektyvumą iš riebalingos kietos matricos, tačiau pusiausvyrai pasiekti gali būti reikalingas ilgesnis laikas. Pasirinkta, kad pusiausvyros laikas neturėtų viršyti 30 min.

Optimizuojant tirpiklio kiekį, į viršerdvės dujų chromatografijos indelį įpilama nuo 0,5 ml iki 5 ml 0,1 g/l heksanalio tirpalo n-tetradekane. Indelis su tirpalu termostatuojamas 30 min. 110 °C temperatūroje. Gauti rezultatai pateikiami 3.17 pav.

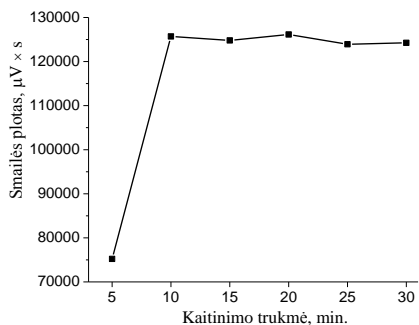


3.17 pav. Heksanalio smailių plotų priklausomybė nuo heksanalio tirpalo n-tetradekane tūrio.

Kaip matyti iš 3.17 pav., kai mėginio kiekis didėja nuo 0,5 iki 1,5 ml, heksanalio smailės plotas didėja, o toliau didinant mėginio kiekį smailės plotas nebekinta. Tai galėtų būti paaiškinama dideliu heksanalio tirpumu n-tetradekane. Yra žinoma, kad junginio koncentracija viršerdvėje yra proporcinga jo pradinei koncentracijai mėginyje ir atvirkščiai proporcinga pasiskirstymo koeficientui K tarp skystosios fazės ir dujinės fazės bei dujinės ir skystos fazių santykiui β [18]. Jei K yra mažas (junginys teikia pirmenybę dujinei fazei), tada β vertė (taigi ir mėginio tūris) daro didelę įtaką analitės koncentracijai dujinėje fazėje. Atvirkščiai, junginio su dideliu pasiskirstymo koeficientu atveju mėginio kiekio kitimas mažai įtakoja analitės koncentraciją viršerdvėje. Heksanalis gerai tirpsta n-tetradekane, taigi ir jo pasiskirstymo koeficientas tarp n-tetradekano fazės ir dujų fazės yra didelis, o n-tetradekano kiekio įtaka heksanalio koncentracijai viršerdvėje nedidelė.

Tolimesniems tyrimams pasirinktas n-tetradekano kiekis – 2 ml.

Kaitinimo trukmės parinkimas. Parinkus kaitinimo temperatūrą, tirpiklį ir jo kiekį, toliau svarbu nustatyti kaitinimo trukmę. Analizuota kaitinimo trukmė nuo 5 min. iki 30 min. kaitinant nustatytoje 110 °C temperatūroje. Tyrimui naudota 2 ml 0,1 g/l heksanalio tirpalas n-tetradekane. Gauti rezultatai pateikiami 3.18 pav.



3.18 pav. Heksanolio smailės ploto priklausomybė nuo kaitinimo trukmės. Kaitinimo temperatūra 110 °C.

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad iki 10 min. heksanolio smailės plotas didėja ir pasiekia maksimumą, o po to išlieka pastovus. Tolimesniems tyrimams pasirinkta 12 min. kaitinimo trukmė.

Mėginio įleidimo trukmė pasirinkta remiantis tyrimais, aprašytais 3.2.1 skyriuje ir yra 0,07 min.

Siekiant geresnio rezultatų pasikartojamumo, į tiriamąjį mėginį buvo dedamas vidinis standartas. Vidiniu standartu naudojama medžiaga turi būti pilnai atskiriama nuo visų mėginio komponentų, neturi reaguoti su kitais mėginio komponentais ir jos neturi būti tiriamajame mėginyje, be to pageidautina, kad jos sulaikymo trukmė turi būti artima heksanolio sulaikymo trukmei. Atsižvelgiant į šiuos reikalavimus, vidiniu standartu pasirinktas benzaldehidas. Naudojama benzaldehido koncentracija n-tetradekano tirpaluose – 0,1 g/l. Šie tirpalai buvo naudojami mėginių ekstrakcijai bei kalibracinių tirpalų ruošimui.

Metodo analizinės charakteristikos. Optimizuotomis viršerdvės dujų chromatografijos sąlygomis (kaitinimo temperatūra 110 °C, n-tetradekano tirpalo tūris 2 ml, kaitinimo trukmė 12 min., įleidimo trukmė 0,07 min.) nustatytos paruoštos heksanolio nustatymo metodikos analizinės charakteristikos. Jos pateiktos 3.8 lentelėje.

Kalibracinė kreivė buvo sudaroma analizuojant 8 heksanolio tirpalus n-tetradekane atliekant po tris pakartojimus. Gautas tiesinis intervalas nuo 50 $\mu g/l$ iki 2 g/l. Koreliacijos koeficientas – 0,9994. Rezultatų pasikartojamumas labai geras, santykinis standartinis nuokrypis neviršija 1,2 %, kai naudojama tirpalo koncentracija 1 g/l, matavimai atlikti pakartojant po penkis kartus.

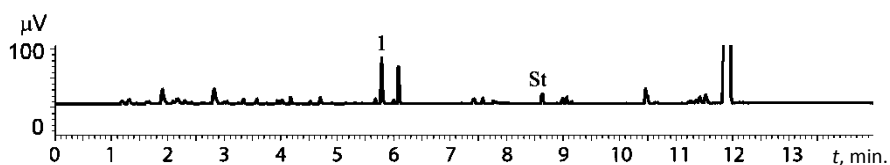
3.8 lentelė. Heksanolio viršerdvės dujų chromatografinio nustatymo metodikos analizinės charakteristikos.

Charakteristika	Vertė (n-tetradekane)
Aptikimo riba, $\mu\text{g/l}$	15
Nustatymo riba, $\mu\text{g/l}$	50
Tiesiškumas iki, g/l	2
R^2	0,9994
$s_r, \% (n = 5, c = 1 \text{ g/l})$	1,2

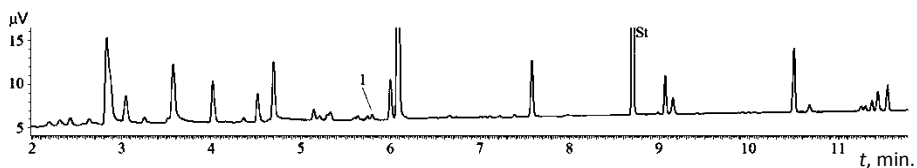
Heksanolio nustatymas realiuose mėginiuose. Paruošta metodika pritaikyta heksanoliui nustatyti paprikų ir aitriųjų pipirų skonio bulvių traškučiuose „Estrella“ ir keptose bulvėse.

A. S. Silva ir bendraautorių darbe [189] yra pateikiama, kad bulvių traškučiuose heksanolio ir kitų aldehydų kiekiai didėja juos laikant. Tai vyksta dėl lipidų oksidacijos procesų. Didėjant heksanolio kiekiui atsiranda specifinis bulvių traškučių kvapas. N. Kim ir bendraautorių darbe [190] atliktas tyrimas, kurio metu stebima bulvių traškučių cheminė sudėtis, kai skrudinimui naudojami skirtingi aliejai pakartotinai. Pastebėta, kad bulvių traškučiuose, kurių skrudinimui pakartotinai naudojamas rafinuotas kokosų aliejus, susidaro mažiausiai oksidacijos produktų.

Tiriamo riebalingo maisto analizė buvo atliekama į 20 ml viršerdvės analizės indelį pridedant po 1 g gerai sutrinto mėginio, užpilant 2 ml n-tetradekano su vidiniu standartu benzaldehidu (0,1 g/l). Indelis sandariai uždaromas, 10 min. veikiamas ultragarsu ir atliekama viršerdvės dujų chromatografinė analizė. Gauti rezultatai pateikti 3.19 ir 3.20 pav.



3.19 pav. Keptų bulvių chromatograma. 1 – heksanalis, St - benzaldehidas.
Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5 skyriuje.



3.20 pav. Bulvių traškučių chromatograma. 1 – heksanalis, St - benzaldehidas.
Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5 skyriuje.

Kaip matyti iš pateiktų chromatogramų, heksanalis aptinkamas tiek bulvių traškučiuose, tiek keptose bulvėse. Kiekybiniam heksanolio įvertinimui naudotas standartinių priedų metodas. Nustatyta, kad heksanolio koncentracija bulvėse yra 280 mg/kg ($s_r = 4,2 \%$, $n = 3$), o bulvių traškučiuose – 1,2 mg/kg ($s_r = 3,8 \%$, $n = 3$). Nustatytas heksanolio kiekis bulvių traškučiuose yra panašus kaip ir kituose tyrimuose [185]. Ypač didelė heksanolio koncentracija keptose bulvėse leidžia daryti prielaidą, kad aliejus, kuriame kepinamos bulvės, retai keičiamas.

3.2.3. Heksanolio nustatymas panaudojant mikrobangas ir GET

Nežiūrint viršerdvės dujų chromatografijos tirpikliams pageidaujamos aukštos virimo temperatūros, heksanolio ekstrakcijai iš riebalingo maisto naudojamas n-tetradekanas nėra tradicinis tirpiklis, todėl yra gana brangus, be to, nėra draugiškas aplinkai.

Tolimesnio darbo tikslas buvo patobulinti heksanolio nustatymo riebalingame maiste metodiką n-tetradekaną pakeičiant kitu, draugiškesniu aplinkai ir dar mažiau lakiu tirpikliu, panaudojant efektyvesnę ekstrakcijos metodą – ekstrakciją mikrobangomis bei apjungiant šią ekstrakcijos metodą su VDChA.

Mikrobangos, sąveikaudamos su poliniais junginiais, iš karto įkaitina visą mėginio tūrį, bet nešildo paties indo, todėl ekstrahuojamas mišinys įkaista labai greitai, ekstrakcijos trukmė siekia vos iki 5 – 30 min., o ekstrakcijos efektyvumas yra artimas arba net geresnis nei Soksleto ekstrakcijos. Kadangi ekstrakcija atliekama hermetiškame inde, lakios analitės nepametamos. Vis dėlto, analičių ekstrakto negalima tiesiogiai analizuoti dujų chromatografijos metodu, nes ekstrahuojant iš sudėtingų matricių, išekstrahuojama daugybė junginių, dėl to tikėtina, kad analičių smailės chromatogramoje persiklotų su trukdančių junginių smailėmis, į chromatografinę sistemą patektų išekstrahuoti nelakūs junginiai jų užterštų.

Nustatant lakias analites (šiuo atveju heksanali) analizę galima labai supaprastinti skysto ekstrakto dujų chromatografinę analizę pakeitus viršerdvės dujų chromatografinę analizę, kai į dujų chromatografą patenka tik lakioji mėginio dalis. Labai pageidautina, kad ekstrakcijai naudojamas tirpiklis būtų nelakus – tada į chromatografinę sistemą nepatenka tirpiklio garų.

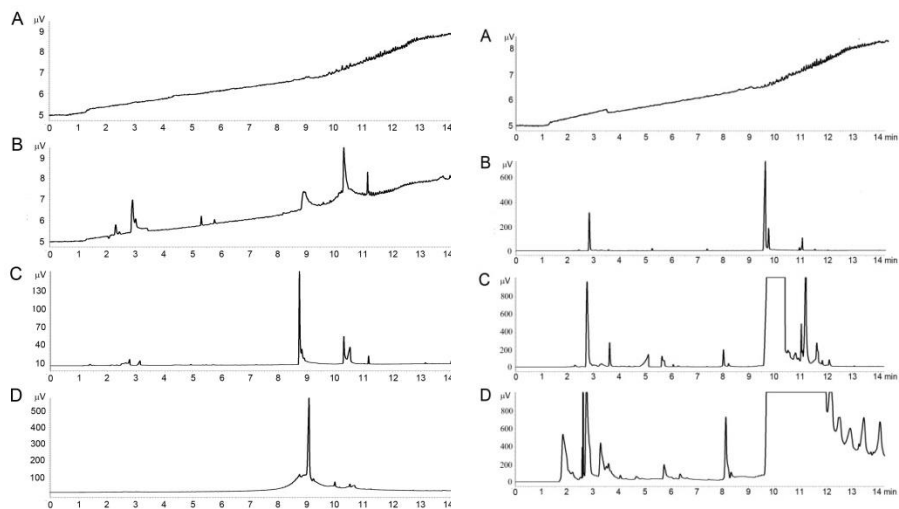
Gilūs eutektiniai tirpikliai atitinka tiek ekstrakcijai panaudojant mikrobangas, tiek viršerdvės dujų chromatografijai keliamus reikalavimus – yra poliniai, todėl gali efektyviai sugerti mikrobangų energiją, jų garų slėgis

yra mažas, pageidaujamas viršerdvės dujų chromatografinėi analizei. Be to, šie tirpikliai yra pigūs, lengviau gaminami, draugiški aplinkai.

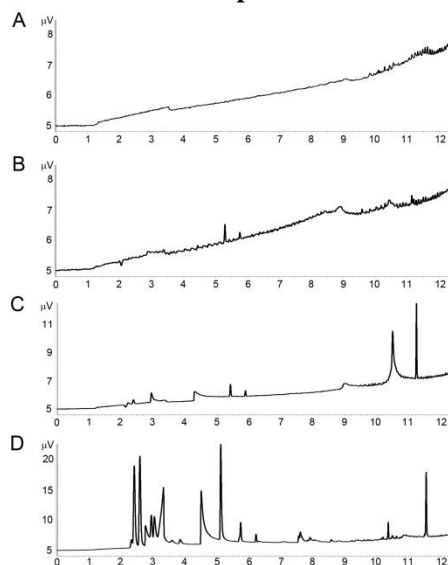
Gilių eutektinių tirpiklių gaminimas ir tyrimas. Buvo susintetinti aštuoni gilūs eutektiniai tirpikliai: penki hidrofiliniai (ChCl-Gly, ChCl-Glu-H₂O, ChCl-oksalo r., ChCl-šlapalas, ChCl-Eg) ir trys hidrofobiniai (mentolis-oktano r., TBAHS-oktano r., TBAHS-oktanolis). Tirpikliai buvo gaunami sumaišius komponentus reikiama moliniais santykiais, pateiktais 2.2 skyriuje ir kaitinant mikrobangomis. Mikrobangų panaudojimas leido sutrumpinti sintezės trukmę nuo kelių valandų iki 30 sekundžių.

Vienas GET (ChCl-Glu-H₂O) buvo sudarytas iš trijų komponentų. Papildomai buvo naudojamas vanduo, kuris sudarė 30 %. Šis komponentas buvo įvestas, kadangi bevandenis ChCl-Glu tirpiklis kambario temperatūroje buvo labai klampus ir linkęs greitai sukietėti, o tai apsunkina darbą. Bevandenio ChCl-Glu tirpiklio didelis klampumas aiškinamas vandenilinio ryšio sąveika tarp komponentų. Papildomai pridėdant vandens, ši sąveika mažėja ir tirpiklis tampa mažiau klampus [191]. Darbe [192] yra pateikiama, kad į cholino chlorido-gliukozės tirpalą pridėdant daugiau nei 25 % vandens, jo klampa sumažėja nuo 397 iki 7,2 mm² s⁻¹, o tirpiklis vis dar pasižymi gilių eutektinių tirpiklių savybėmis (jei vandens nėra daugiau nei 50 %). Be to, didinant vandens kiekį, tirpalo laidumas didėja, o tai leidžia pagreitinti ekstrakciją mikrobangomis [193].

Naudojant tirpiklius viršerdvės dujų chromatografijoje svarbu, kad kaitinant aukštoje temperatūroje, tirpikliai neskiltų ir juose nebūtų lakių priemaišų, kurios išgaravusios ir patekusios į chromatografinę kolonėlę, duotų smailes, galinčias persikloti su analičių smailėmis. Todėl toliau buvo ištirta eutektinių tirpiklių elgsena kaitinant viršerdvės dujų chromatografijos sąlygomis ir esant skirtingoms temperatūroms. Tam į viršerdvės indelius imta po 0,5 g eutektinių tirpiklių ir kaitinta po 20 min. 80 – 200 °C temperatūroje. Visi aštuoni tirti gilūs eutektiniai tirpikliai esant 80 °C temperatūrai buvo stabilūs, dujinės fazės chromatogramose nebuvo aptinkama smailių (žr. 3.21 pav.).

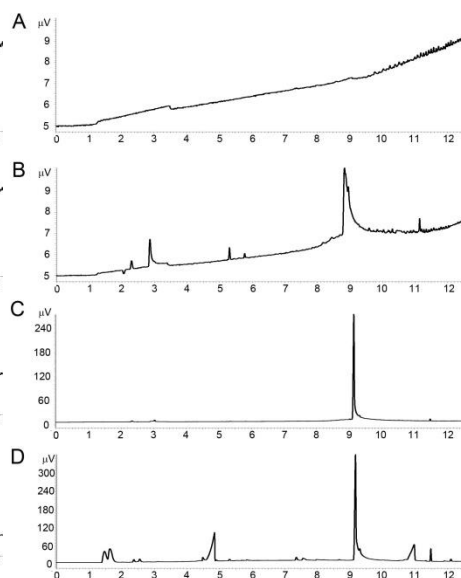


ChCl-šlapalas



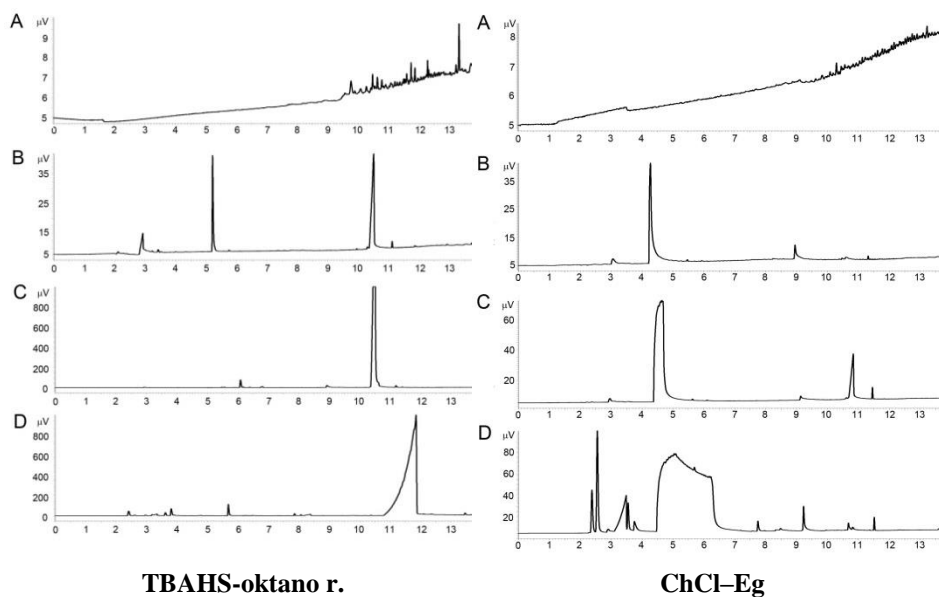
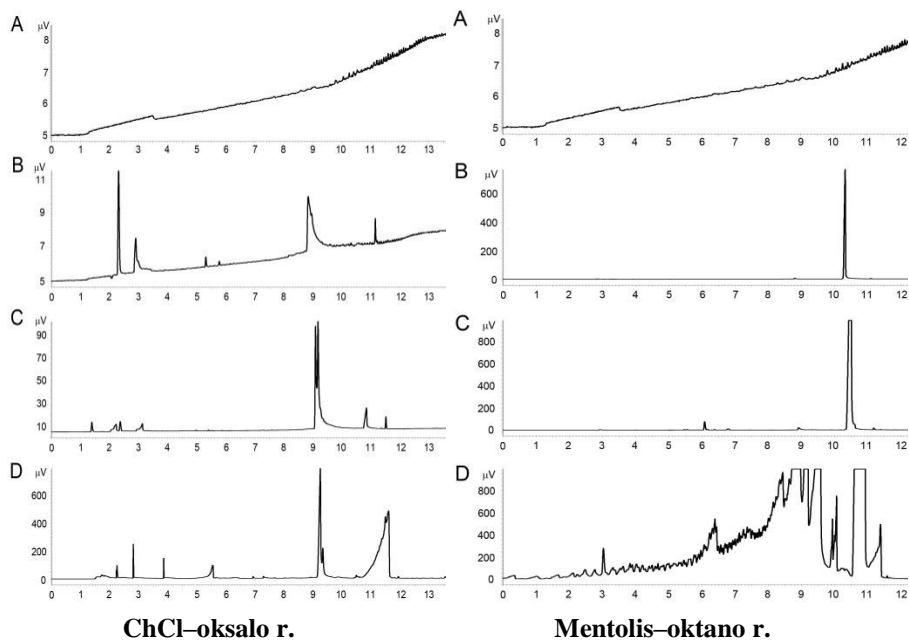
ChCl-Gly

TBAHS-oktanolis



ChCl-gliukozė-H₂O

3.21 pav. Gilių eutektinių tirpiklių viršerdvės dujų chromatogramos kaitinant 80 (A), 100 (B), 140 (C) ir 200 (D) °C temperatūroje. Termostatavimo temperatūra 110 °C, termostatavimo trukmė 20 min., įleidimo trukmė 0,05 min. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5 skyriuje.

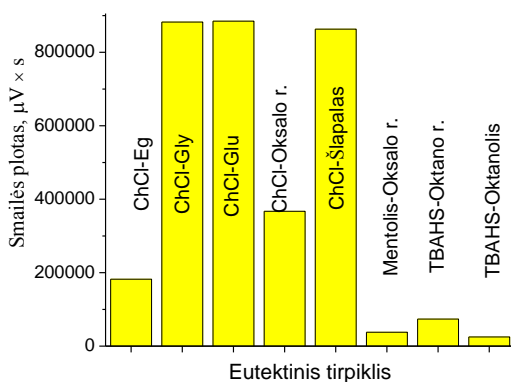


3.21 pav. tęsinys. Gilių eutektinių tirpiklių viršerdvės dujų chromatogramos kaitinant 80 (A), 100 (B), 140 (C) ir 200 (D) °C temperatūroje. Termostatavimo temperatūra 110 °C, termostatavimo trukmė 20 min., įleidimo trukmė 0,05 min. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5 skyriuje.

Kaitinant 100 °C temperatūroje smalių neatsiranda ChCl-Gly chromatogramoje. ChCl-šlapalo, ChCl-gliukozės-vandens ir ChCl-oksalo

rūgštis viršerdvių chromatogramose yra keletas labai mažo intensyvumo smailių. Likusių gilių eutektinių tirpiklių viršerdvės chromatogramose smailės intensyvesnės. Tačiau nė vieno tirtu eutektinio tirpiklio chromatogramoje nėra priemaišų, kurių sulaikymo trukmė sutaptų su heksanalio sulaikymo trukme (5,77 min.). Toliau keliant eutektinių tirpiklių kaitinimo temperatūrą, visų jų chromatogramose smailių intensyvumas didėja. Kadangi 80 °C temperatūroje nė vieno iš tirtų gilių eutektinių tirpiklių viršerdvės chromatogramose neatsiranda smailių, tai ši temperatūra taikyta atliekant tolimesnius tyrimus.

Heksanalio perėjimas iš GET į dujinę fazę. tirta kaip dominanti analitė – heksanalis, iš šių GET pereina į viršerdvę. Tam į viršerdvės analizės indelį dėta 5 µl 100 mg/ml heksanalio tirpalo n-tetradekane ir 0,5 g GET. Indelis kaitintas 80 °C temperatūroje 20 min. Gauti rezultatai pateikiami 3.22 pav.



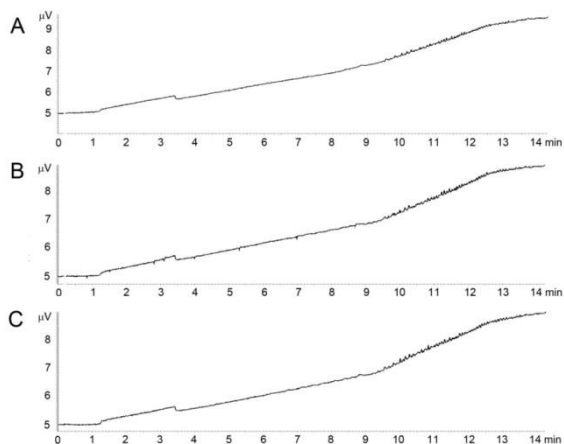
3.22 pav. Heksanalio smailių plotų priklausomybė nuo naudojamo GET.

Didžiausios heksanalio smailės gautos naudojant hidrofilinius eutektinius tirpiklius. Tai galima paaiškinti tuo, kad hidrofobinis heksanalis ($\log P = 1,78$) geriau tirpsta hidrofobiniuose tirpikliuose, todėl sunkiau pereina į viršerdvę ir dujinėje fazėje jų koncentracija mažesnė.

Tolimesniam darbui pasirinkti trys tirpikliai, iš kurių heksanalis geriausiai pereina į viršerdvę, t. y. ChCl-Gly, ChCl-Glu-H₂O ir ChCl-šlapalas.

Heksanalio ekstrakcija panaudojant mikrobangas. Tirta, ar mikrobangos nedaro papildomo poveikio tirpiklių skilimui. Tam 1 g eutektinio tirpiklio 5 min. kaitinta mikrobangomis 80 °C temperatūroje. Po to mikrobangų ekstrakcijos indas atšaldomas ir 0,5 g tirpiklio perkeliama į viršerdvės ekstrakcijos indelį bei atliekama viršerdvės dujų chromatografija

kaitinant indelį 80 °C temperatūroje 20 min. Nė vieno iš tirtų tirpiklių viršerdvės chromatogramoje smailių neaptikta (žr. 3.23 pav.).



3.23 pav. GET viršerdvės dujų chromatogramos po poveikio mikrobangomis: ChCl-Gly (A), mentolio-oktano rūgšties (B) ir TBAHS-oktanolio (C). Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5 skyriuje.

Heksanolio ekstrakcija panaudojant ChCl-Gly, ChCl-gliukozė-H₂O ir ChCl-šlapalą. Neaptikus gilių eutektinių tirpiklių skilimo po poveikio mikrobangomis, toliau tirta, kaip pasirinkti trys GET ekstrahuoja heksanalį iš bulvių traškučių, ekstrakcijai naudojant mikrobangas. Ekstrakcijai imta 0,2 g bulvių traškučių (iš kurių buvo pašalintas heksanalis), pridėta 5 µl 100 mg/ml heksanolio tirpalo n-tetradekane, leista sorbuotis 24 val. ir ekstrahuota pasirinktais tirpikliais (jų dėta po 1 g) panaudojant mikrobangas 80 °C temperatūroje 5 min. Po ekstrakcijos mišinys ataušinamas, 0,5 g mišinio perkeliama į viršerdvės analizės indelį ir atliekama viršerdvės dujų chromatografinė analizė. Palyginimui buvo atliekama viršerdvės dujų chromatografinė analizė į viršerdvės indelį pridėjus 2,5 µl 100 mg/ml heksanolio tirpalo n-tetradekane ir 0,5 g eutektinio tirpiklio.

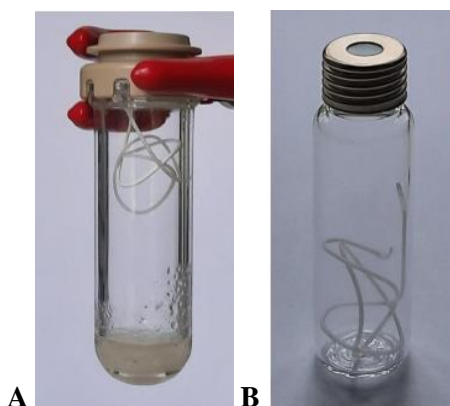
Po ekstrakcijos iš bulvių traškučių mikrobangomis gauti heksanolio smailių plotai buvo 20 – 50 kartų mažesni nei atliekant tirpalų VDChA. Tai, greičiausiai gali įvykti dėl kelių priežasčių:

- ekstrakcijos mišiniui auštant ekstrakcijos mikrobangomis indelyje, heksanalis iš dujinės fazės dalinai pereina į tirpalą, kuris tampa gana hidrofobinis dėl bulvių traškučiuose esančių riebalų;

- lakus heksanalio netenkama po ekstrakcijos mikrobangomis susidariusį mišinį perkeliant į viršerdvės indelį.

Šioms problemoms spręsti panaudotas papildomas tirpiklis – kokosų aliejus. Kad tirpiklis nesimaišytų su ekstrakcijai naudojamu giliu eutektiniu tirpikliu, naudojamas polipropileno kapiliaras, kuris užpildomas 100 μ l kokosų aliejaus.

Kokoso aliejumi užpildytas polipropileno kapiliaras įtvirtinamas ekstrakcijos mikrobangomis inde virš mėginio, užpilto giliu eutektiniu tirpikliu (žr. 3.24 pav. A).

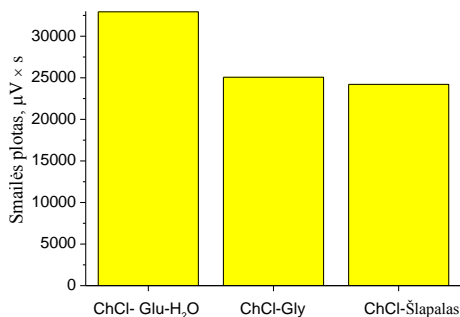


3.24 pav. Polipropileno kapiliaras užpildytas kokosų aliejumi mikrobangų ekstrakcijos indelyje (A) ir viršerdvės ekstrakcijos indelyje (B).

Paveikus mikrobangomis, polinis eutektinis tirpiklis su mėginiu įkaista, lakus heksanalis išekstrahuojamas ir pereina į dujinę fazę. Polipropileno kapiliaras porėtas, todėl dujinėje fazėje esantis heksanalis patenka į kapiliaro vidų ir tirpsta kapiliare esančiame kokosų aliejuje. Po ekstrakcijos indas atšaldomas. Dėl to heksanalio koncentracija dujinėje fazėje mažėja, o hidrofobiniame kokosų aliejuje didėja. Kapiliaras su sustingusiu ekstraktu perkeliamas į viršerdvės dujų chromatografinį indelį (žr. 3.25 pav. B) ir atliekama viršerdvės dujų chromatografinė analizė.

Preliminarūs tyrimai buvo atlikti su ChCl-Gly, ChCl-gliukozė-H₂O ir ChCl-šlapalas. Į mikrobangų ekstrakcijos indą imta 0,2 g bulvių traškučių, pridėta 5 μ l 100 mg/ml heksanalio tirpalo n-tetradekane, leista sorbuotis 24 val., pridėtas 1 g eutektinio tirpiklio, indo viršuje įtvirtinamas kokoso aliejumi užpildytas polipropileno kapiliaras ir atliekama ekstrakcija 5 min. 80 °C temperatūroje. Po ekstrakcijos indas atšaldomas, kapiliaras

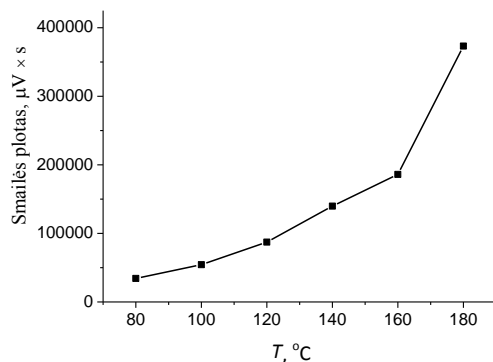
perkeliamas į viršerdvės analizės indelį ir atliekama viršerdvės dujų chromatografinė analizė kaitinant indelį 80 °C temperatūroje 20 min.



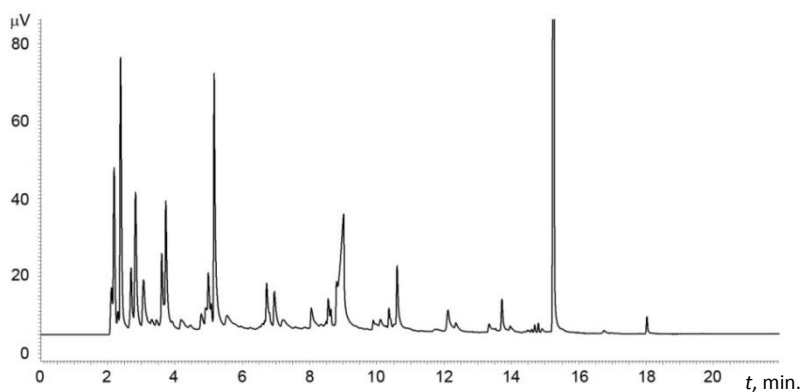
3.26 pav. Heksanalio smailių plotų priklausomybė nuo naudojamo GET ekstrakcijai panaudojant mikrobangas.

Analizės rezultatai parodė (žr. 3.26 pav.), kad didžiausias heksanalio smailės plotas gautas naudojant ChCl-Glu-H₂O tirpiklį. Šis eutektinis tirpiklis pasirinktas tolimesniems tyrimams.

Viršerdvės dujų chromatografijos sąlygų optimizavimas. Ekstrakcijos mikrobangomis metu iš mėginio į viršerdvę, o iš jos ir į kokosų aliejų nepereina riebalai. Tokiu atveju nėra pavojaus, kad atliekant viršerdvės dujų chromatografinę analizę aukštesnėje nei 80 °C temperatūroje, papildomai susidarys riebalų oksidacijos produktas – heksanalis. Naudojama didesnė viršerdvės indelio kaitinimo temperatūra turėtų palengvinti heksanalio perėjimą į dujinę fazę ir tuo būdu pagerinti nustatymo jautrį, todėl ištirta viršerdvės indelio kaitinimo temperatūros įtaka kapiliare sorbuoto heksanalio smailės plotui. Tam 100 μl 1 mg/g heksanalio tirpalu kokoso aliejuje užpildytas polipropileno kapiliaras įdedamas į viršerdvės analizės indelį ir atliekama viršerdvės dujų chromatografinė analizė 20 min. kaitinant indelį 80 – 180 °C temperatūroje. Iš 3.27 pav. matyti, kad kylant temperatūrai heksanalio smailės plotas didėja. Pastebėta, kad pasiekus 160 °C temperatūrą polipropileno kapiliaras išsilydė, o chromatogramoje atsirando daug pašalinių smailių (žr. 3.28 pav). Kai kurios iš smailių persikloja su heksanalio smaile, todėl pasirinkta 140 °C viršerdvės dujų analizės temperatūra.



3.27 pav. Polipropileno kapiliare užpildyto kokosų aliejumi esančio heksanalio smailės ploto priklausomybė nuo temperatūros.



3.28 pav. 160 °C temperatūroje kaitinto polipropileno kapiliaro viršerdvės dujų chromatograma. Chromatografinės sąlygos pateiktos 2.5 skyriuje.

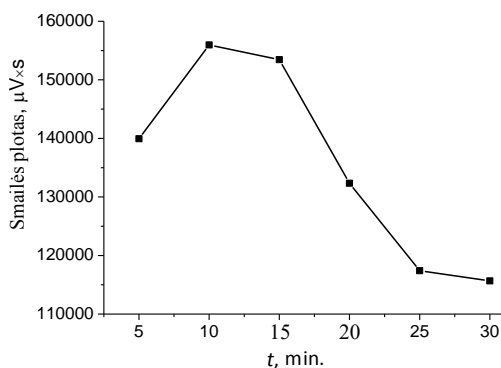
Taip pat nustatyta optimali kaitinimo trukmė – 10 min. Ši kaitinimo trukmė pakankama, kadangi kaitinant virš 7 min. heksanalio smailių plotai tampa pastovūs.

Ekstrakcijos mikrobangomis sąlygų optimizavimas. Heksanalio ekstrakcijai naudojant mikrobangas, būtina parinkti reikiamą tirpiklio kiekį. Naudojamas tirpiklis turi pilnai apsemti mėginį, tačiau jo negali būti per daug, kadangi tokiu atveju gali būti gaunama mažesnė heksanalio koncentracija viršerdvėje. Literatūroje nurodoma, kad ekstrakcijai naudojant mikrobangas tirpiklio ir mėginio santykis paprastai yra nuo 10:1 (ml/mg) iki 20:1 (ml/mg) [194]. Remiantis šiais duomenimis ir siekiant įvertinti ekstrakcijos efektyvumą, ant 0,2 g bulvių traškučių buvo užšvirškčiama 5 μL

100 mg/ml heksanolio tirpalo n-tetradekane, leidžiama sorbuotis 24 val. ir heksanolio ekstrakcija mikrobangomis atlikta naudojant 2 g ChCl-Glu-H₂O.

Atliekant ekstrakciją mikrobangomis svarbus parametras yra mėginio maišymas. Taip pagreitinamas analitės perėjimas iš analizuojamo mėginio į viršerdvę. Pastebėta, kad maišant dideliu greičiu bulvių traškučiai susikaupia ant indo sienelių, todėl pasirinktas maišymo greitis – 200 aps./min.

Paprastai atliekant ekstrakciją mikrobangomis, pasirinkta ekstrakcijos trukmė būna iki 30 min. [194]. Šiame darbe buvo tiriama ekstrakcijos trukmė nuo 5 min. iki 30 min. Gauti rezultatai pateikiami 3.29 pav.



3.29 pav. Ekstrakcijos mikrobangomis priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės.

Kaip matyti iš gautų rezultatų, didžiausias heksanolio smailės plotas gautas ekstrakciją atliekant 10 min. Ekstrakciją atliekant 15 min. gaunamos mažesnės reikšmės, tai galėtų būti paaiškinama galimu analitės terminiu skilimu ir oksidacija. Tolimesniems darbams pasirinkta 10 min. ekstrakcijos trukmė.

Metodo analizinės charakteristikos. Optimizuotomis ekstrakcijos mikrobangomis sąlygomis (GET tirpiklis – ChCl-Glu-H₂O, mėginio ir tirpiklio santykis atitinkamai 10:1, maišymo greitis – 200 aps./min., ekstrakcijos trukmė – 10 min.) ir viršerdvės dujų chromatografinėmis sąlygomis (kaitinimo temperatūra 140 °C, o kaitinimo trukmė – 10 min.) nustatytos metodikos analizinės charakteristikos, kurios pateiktos 3.9 lentelėje.

Kalibracinė kreivė buvo sudaroma analizuojant 8 koncentracijų heksanolio tirpalus giliame eutektiniame tirpiklyje ChCl-Glu-H₂O atliekant po tris pakartojimus. Kalibracinė kreivė tiesinė iki 12,5 mg/kg. Kalibracinės kreivės koreliacijos koeficiento vertė 0,9915. Aptikimo riba buvo laikoma heksanolio koncentracija, kuriai esant heksanolio smailės aukštis yra tris

kartus didesnis už nulinės linijos triukšmą. Ji buvo 3,1 µg/g. Nustatymo riba buvo laikoma heksanalio koncentracija, kuriai esant heksanalio smailės aukštis yra dešimt kartų didesnis už nulinės linijos triukšmą. Ji buvo 10,3 µg/g. Pasikartojamumas buvo nustatomas atlikus po penkis 0,05, 0,1 ir 1 mg/g koncentracijos tirpalų pakartotinius matavimus. Santykinis standartinis nuokrypis atitinkamai buvo 11,7, 8,7 ir 5,6 %.

3.9 lentelė. Heksanalio viršerdvės dujų chromatografinio nustatymo metodikos analizinės charakteristikos.

Charakteristika	Vertė (ChCl-Glu-H ₂ O)
Aptikimo riba, µg/kg	3,1
Nustatymo riba, µg/kg	10,3
Tiesiškumas iki, mg/kg	12,5
R^2	0,9915
s_r , % (n = 5)	11,7 (c = 0,05 mg/g)
	8,7 (c = 0,1 mg/g)
	5,6 (c = 1 mg/g)

Metodo aptikimo riba (3,1 µg/kg) mažesnė už anksčiau paruoštos metodikos aptikimo ribą, kai tirpikliu buvo naudojamas n-tetradekanas (15 µg/l). Metodas patrauklus ne tik žema aptikimo riba ir gana geru rezultatų pasikartojamumu, bet ir tuo, kad analizei naudojamas aplinkai draugiškas tirpiklis.

Heksanalio nustatymas realiuose mėginiuose. Paruošta metodika buvo pritaikyta riebalų oksidacijos indikatoriumi – heksaluiui, nustatyti statinės viršerdvės dujų chromatografijos metodu riebalingame maiste (bulvių traškučiuose su krapais „Estrella“, keptose bulvėse ir keptoje juodoje duonoje). Į mikrobangų ekstrakcijos indelį buvo pridėdama 0,2 g sutrinto mėginio, užpilta 2 g ChCl-Glu-H₂O, virš mėginio įtvirtinamas 100 µl kokosų aliejumi užpildytas kapiliaras ir atliekama ekstrakcija panaudojant mikrobangas (10 min. kaitinama 80 °C temperatūroje maišant 200 aps./min. greičiu). Po ekstrakcijos kapiliaras su kokosų aliejumi perkeliamas į viršerdvės dujų chromatografinį indelį ir atliekama viršerdvės dujų chromatografinė analizė (10 min. kaitinama 140 °C temperatūroje).

Kiekybiniam heksanalio įvertinimui mėginiai buvo analizuoti standartinių priedų metodu. Tam 0,2 g sutrinto mėginio buvo užpilta 1, 2 ir 3 µl standartinio heksanalio tirpalo n-tetradekane (10 mg/ml) ir atliekama analizė. Nustatyta, kad heksanalio koncentracija bulvių traškučiuose mažesnė už aptikimo ribą, o keptose bulvėse – 5,5 µg/g. Didžiausias heksanalio kiekis

rastas keptoje juodoje duonoje – 7,1 µg/g. Didelė heksanolio koncentracija keptose bulvėse ir keptoje juodoje duonoje leidžia daryti prielaidą, kad aliejus, kuriuose kepami produktai yra retai keičiami.

IŠVADOS

1. Nustatyta, kad acto, propano, oksalo ir gintaro rūgščių derivatizacija tributilboratu vandeninėje terpėje vyksta pilnai ir gaunamos taisyklingos formos chromatografinės smailės. Paruošta derivatizuotų acto ir propano rūgščių viršerdvės dujų chromatografinė nustatymo metodika. Ji pritaikyta maisto produktų analizei. Oksalo ir gintaro rūgščių derivatizacijos tributilboratu produktai nepakankamai lakūs, kad juos būtų galima nustatyti vandeninėje terpėje viršerdvės dujų chromatografijos metodu.
2. Ištirtos oksalo, gintaro, pieno, obuolių ir citrinų rūgščių derivatizacijos sąlygos nevandeniniuose tirpaluose reagentu BSTFA. Pasirinktas tirpiklis DMF, kuriame derivatizacija vyksta pilnai. Paruoštos šių rūgščių dujų chromatografinio nustatymo metodikos analizuojant tirpalus ir atliekant viršerdvės dujų chromatografinę analizę. Viršerdvės dujų chromatografijos metodu citrinų rūgšties nustatyti nepavyko. Metodikos pritaikytos gintaro rūgščiai aptikti gintare bei citrinų rūgščiai aptikti ir nustatyti dešrelėse.
3. Kokosų aliejus yra tinkamas tirpiklis heksanolio kalibravimo tirpalų, skirtų heksanolio nustatymui augaliniuose aliejuose viršerdvės dujų chromatografijos metodu, gamybai, nes: 1) heksanolio pasiskirstymas tarp kokosų aliejaus ir dujinės fazės artimas pasiskirstymui tarp rapsų aliejaus ir dujinės fazės; 2) kaitinant kokosų aliejų 180 °C temperatūroje, nesusidaro heksanolio.
4. Paruošta heksanolio nustatymo kokosų aliejuje viršerdvės dujų chromatografinė metodika pritaikyta heksanoliui nustatyti alyvuogių, rapsų, saulėgrąžų ir linų sėmenų aliejuose. Didžiausias heksanolio kiekis aptiktas kaitintame saulėgrąžų aliejuje.
5. Tirtas heksanolio ekstrakcijos efektyvumas iš riebalingo maisto giliais eutektiniais tirpikliais panaudojant mikrobangas. Nustatyta, kad iš 8 tirtų tirpiklių heksanalį geriausiai ekstrahuoja $\text{ChCl-Glu-H}_2\text{O}$.
6. Panaudojus du atskirtus tirpiklius – $\text{ChCl-Glu-H}_2\text{O}$ ir kokosų aliejų – apjungta heksanolio ekstrakcija panaudojant mikrobangas ir VDChA bei paruošta greita heksanolio nustatymo kietose matricose metodika.

Metodika pritaikyta heksanaliui nustatyti bulvių traškučiuose, keptose bulvėse ir juodoje duonoje.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Moksliniai straipsniai:

1. **Birutė Bugelytė**, Rima Jonkutė, Vida Vičkačkaitė. Determination of some short chain carboxylic acids in food by headspace gas chromatography. *Chemija*, **29** (3), 2018, p. 193-197.
2. **Birutė Bugelytė**, Karolina Ilonina, Vilius Poškus, Vida Vičkačkaitė. Gas chromatographic determination of some carboxylic acids: comparison between solution and headspace analysis. *Chemija* **30** (4), 2019, p. 227-233.
3. Vida Vičkačkaitė, Gintarė Pipiraitė, Vilius Poškus, Ingrida Jurkutė, **Birutė Bugelytė**. Static headspace gas chromatographic determination of hexanal as a marker of lipid oxidation in fat-rich food. *Chemija* **31** (2), 2020, p. 95-100.
4. Vida Vičkačkaitė, Gintarė Pipiraitė, Vilius Poškus, **Birutė Bugelytė**. Coconut oil as a calibration matrix for headspace gas chromatographic determination of hexanal in edible oils. *Chemija* **31** (4), 2020, p. 255-261.
5. Vida Vičkačkaitė, Ingrida Jurkutė, Vilius Poškus, **Birutė Bugelytė**. Combined microwave-assisted extraction and headspace gas chromatography for hexanal determination in fat-rich food. *Separation Science plus* **5** (5), 2022, p. 1-8.

Mokslinių konferencijų tezės:

1. **Birutė Bugelytė**, Gintarė Pipiraitė, Vilius Poškus, Vida Vičkačkaitė. Determination of hexanal as marker of lipid oxidation in edible oils by headspace gas chromatography. Konferencijos „6th International E-Conference on New Trends in Chemistry“ tezės, Kipras (2020) 86.
2. **Birutė Bugelytė**, Ingrida Jurkutė, Vida Vičkačkaitė. Deep eutectic solvents for headspace gas chromatographic determination of hexanal. Konferencijos „64th International Conference for Students of Physics

and Natural Sciences – Open Readings 2021“ tezès, Lietuva (2021)
372.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] M. Theron ir J. Lues, *Organic Acids and Food Preservation*. CRC Press, 2010. doi: 10.1201/9781420078435.
- [2] I. Goldberg ir J. S. Rokem, „Organic and Fatty Acid Production, Microbial“, *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, M. Schaechter, Sud. Oxford: Academic Press, 2009, p. 421–442. doi: 10.1016/B978-012373944-5.00156-5.
- [3] G. I. Badea ir G. L. Radu, „Introductory Chapter: Carboxylic Acids - Key Role in Life Sciences“, *Carboxylic Acid - Key Role in Life Sciences*, G. I. Badea ir G. L. Radu, Sud. InTech, 2018. doi: 10.5772/intechopen.77021.
- [4] M. Pereira da Costa ir C. A. Conte-Junior, „Chromatographic Methods for the Determination of Carbohydrates and Organic Acids in Foods of Animal Origin: Carbohydrate and organic acid: HPLC and GC...“, *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, t. 14, nr. 5, p. 586–600, rugs. 2015, doi: 10.1111/1541-4337.12148.
- [5] „Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives“. Official Journal of the European Union, 2008 m. gruodžio 31 d. Žiūrėta: 2021 m. lapkričio 16 d. [Interaktyvus]. Adresas: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1333&from=en>
- [6] „Komisijos reglamentas (ES) Nr. 1129/2011 2011 m. lapkričio 11 d. kuriuo iš dalies keičiamas Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (EB) Nr. 1333/2008 II priedas sudarant Sąjungos maisto priedų sąrašą“. 2011 m. lapkričio 11 d. Žiūrėta: 2021 m. lapkričio 17 d. [Interaktyvus]. Adresas: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/?uri=CELEX%3A02011R1129-20131121>
- [7] N. Kaur, V. Chugh, ir A. K. Gupta, „Essential fatty acids as functional components of foods- a review“, *J Food Sci Technol*, t. 51, nr. 10, p. 2289–2303, spal. 2014, doi: 10.1007/s13197-012-0677-0.
- [8] C. Gomes, J. A. Almeida, O. L. Franco, ir B. Petriz, „Omics and the molecular exercise physiology“, *Advances in Clinical Chemistry*, t. 96, Elsevier, 2020, p. 55–84. doi: 10.1016/bs.acc.2019.11.003.
- [9] F. Tian, E. A. Decker, ir J. M. Goddard, „Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies“, *Food Funct.*, t. 4, nr. 5, p. 669, 2013, doi: 10.1039/c3fo30360h.
- [10] Z. Z. E. Sikorski ir A. Kolakowska, *Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipids*. CRC Press, 2010.
- [11] B. Kolb ir L. S. Ettre, *Static headspace-gas chromatography: theory and practice*, 2nd ed. Hoboken, N.J: Wiley, 2006.

- [12] S. Khandelwal, Y. K. Tailor, ir M. Kumar, „Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations“, *Journal of Molecular Liquids*, t. 215, p. 345–386, kovo 2016, doi: 10.1016/j.molliq.2015.12.015.
- [13] N. H. Snow ir G. P. Bullock, „Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography“, *Journal of Chromatography A*, t. 1217, nr. 16, p. 2726–2735, bal. 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.01.005.
- [14] A. C. Soria, M. J. García-Sarrió, ir M. L. Sanz, „Volatile sampling by headspace techniques“, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, t. 71, p. 85–99, rugs. 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.04.015.
- [15] N. H. Snow, Sud., *Basic multidimensional gas chromatography*, 1st ed. Cambridge: Elsevier, 2020.
- [16] O. V. Rodinkov, A. S. Bugaichenko, ir L. N. Moskvina, „Static Headspace Analysis and Its Current Status“, *J Anal Chem*, t. 75, nr. 1, p. 1–17, saus. 2020, doi: 10.1134/S106193482001013X.
- [17] B. Kolb, C. Welter, ir C. Bichler, „Determination of partition coefficients by automatic equilibrium headspace gas chromatography by vapor phase calibration“, *Chromatographia*, t. 34, nr. 5–8, p. 235–240, rugs. 1992, doi: 10.1007/BF02268351.
- [18] „An Introduction To Headspace Sampling In Gas Chromatography Fundamentals And Theory“, p. 35.
- [19] A. C. Soria, M. J. García-Sarrió, A. I. Ruiz-Matute, ir M. L. Sanz, „Headspace Techniques for Volatile Sampling“, *Comprehensive Analytical Chemistry*, t. 76, Elsevier, 2017, p. 255–278. doi: 10.1016/bs.coac.2017.02.001.
- [20] S. E. Ebeler, „Gas Chromatographic Analysis of Wines“, *Gas Chromatography*, Elsevier, 2012, p. 689–710. doi: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00030-4.
- [21] B. Kolb ir L. S. Ettre, „Theory and practice of multiple headspace extraction“, *Chromatographia*, t. 32, nr. 11–12, p. 505–513, gruodž. 1991, doi: 10.1007/BF02327895.
- [22] X. S. Chai ir J. Y. Zhu, „Indirect headspace gas chromatographic method for vapor–liquid phase equilibrium study“, *Journal of Chromatography A*, t. 799, nr. 1–2, p. 207–214, kovo 1998, doi: 10.1016/S0021-9673(97)01107-2.
- [23] Y. Wang, J. McCaffrey, ir D. L. Norwood, „Recent Advances in Headspace Gas Chromatography“, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, t. 31, nr. 11–12, p. 1823–1851, birž. 2008, doi: 10.1080/10826070802129092.
- [24] N. H. Snow ir G. C. Slack, „Head-space analysis in modern gas chromatography“, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, t. 21, nr. 9–10, p. 608–617, rugs. 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00802-6.

- [25] C. F. Ross, „Headspace Analysis“, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Elsevier, 2012, p. 27–50. doi: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00036-3.
- [26] M. J. Sithersingh ir N. H. Snow, „Headspace gas chromatography“, *Gas Chromatography*, Elsevier, 2021, p. 251–265. doi: 10.1016/B978-0-12-820675-1.00012-5.
- [27] PerkinElmer, „TurboMatrix Headspace Sampler and HS 40/110 Trap User’s Guide“. 2008 m. Žiūrėta: 2022 m. rugpjūčio 24 d. [Interaktyvus]. Adresas: https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/GDE_TurboMatrixHSHSTrapUsersGuide.pdf
- [28] C. L. Arthur ir Janusz. Pawliszyn, „Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers“, *Anal. Chem.*, t. 62, nr. 19, p. 2145–2148, spal. 1990, doi: 10.1021/ac00218a019.
- [29] M. R. Afshar Mogaddam, A. Mohebbi, A. Pazhohan, F. Khodadadeian, ir M. A. Farajzadeh, „Headspace mode of liquid phase microextraction: A review“, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, t. 110, p. 8–14, saus. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2018.10.021.
- [30] L. Sghaier ir kt., „An overview of recent developments in volatile compounds analysis from edible oils: Technique-oriented perspectives: Review of volatile compounds analysis from edible oils“, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, t. 118, nr. 12, p. 1853–1879, gruodž. 2016, doi: 10.1002/ejlt.201500508.
- [31] H. Liu ir P. K. Dasgupta, „Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop“, *Anal. Chem.*, t. 68, nr. 11, p. 1817–1821, birž. 1996, doi: 10.1021/ac960145h.
- [32] V. Vičkačkaitė, Ekstrakciniai mėginio paruošimo dujų chromatografinei analizei metodai. Vilnius, p. 12-13, 2008, ISBN 978-9955-33-277-0.
- [33] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, H. L. Munro, R. K. Rasheed, ir V. Tambyrajah, „Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains“, *Chem. Commun.*, nr. 19, p. 2010–2011, 2001, doi: 10.1039/b106357j.
- [34] B. B. Hansen ir kt., „Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications“, *Chem. Rev.*, t. 121, nr. 3, p. 1232–1285, vas. 2021, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00385.
- [35] P. Xu, G.-W. Zheng, M.-H. Zong, N. Li, ir W.-Y. Lou, „Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis“, *Bioresour. Bioprocess.*, t. 4, nr. 1, p. 34, gruodž. 2017, doi: 10.1186/s40643-017-0165-5.
- [36] Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S.-N. Chen, ir G. F. Pauli, „Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications,

- and Perspectives“, *J. Nat. Prod.*, t. 81, nr. 3, p. 679–690, kovo 2018, doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00945.
- [37] A. Shishov, A. Bulatov, M. Locatelli, S. Carradori, ir V. Andruch, „Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review“, *Microchemical Journal*, t. 135, p. 33–38, lapkr. 2017, doi: 10.1016/j.microc.2017.07.015.
- [38] B. Tang, W. Bi, H. Zhang, ir K. H. Row, „Deep Eutectic Solvent-Based HS-SME Coupled with GC for the Analysis of Bioactive Terpenoids in *Chamaecyparis obtusa* Leaves“, *Chromatographia*, t. 77, nr. 3–4, p. 373–377, vas. 2014, doi: 10.1007/s10337-013-2607-3.
- [39] A. Mehravar, A. Feizbakhsh, A. H. M. Sarafi, E. Konož, ir H. Faraji, „Deep eutectic solvent-based headspace single-drop microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples“, *Journal of Chromatography A*, t. 1632, p. 461618, lapkr. 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461618.
- [40] J. Nie *ir kt.*, „Microwave-assisted deep eutectic solvent extraction coupled with headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS for the analysis of volatile compounds from tobacco“, *Anal. Methods*, t. 9, nr. 5, p. 856–863, 2017, doi: 10.1039/C6AY03076A.
- [41] Z. Triaux, H. Petitjean, E. Marchioni, D. Steyer, ir C. Marcic, „Optimization by experimental design of headspace sorptive extraction and solid-phase microextraction for the determination of terpenes in spices“, *Food Anal. Methods*, t. 12, nr. 12, p. 2764–2776, gruodž. 2019, doi: 10.1007/s12161-019-01622-4.
- [42] E. L. Smith, A. P. Abbott, ir K. S. Ryder, „Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications“, *Chem. Rev.*, t. 114, nr. 21, p. 11060–11082, lapkr. 2014, doi: 10.1021/cr300162p.
- [43] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, K. J. McKenzie, ir S. U. Obi, „Solubility of Metal Oxides in Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride“, *J. Chem. Eng. Data*, t. 51, nr. 4, p. 1280–1282, liep. 2006, doi: 10.1021/je060038c.
- [44] A. P. Abbott, J. C. Barron, K. S. Ryder, ir D. Wilson, „Eutectic-Based Ionic Liquids with Metal-Containing Anions and Cations“, *Chem. Eur. J.*, t. 13, nr. 22, p. 6495–6501, liep. 2007, doi: 10.1002/chem.200601738.
- [45] Y. H. Choi *ir kt.*, „Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?“, *Plant Physiology*, t. 156, nr. 4, p. 1701–1705, rugpj. 2011, doi: 10.1104/pp.111.178426.
- [46] D. J. G. P. van Osch, L. F. Zubeir, A. van den Bruinhorst, M. A. A. Rocha, ir M. C. Kroon, „Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants“, *Green Chem.*, t. 17, nr. 9, p. 4518–4521, 2015, doi: 10.1039/C5GC01451D.

- [47] B. D. Ribeiro, C. Florindo, L. C. Iff, M. A. Z. Coelho, ir I. M. Marrucho, „Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents“, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, t. 3, nr. 10, p. 2469–2477, spal. 2015, doi: 10.1021/acssuschemeng.5b00532.
- [48] P. Makoś, E. Słupek, ir J. Gębicki, „Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review“, *Microchemical Journal*, t. 152, p. 104384, saus. 2020, doi: 10.1016/j.microc.2019.104384.
- [49] J. Cao, L. Chen, M. Li, F. Cao, L. Zhao, ir E. Su, „Two-phase systems developed with hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for simultaneously extracting various bioactive compounds with different polarities“, *Green Chem.*, t. 20, nr. 8, p. 1879–1886, 2018, doi: 10.1039/C7GC03820H.
- [50] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, ir F. Jérôme, „Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications“, *Chem. Soc. Rev.*, t. 41, nr. 21, p. 7108, 2012, doi: 10.1039/c2cs35178a.
- [51] R. Bernasconi, G. Panzeri, A. Accogli, F. Liberale, L. Nobili, ir L. Magagnin, „Electrodeposition from Deep Eutectic Solvents“, *Progress and Developments in Ionic Liquids*, S. Handy, Sud. InTech, 2017. doi: 10.5772/64935.
- [52] W. Deng *ir kt.*, „Hexafluoroisopropanol-based hydrophobic deep eutectic solvents for dispersive liquid-liquid microextraction of pyrethroids in tea beverages and fruit juices“, *Food Chemistry*, t. 274, p. 891–899, vas. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.048.
- [53] P. Makoś, E. Słupek, ir J. Gębicki, „Extractive detoxification of feedstocks for the production of biofuels using new hydrophobic deep eutectic solvents – Experimental and theoretical studies“, *Journal of Molecular Liquids*, t. 308, p. 113101, birž. 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.113101.
- [54] W. Chen *ir kt.*, „Investigation on the Thermal Stability of Deep Eutectic Solvents“, *Acta Physico-Chimica Sinica*, t. 34, nr. 8, p. 904–911, 2018, doi: 10.3866/PKU.WHXB201712281.
- [55] Y. Chen, D. Yu, Y. Lu, G. Li, L. Fu, ir T. Mu, „Volatility of Deep Eutectic Solvent Choline Chloride: *N*-Methylacetamide at Ambient Temperature and Pressure“, *Ind. Eng. Chem. Res.*, t. 58, nr. 17, p. 7308–7317, geg. 2019, doi: 10.1021/acs.iecr.8b04723.
- [56] G. R. Bayly, „Lipids and disorders of lipoprotein metabolism“, *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*, Elsevier, 2014, p. 702–736. doi: 10.1016/B978-0-7020-5140-1.00037-7.
- [57] F. J. Hidalgo ir R. Zamora, „Triacylglycerols: Structures and Properties“, *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier, 2016, p. 351–356. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00702-9.
- [58] D. Naviglio, M. Dellagrega, F. Ruffo, A. Andolfi, ir M. Gallo, „Rapid Analysis Procedures for Triglycerides and Fatty Acids as Pentyl and

- Phenethyl Esters for the Detection of Butter Adulteration Using Chromatographic Techniques“, *Journal of Food Quality*, t. 2017, p. 1–11, 2017, doi: 10.1155/2017/9698107.
- [59] J. B. Marcus, „Lipids Basics: Fats and Oils in Foods and Health“, *Culinary Nutrition*, Elsevier, 2013, p. 231–277. doi: 10.1016/B978-0-12-391882-6.00006-6.
- [60] S. Jana, A. Gandhi, ir S. Jana, „Nanotechnology in Bioactive Food Ingredients“, *Nanotechnology Applications in Food*, Elsevier, 2017, p. 21–41. doi: 10.1016/B978-0-12-811942-6.00002-9.
- [61] C. G. Scanes, „Animal Products and Human Nutrition“, *Animals and Human Society*, Elsevier, 2018, p. 41–64. doi: 10.1016/B978-0-12-805247-1.00003-4.
- [62] S. Qiu, X. Wang, M. Zan, Z. Wang, ir L. Dang, „The insight into separation of oleic, linoleic, and α -linolenic acid in peony seed oil from eutectic behaviors, polymorphic transition and solid-liquid phase equilibrium“, *LWT*, t. 138, p. 110738, kovo 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110738.
- [63] R. S. Romanić, T. Z. Lužaić, ir B. Đ. Radić, „Enriched sunflower oil with omega 3 fatty acids from flaxseed oil: Prediction of the nutritive characteristics“, *LWT*, t. 150, p. 112064, spal. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.112064.
- [64] M. Ciccone *ir kt.*, „The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Supplementation in Childhood: A Review“, *PRC*, t. 8, nr. 1, p. 42–55, birž. 2013, doi: 10.2174/1574890111308010006.
- [65] E. Abedi ir M. A. Sahari, „Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties“, *Food Sci Nutr*, t. 2, nr. 5, p. 443–463, rugs. 2014, doi: 10.1002/fsn3.121.
- [66] X. Liu *ir kt.*, „Intake of polyunsaturated fatty acids and risk of preclinical and clinical type 1 diabetes in children-a systematic review and meta-analysis“, *Eur J Clin Nutr*, t. 73, nr. 1, p. 1–8, saus. 2019, doi: 10.1038/s41430-018-0185-z.
- [67] T. A. Mori ir J. M. Hodgson, „Fatty acids: Health Effects of Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids“, *Encyclopedia of Human Nutrition*, Elsevier, 2013, p. 209–214. doi: 10.1016/B978-0-12-375083-9.00100-8.
- [68] G. Grosso *ir kt.*, „Omega-3 Fatty Acids and Depression: Scientific Evidence and Biological Mechanisms“, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, t. 2014, p. 1–16, 2014, doi: 10.1155/2014/313570.
- [69] F. Shahidi ir P. Ambigaipalan, „Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review“, *Journal of Functional Foods*, t. 18, p. 820–897, spal. 2015, doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018.

- [70] F. Esfarjani *ir kt.*, „Evaluating the rancidity and quality of discarded oils in fast food restaurants“, *Food Sci Nutr*, t. 7, nr. 7, p. 2302–2311, liep. 2019, doi: 10.1002/fsn3.1072.
- [71] M. Ahmed, J. Pickova, T. Ahmad, M. Liaquat, A. Farid, *ir M. Jahangir*, „Oxidation of Lipids in Foods“, *SJA*, t. 32, nr. 3, p. 230–238, rugpj. 2016, doi: 10.17582/journal.sja/2016.32.3.230.238.
- [72] S. Kubow, „Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods“, *Free Radical Biology and Medicine*, t. 12, nr. 1, p. 63–81, saus. 1992, doi: 10.1016/0891-5849(92)90059-P.
- [73] M. Gavahian, Y.-H. Chu, A. Mousavi Khaneghah, F. J. Barba, *ir N. N. Misra*, „A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods“, *Trends in Food Science & Technology*, t. 77, p. 32–41, liep. 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2018.04.009.
- [74] D. B. Min *ir J. M. Boff*, „Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods“, *Comp Rev Food Sci Food Safety*, t. 1, nr. 2, p. 58–72, liep. 2002, doi: 10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x.
- [75] F. Shahidi *ir Y. Zhong*, „Lipid oxidation and improving the oxidative stability“, *Chem. Soc. Rev.*, t. 39, nr. 11, p. 4067, 2010, doi: 10.1039/b922183m.
- [76] R. F. Lee, „Photo-oxidation and Photo-toxicity of Crude and Refined Oils“, *Spill Science & Technology Bulletin*, t. 8, nr. 2, p. 157–162, bal. 2003, doi: 10.1016/S1353-2561(03)00015-X.
- [77] J. Cao *ir kt.*, „Novel Approach To Evaluate the Oxidation State of Vegetable Oils Using Characteristic Oxidation Indicators“, *J. Agric. Food Chem.*, t. 62, nr. 52, p. 12545–12552, gruodž. 2014, doi: 10.1021/jf5047656.
- [78] B. Nieva-Echevarría, E. Goicoechea, *ir M. D. Guillén*, „Food lipid oxidation under gastrointestinal digestion conditions: A review“, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, t. 60, nr. 3, p. 461–478, vas. 2020, doi: 10.1080/10408398.2018.1538931.
- [79] J. Hussein, „Cell membrane fatty acids and health“, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, nr. 5, p. 38–46, 2013.
- [80] B. Chen, A. Han, D. J. McClements, *ir E. A. Decker*, „Physical Structures in Soybean Oil and Their Impact on Lipid Oxidation“, *J. Agric. Food Chem.*, t. 58, nr. 22, p. 11993–11999, lapkr. 2010, doi: 10.1021/jf102763p.
- [81] J. M. Lorenzo *ir kt.*, „Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review“, *Food Research International*, t. 106, p. 1095–1104, bal. 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2017.12.005.
- [82] J.-M. Galano, Y. Y. Lee, T. Durand, *ir J. C.-Y. Lee*, „Special Issue on “Analytical Methods for Oxidized Biomolecules and Antioxidants” The use of isoprostanoids as biomarkers of oxidative damage, and their role in human dietary intervention studies“, *Free Radical*

- Research*, t. 49, nr. 5, p. 583–598, geg. 2015, doi: 10.3109/10715762.2015.1007969.
- [83] F. Shahidi ir Hy. J. Zhong, „Methods for Measuring Lipid Oxidation“, *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*, 1-asis leid., F. Shahidi, Sud. Wiley, 2020, p. 1–27. doi: 10.1002/047167849X.bio050.pub2.
- [84] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, ir K. Robards, „Methods for testing antioxidant activity“, *Analyst*, t. 127, nr. 1, p. 183–198, saus. 2002, doi: 10.1039/b009171p.
- [85] B. Barriuso, I. Astiasarán, ir D. Ansorena, „A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task“, *Eur Food Res Technol*, t. 236, nr. 1, p. 1–15, saus. 2013, doi: 10.1007/s00217-012-1866-9.
- [86] Aurelija Paulauskienė, *Maisto chemija*. 2012.
- [87] A. Ruíz, M. J. A. Cañada, ir B. Lendl, „A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection“, *Analyst*, t. 126, nr. 2, p. 242–246, 2001, doi: 10.1039/b008688f.
- [88] M. Mohammadi, P. Hajeb, R. Seyyedian, G. Hossein Mohebbi, ir A. Barmak, „Evaluation of oxidative quality parameters in imported edible oils in Iran“, *British Food Journal*, t. 115, nr. 6, p. 789–795, birž. 2013, doi: 10.1108/BFJ-Feb-2011-0035.
- [89] D. Moigradean, M.-A. Poiana, ir I. Gogoasa, „Quality characteristics and oxidative stability of coconut oil during storage“, *Clean Products and Processes*, t. 18, p. 272–276, gruodž. 2012.
- [90] H. Karami, M. Rasekh, ir E. Mirzaee-Ghaleh, „Application of the E-nose machine system to detect adulterations in mixed edible oils using chemometrics methods“, *J Food Process Preserv*, t. 44, nr. 9, rugs. 2020, doi: 10.1111/jfpp.14696.
- [91] D. Zanella, H. E. Anderson, T. Selby, R. H. Magnuson, T. Liden, ir K. A. Schug, „Comparison of headspace solid-phase microextraction high capacity fiber coatings based on dual mass spectrometric and broadband vacuum ultraviolet absorption detection for untargeted analysis of beer volatiles using gas chromatography“, *Analytica Chimica Acta*, t. 1141, p. 91–99, saus. 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.10.026.
- [92] M. Laguerre, J. Lecomte, ir P. Villeneuve, „Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges“, *Progress in Lipid Research*, t. 46, nr. 5, p. 244–282, rugs. 2007, doi: 10.1016/j.plipres.2007.05.002.
- [93] N. J. Bate, S. Sivasankar, C. Moxon, J. M. C. Riley, J. E. Thompson, ir S. J. Rothstein, „Molecular Characterization of an Arabidopsis Gene Encoding Hydroperoxide Lyase, a Cytochrome P-450 That Is

- Wound Inducible¹“, *Plant Physiology*, t. 117, nr. 4, p. 1393–1400, rugpj. 1998, doi: 10.1104/pp.117.4.1393.
- [94] A. Sanches-Silva, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, J. López-Hernández, ir P. Paseiro-Losada, „Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography“, *Journal of Chromatography A*, t. 1046, nr. 1–2, p. 75–81, rugpj. 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.06.101.
- [95] V. Varlet, C. Prost, ir T. Serot, „Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation“, *Food Chemistry*, t. 105, nr. 4, p. 1536–1556, saus. 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.041.
- [96] L. Ning *ir kt.*, „Identification of volatile components in Chinese Sinkiang fermented camel milk using SAFE, SDE, and HS-SPME-GC/MS“, *Food Chemistry*, t. 129, nr. 3, p. 1242–1252, gruodž. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.115.
- [97] M. A. Ferhat, N. Tigrine-Kordjani, S. Chemat, B. Y. Meklati, ir F. Chemat, „Rapid Extraction of Volatile Compounds Using a New Simultaneous Microwave Distillation: Solvent Extraction Device“, *Chroma*, t. 65, nr. 3–4, p. 217–222, vas. 2007, doi: 10.1365/s10337-006-0130-5.
- [98] S.-T. Yang, H. Huang, A. Tay, W. Qin, L. De Guzman, ir E. C. S. Nicolas, „Extractive Fermentation for the Production of Carboxylic Acids“, *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, Elsevier, 2007, p. 421–446. doi: 10.1016/B978-044452114-9/50017-7.
- [99] T. Y. Wang, M. Liu, P. Portincasa, ir D. Q.-H. Wang, „New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption“, *Eur J Clin Invest*, p. n/a-n/a, rugs. 2013, doi: 10.1111/eci.12161.
- [100] R. J. Ouellette ir J. D. Rawn, „Carboxylic Acids“, *Organic Chemistry*, Elsevier, 2018, p. 625–663. doi: 10.1016/B978-0-12-812838-1.50021-9.
- [101] T. Brütsh, G. Jaffuel, A. Vallat, T. C. J. Turlings, ir M. Chapuisat, „Wood ants produce a potent antimicrobial agent by applying formic acid on tree-collected resin“, *Ecol Evol*, t. 7, nr. 7, p. 2249–2254, bal. 2017, doi: 10.1002/ece3.2834.
- [102] I. Berregi, G. del Campo, R. Caracena, ir J. I. Miranda, „Quantitative determination of formic acid in apple juices by ¹H NMR spectrometry“, *Talanta*, t. 72, nr. 3, p. 1049–1053, geg. 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2006.12.031.
- [103] A. Vidra ir Á. Németh, „Bio-produced Acetic Acid: A Review“, *Period. Polytech. Chem. Eng.*, t. 62, nr. 3, p. 245–256, lapkr. 2017, doi: 10.3311/PPch.11004.

- [104] J. Smith ir L. Hong-Shum, *Food additives data book*. John Wiley & Sons, 2011.
- [105] J. A. Young, „Acetic Acid (glacial)“, *J. Chem. Educ.*, t. 78, nr. 6, p. 721, birž. 2001, doi: 10.1021/ed078p721.
- [106] W. Doles, G. Wilkerson, S. Morrison, ir R. G. Richmond, „Glacial Acetic Acid Adverse Events: Case Reports and Review of the Literature“, *Hosp Pharm*, t. 50, nr. 4, p. 304–309, bal. 2015, doi: 10.1310/hpj5004-304.
- [107] P. Pal ir J. Nayak, „Acetic Acid Production and Purification: Critical Review Towards Process Intensification“, *Separation & Purification Reviews*, t. 46, nr. 1, p. 44–61, saus. 2017, doi: 10.1080/15422119.2016.1185017.
- [108] K. G. Elhage, K. St. Claire, ir S. Daveluy, „Acetic acid and the skin: a review of vinegar in dermatology“, *Int J Dermatol*, p. ijd.15804, rugpj. 2021, doi: 10.1111/ijd.15804.
- [109] M. M. Theron ir J. F. R. Lues, „Organic Acids and Meat Preservation: A Review“, *Food Reviews International*, t. 23, nr. 2, p. 141–158, kovo 2007, doi: 10.1080/87559120701224964.
- [110] S. A. Mir ir F. A. Masoodi, „Use of organic acids for preservation and safety of traditional meat products“, *J Food Saf*, t. 38, nr. 6, gruodž. 2018, doi: 10.1111/jfs.12514.
- [111] C. W. Ho, A. M. Lazim, S. Fazry, U. K. H. H. Zaki, ir S. J. Lim, „Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review“, *Food Chemistry*, t. 221, p. 1621–1630, bal. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.128.
- [112] „LIETUVOS RESPUBLIKOS ŽEMĖS ŪKIO MINISTRO ĮSAKYMAS DĖL PRIVALOMŲJŲ ACTO KOKYBĖS REIKALAVIMŲ PATVIRTINIMO“. 2012 m. kovo 28 d. Žiūrėta: 2021 m. lapkričio 17 d. [Interaktyvus]. Adresas: <https://www.e-tar.lt/portal/lt/legalAct/TAR.2954BCDDE303/asr>
- [113] „DĖL LIETUVOS HIGIENOS NORMOS HN 23:2011 ‚CHEMINIŲ MEDŽIAGŲ PROFESINIO POVEIKIO RIBINIAI DYDŽIAI. MATAVIMO IR POVEIKIO VERTINIMO BENDRIEJI REIKALAVIMAI‘ PATVIRTINIMO“. 2011 m. rugsėjo 1 d. Žiūrėta: 2021 m. lapkričio 17 d. [Interaktyvus]. Adresas: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.405920>
- [114] H. Quitmann, R. Fan, ir P. Czermak, „Acidic Organic Compounds in Beverage, Food, and Feed Production“, *Biotechnology of Food and Feed Additives*, t. 143, H. Zorn ir P. Czermak, Sud. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 91–141. doi: 10.1007/10_2013_262.
- [115] S. C. Gad, „Propionic Acid“, *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, 2014, p. 1105–1107. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00914-3.

- [116] John Wiley & Sons, Inc, Sud., *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-asis leid. Wiley, 2000. doi: 10.1002/0471238961.
- [117] T. A. Ivandini, T. N. Rao, A. Fujishima, ir Y. Einaga, „Electrochemical Oxidation of Oxalic Acid at Highly Boron-Doped Diamond Electrodes“, *Anal. Chem.*, t. 78, nr. 10, p. 3467–3471, geg. 2006, doi: 10.1021/ac052029x.
- [118] A. J. García-Fernández, S. Espín, P. Gómez-Ramírez, ir E. Martínez-López, „Oxalates“, *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, 2014, p. 730–734. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00526-1.
- [119] A. Gregorc ir I. Planinc, „The Control of Varroa destructor Using Oxalic Acid“, *The Veterinary Journal*, t. 163, nr. 3, p. 306–310, geg. 2002, doi: 10.1053/tvjl.2001.0675.
- [120] E. Akyol ir H. YeniNar, „Use of oxalic acid to control Varroa destructor in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies“, p. 4.
- [121] E. M. Silberhorn, „Oxalates“, *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, 2005, p. 320–322. doi: 10.1016/B0-12-369400-0/01058-9.
- [122] J. Smith ir L. Hong-Shum, *Food Additives Data Book*. John Wiley & Sons, 2008.
- [123] R. K. Saxena, S. Saran, J. Isar, ir R. Kaushik, „Production and Applications of Succinic Acid“, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 2017, p. 601–630. doi: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00027-0.
- [124] „KOMISIJOS ĮGYVENDINIMO REGLAMENTAS (ES) 2017/56 dėl leidimo naudoti pieno rūgštį, 4-oksopentano rūgštį, gintaro rūgštį, fumaro rūgštį, etilacetoacetatą, etilo laktatą, butilo laktatą, etilo 4-oksovaleratą, dietilsukcinatą, dietilmalonatą, butil-O-butirillaktatą, heks-3-enillaktatą, heksillaktatą, butiro-1,4-laktoną, dekan-1,5-laktoną, undekan-1,5-laktoną, pentan-1,4-laktoną, nonano-1,5-laktoną, oktan-1,5-laktoną, heptan-1,4-laktoną ir heksan-1,4-laktoną kaip visų rūšių gyvūnams skirtus pašaro priedus“. 2016 m. gruodžio 14 d. Žiūrėta: 2021 m. lapkričio 17 d. [Interaktyvus]. Adresas: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R0056&from=SL>
- [125] R. Datta ir M. Henry, „Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review“, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, t. 81, nr. 7, p. 1119–1129, liep. 2006, doi: 10.1002/jctb.1486.
- [126] M. Dusselier, P. Van Wouwe, A. Dewaele, E. Makshina, ir B. F. Sels, „Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis“, *Energy Environ. Sci.*, t. 6, nr. 5, p. 1415, 2013, doi: 10.1039/c3ee00069a.
- [127] F. A. Castillo Martinez, E. M. Balciunas, J. M. Salgado, J. M. Domínguez González, A. Converti, ir R. P. de S. Oliveira, „Lactic

- acid properties, applications and production: A review“, *Trends in Food Science & Technology*, t. 30, nr. 1, p. 70–83, kovo 2013, doi: 10.1016/j.tifs.2012.11.007.
- [128] J. Vijayakumar, V. Thangavelu, ir A. Rajendran, „Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid“, *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly (cabeq@pbj.hr); Vol.22 No.2*, t. 22, birž. 2008.
- [129] Y.-J. Wee, J.-N. Kim, ir H.-W. Ryu, „Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications“, *Food Technology and Biotechnology*, t. 44, nr. 2, p. 163–172, birž. 2006.
- [130] K. Izawa, Y. Amino, M. Kohmura, Y. Ueda, ir M. Kuroda, „Human–Environment Interactions – Taste“, *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, 2010, p. 631–671. doi: 10.1016/B978-008045382-8.00108-8.
- [131] J. W. Lee, M.-S. Han, S. Choi, J. Yi, T. W. Lee, ir S. Y. Lee, „Organic Acids“, *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, 2011, p. 149–161. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00183-5.
- [132] „Final Report on the Safety Assessment of Malic Acid and Sodium Malate“, *Int J Toxicol*, t. 20, nr. 1_suppl, p. 47–55, saus. 2001, doi: 10.1080/109158101750300946.
- [133] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), „Scientific Opinion on the safety and efficacy of malic acid and a mixture of sodium and calcium malate when used as technological additives for all animal species“, *EFSA*, t. 12, nr. 2, vas. 2014, doi: 10.2903/j.efsa.2014.3563.
- [134] G. Turker, B. Kizilkaya, ir N. Arifoglu, „Determination of Organic Acid Composition and Free Radical Scavenging Capacity of Kefir“, *Asian J. Chem.*, t. 26, nr. 8, p. 2443–2446, 2014, doi: 10.14233/ajchem.2014.16267.
- [135] M.-H. Yang ir Y.-M. Choong, „A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C2–C12) volatile organic acids in foods“, *Food Chemistry*, t. 75, nr. 1, p. 101–108, spal. 2001, doi: 10.1016/S0308-8146(01)00211-4.
- [136] M. Cocchi, C. Durante, M. Grandi, P. Lambertini, D. Manzini, ir A. Marchetti, „Simultaneous determination of sugars and organic acids in aged vinegars and chemometric data analysis“, *Talanta*, t. 69, nr. 5, p. 1166–1175, liep. 2006, doi: 10.1016/j.talanta.2005.12.032.
- [137] I. Mato, S. Suárez-Luque, ir J. F. Huidobro, „A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines“, *Food Research International*, t. 38, nr. 10, p. 1175–1188, gruodž. 2005, doi: 10.1016/j.foodres.2005.04.007.
- [138] I. Mato, J. F. Huidobro, J. Simal-Lozano, ir M. T. Sancho, „Analytical Methods for the Determination of Organic Acids in

- Honey“, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, t. 36, nr. 1, p. 3–11, saus. 2006, doi: 10.1080/10408340500451957.
- [139] R. Fernández, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, ir G. C. Premier, „Critical analysis of methods for the measurement of volatile fatty acids“, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, t. 46, nr. 3, p. 209–234, vas. 2016, doi: 10.1080/10643389.2015.1073493.
- [140] O. Kritsunankul, B. Pramote, ir J. Jakmunee, „Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine“, *Talanta*, t. 79, nr. 4, p. 1042–1049, rugs. 2009, doi: 10.1016/j.talanta.2009.03.001.
- [141] P. Brugnerotto, F. Della Betta, L. V. Gonzaga, R. Fett, ir A. C. Oliveira Costa, „A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracatinga honeydew honey and floral honey“, *Journal of Food Composition and Analysis*, t. 82, p. 103243, rugs. 2019, doi: 10.1016/j.jfca.2019.103243.
- [142] A. Pascual-Maté, S. M. Osés, M. A. Fernández-Muiño, ir M. T. Sancho, „Methods of analysis of honey“, *Journal of Apicultural Research*, t. 57, nr. 1, p. 38–74, saus. 2018, doi: 10.1080/00218839.2017.1411178.
- [143] A. Hijazi, I. Pisano, P. Illek, ir J. J. Leahy, „A Rapid HPLC Method for the Simultaneous Determination of Organic Acids and Furans: Food Applications“, *Beverages*, t. 8, nr. 1, p. 6, saus. 2022, doi: 10.3390/beverages8010006.
- [144] R. F. Sofija Sasnauskienė, „Chromatografijos metodai ir jų taikymas | Laboratorinė medicina. 2012, t. 14, Nr. 1, p. 33-39“, 2013 m. gegužės 12 d. [https://zurnalas.llmd.lt/lt/straipsnis/chromatografijos-metodai-ir-j%C5%B3-taikymas \(žiūrėta 2022 m. kovo 31 d.\)](https://zurnalas.llmd.lt/lt/straipsnis/chromatografijos-metodai-ir-j%C5%B3-taikymas-%28%2022%20m.%20kovo%2031%20d.%29).
- [145] M. T. Sancho, I. Mato, J. F. Huidobro, M. A. Fernández-Muiño, ir A. Pascual-Maté, „Nonaromatic Organic Acids of Honeys“, *Pot-Honey*, P. Vit, S. R. M. Pedro, ir D. Roubik, Sud. New York, NY: Springer New York, 2013, p. 447–458. doi: 10.1007/978-1-4614-4960-7_32.
- [146] B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, ir M. Gallego, „Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction“, *Talanta*, t. 84, nr. 3, p. 924–930, geg. 2011, doi: 10.1016/j.talanta.2011.02.031.
- [147] M. C. Pietrogrande, D. Bacco, ir M. Mercuriali, „GC–MS analysis of low-molecular-weight dicarboxylic acids in atmospheric aerosol: comparison between silylation and esterification derivatization procedures“, *Anal Bioanal Chem*, t. 396, nr. 2, p. 877–885, saus. 2010, doi: 10.1007/s00216-009-3212-z.
- [148] P. Hušek, P. Šimek, ir P. Matucha, „Smooth Esterification of Di- and Tricarboxylic Acids with Methyl and Ethyl Chloroformates in Gas Chromatographic Profiling of Urinary Acidic Metabolites“,

- Chromatographia*, t. 58, nr. 9, p. 623–630, lapkr. 2003, doi: 10.1365/s10337-003-0078-7.
- [149] M. A. Farajzadeh, N. Nouri, ir P. Khorram, „Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography“, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, t. 55, p. 14–23, kovo 2014, doi: 10.1016/j.trac.2013.11.006.
- [150] S. G. Villas-Bôas, K. F. Smart, S. Sivakumaran, ir G. A. Lane, „Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS?“, *Metabolites*, t. 1, nr. 1, p. 3–20, saus. 2011, doi: 10.3390/metabo1010003.
- [151] J. Liesienė ir G. Buika, *Skysčių ir dujų chromatografijos pagrindai*. Kaunas: Vitae litera, 2007.
- [152] M. A. Mohd, *Advanced Gas Chromatography: Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. IntechOpen, 2012. [Interaktyvus]. Adresas: <https://books.google.lt/books?id=XuacDwAAQBAJ>
- [153] L. Jarukas, O. Mykhailenko, J. Baranauskaite, M. Marksa, ir L. Ivanauskas, „Investigation of Organic Acids in Saffron Stigmas (*Crocus sativus* L.) Extract by Derivatization Method and Determination by GC/MS“, *Molecules*, t. 25, nr. 15, p. 3427, liep. 2020, doi: 10.3390/molecules25153427.
- [154] S. G. Villas-Bôas, D. G. Delicado, M. Åkesson, ir J. Nielsen, „Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography–mass spectrometry“, *Analytical Biochemistry*, t. 322, nr. 1, p. 134–138, lapkr. 2003, doi: 10.1016/j.ab.2003.07.018.
- [155] J. M. Halket ir V. G. Zaikin, „Derivatization in Mass Spectrometry–3. Alkylation (Arylation)“, *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, t. 10, nr. 1, p. 1–19, vas. 2004, doi: 10.1255/ejms.619.
- [156] M. Q. Farooq, N. M. Abbasi, ir J. L. Anderson, „Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography“, *Journal of Chromatography A*, t. 1633, p. 461613, gruodž. 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461613.
- [157] M. T. Zafarani-Moattar, H. Shekaari, ir F. Ghaffari, „Vapor–Liquid Equilibria Study of the Aqueous Systems Containing {Choline Chloride + Glucose or Urea} and Their Deep Eutectic Solvents at 298.15 K and 85 kPa“, *J. Chem. Eng. Data*, t. 64, nr. 11, p. 4754–4762, lapkr. 2019, doi: 10.1021/acs.jced.9b00076.
- [158] C. Florindo, F. S. Oliveira, L. P. N. Rebelo, A. M. Fernandes, ir I. M. Marrucho, „Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids“, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, t. 2, nr. 10, p. 2416–2425, spal. 2014, doi: 10.1021/sc500439w.

- [159] D. Yuvali, M. Seyhaneyildizi, M. Soylak, İ. Narin, ir E. Yilmaz, „An environment-friendly and rapid liquid-liquid microextraction based on new synthesized hydrophobic deep eutectic solvent for separation and preconcentration of erythrosine (E127) in biological and pharmaceutical samples“, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, t. 244, p. 118842, saus. 2021, doi: 10.1016/j.saa.2020.118842.
- [160] A. M. Sabir, M. Moloy, ir P. S. Bhasin, „HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW“, *Int. Res. J. Pharm.*, t. 4, nr. 4, p. 39–46, lapkr. 2016, doi: 10.7897/2230-8407.04407.
- [161] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, ir J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*. John Wiley & Sons, 2012.
- [162] Y. Kourkoutas, P. Kandyliis, P. Panas, J. S. G. Dooley, P. Nigam, ir A. A. Koutinas, „Evaluation of Freeze-Dried Kefir Coculture as Starter in Feta-Type Cheese Production“, *Appl Environ Microbiol*, t. 72, nr. 9, p. 6124–6135, rugs. 2006, doi: 10.1128/AEM.03078-05.
- [163] H.-J. Suh, S.-R. Kim, K.-S. Lee, S. Park, ir S. C. Kang, „Antioxidant activity of various solvent extracts from *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae“, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, t. 99, nr. 2, p. 67–73, geg. 2010, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.02.005.
- [164] I. G. Zenkevich, „Prevention of a dangerous tendency in the presentation of the results of GC-MS identification“, *Anal Bioanal Chem*, t. 405, nr. 10, p. 3075–3083, bal. 2013, doi: 10.1007/s00216-013-6751-2.
- [165] I. G. Zenkevich ir L. N. Fakhretdinova, „Potential of gas chromatography in the determination of low-volatile dicarboxylic acids“, *J Anal Chem*, t. 71, nr. 4, p. 402–409, bal. 2016, doi: 10.1134/S1061934816020167.
- [166] M. G. Pervova, D. L. Chizhov, ir V. I. Saloutin, „Simultaneous determination of aliphatic acids and aldehydes in aqueous media by reaction gas chromatography“, *J Anal Chem*, t. 71, nr. 10, p. 1041–1045, spal. 2016, doi: 10.1134/S1061934816100099.
- [167] J. H. Langenheim, *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany*. Portland, Or: Timber Press, 2003.
- [168] E. Ebrahimiyan, S. M. Seyyedi, A. Bybordi, ir C. A. Damalas, „Seed yield and oil quality of sunflower, safflower, and sesame under different levels of irrigation water availability“, *Agricultural Water Management*, t. 218, p. 149–157, birž. 2019, doi: 10.1016/j.agwat.2019.03.031.
- [169] S. P. Singh ir D. Singh, „Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review“, *Renewable and Sustainable Energy*

- Reviews*, t. 14, nr. 1, p. 200–216, saus. 2010, doi: 10.1016/j.rser.2009.07.017.
- [170] E. Tvrzicka, L.-S. Kremmyda, B. Stankova, ir A. Zak, „FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE - A REVIEW. PART 1: CLASSIFICATION, DIETARY SOURCES AND BIOLOGICAL FUNCTIONS“, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, t. 155, nr. 2, p. 117–130, birž. 2011, doi: 10.5507/bp.2011.038.
- [171] A. Chiou ir N. Kalogeropoulos, „Virgin Olive Oil as Frying Oil: Virgin olive oil as frying oil...“, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, t. 16, nr. 4, p. 632–646, liep. 2017, doi: 10.1111/1541-4337.12268.
- [172] L. Xu, X. Yu, M. Li, J. Chen, ir X. Wang, „Monitoring oxidative stability and changes in key volatile compounds in edible oils during ambient storage through HS-SPME/GC–MS“, *International Journal of Food Properties*, t. 20, nr. sup3, p. S2926–S2938, gruodž. 2017, doi: 10.1080/10942912.2017.1382510.
- [173] M. Nykter, H.-R. Kymäläinen, ir F. Gates, „Quality characteristics of edible linseed oil“, *AFSci*, t. 15, nr. 4, p. 402, gruodž. 2008, doi: 10.2137/145960606780061443.
- [174] J. Gromadzka ir W. Wardencki, „Static Headspace Sampling and Solid-Phase Microextraction for Assessment of Edible Oils Stability“, *Chroma*, t. 71, nr. S1, p. 81–86, birž. 2010, doi: 10.1365/s10337-010-1516-y.
- [175] C. Ma ir kt., „Headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for the analysis of aldehydes in edible oils“, *Talanta*, t. 120, p. 94–99, kovo 2014, doi: 10.1016/j.talanta.2013.11.021.
- [176] D. A. Ananth, G. Deviram, V. Mahalakshmi, T. Sivasudha, ir Z. Tietel, „Phytochemical composition and antioxidant characteristics of traditional cold pressed seed oils in South India“, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, t. 17, p. 416–421, saus. 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2018.12.018.
- [177] H. Nouredini, B. C. Teoh, ir L. Davis Clements, „Viscosities of vegetable oils and fatty acids“, *J Am Oil Chem Soc*, t. 69, nr. 12, p. 1189–1191, gruodž. 1992, doi: 10.1007/BF02637678.
- [178] F. Shahidi, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Industrial and Nonedible Products from Oils and Fats*, t. 6. John Wiley & Sons, 2005.
- [179] D. A. Skoog, Sud., *Fundamentals of analytical chemistry*, 8. ed., International student ed., [Repr.]. Belmont, Calif.: Thomson-Brooks/Cole, 2010.
- [180] M. D. Guillén ir P. S. Uriarte, „Monitoring by 1H nuclear magnetic resonance of the changes in the composition of virgin linseed oil

- heated at frying temperature. Comparison with the evolution of other edible oils“, *Food Control*, t. 28, nr. 1, p. 59–68, lapkr. 2012, doi: 10.1016/j.foodcont.2012.04.024.
- [181] V. Sivankalyani, I. Maoz, O. Feygenberg, D. Maurer, ir N. Alkan, „Chilling Stress Upregulates α -Linolenic Acid-Oxidation Pathway and Induces Volatiles of C₆ and C₉ Aldehydes in Mango Fruit“, *J. Agric. Food Chem.*, t. 65, nr. 3, p. 632–638, saus. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.6b04355.
- [182] J. Cao *ir kt.*, „Analysis of nonpolar lipophilic aldehydes/ketones in oxidized edible oils using HPLC-QqQ-MS for the evaluation of their parent fatty acids“, *Food Research International*, t. 64, p. 901–907, spal. 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.08.042.
- [183] P. Gómez-Cortés, J. T. Brenna, P. Lawrence, ir M. A. de la Fuente, „Novel characterisation of minor α -linolenic acid isomers in linseed oil by gas chromatography and covalent adduct chemical ionisation tandem mass spectrometry“, *Food Chemistry*, t. 200, p. 141–145, birž. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.023.
- [184] K. Nuernberg *ir kt.*, „Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs“, *Meat Science*, t. 70, nr. 1, p. 63–74, geg. 2005, doi: 10.1016/j.meatsci.2004.12.001.
- [185] M. H. Azarbad ir H. Jeleń, „Determination of Hexanal—an Indicator of Lipid Oxidation by Static Headspace Gas Chromatography (SHS-GC) in Fat-Rich Food Matrices“, *Food Anal. Methods*, t. 8, nr. 7, p. 1727–1733, rugpj. 2015, doi: 10.1007/s12161-014-0043-0.
- [186] A. I. Mandić, I. J. Sedej, M. B. Sakač, ir A. Č. Mišan, „Static Headspace Gas Chromatographic Method for Aldehyde Determination in Crackers“, *Food Anal. Methods*, t. 6, nr. 1, p. 61–68, vas. 2013, doi: 10.1007/s12161-012-9415-5.
- [187] M. Romeu-Nadal, A. I. Castellote, ir M. C. López-Sabater, „Headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas“, *Journal of Chromatography A*, t. 1046, nr. 1–2, p. 235–239, rugpj. 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.06.032.
- [188] T. Wenzl ir E. P. Lankmayr, „Effect of the water content of cardboard on the static headspace extraction of volatile aldehydes“, *J. Sep. Science*, t. 24, nr. 10–11, p. 885–888, lapkr. 2001, doi: 10.1002/1615-9314(20011101)24:10/11<885::AID-JSSC885>3.0.CO;2-M.
- [189] A. Sanches-Silva, J. Lopez-Hernández, ir P. Paseiro-Losada, „Profiling flavor compounds of potato crisps during storage using solid-phase microextraction“, *Journal of Chromatography A*, t. 1064, nr. 2, p. 239–245, vas. 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2004.05.108.
- [190] N. Kim, K. S. Yu, J. Kim, T. Lim, ir K. T. Hwang, „Chemical characteristics of potato chips fried in repeatedly used oils“, *Food*

- Measure*, t. 12, nr. 3, p. 1863–1871, rugs. 2018, doi: 10.1007/s11694-018-9800-x.
- [191] M. Moghimi ir A. Roosta, „Physical properties of aqueous mixtures of (choline chloride + glucose) deep eutectic solvents“, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, t. 129, p. 159–165, vas. 2019, doi: 10.1016/j.jct.2018.09.029.
- [192] Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, ir Y. H. Choi, „Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications“, *Food Chemistry*, t. 187, p. 14–19, lapkr. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.123.
- [193] L. Sanchez-Prado, C. Garcia-Jares, T. Dagnac, ir M. Llompart, „Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination“, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, t. 71, p. 119–143, rugs. 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.03.014.
- [194] F. Chemat ir G. Cravotto, Sud., *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds*. Boston, MA: Springer US, 2013. doi: 10.1007/978-1-4614-4830-3.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 12 egz.