

SPME při sledování („traceability“) potravinářských produktů. Případová studie: Olivový olej

➤ Pojem „TRACEABILITY“

- co je a k čemu slouží
- PDO, PGI, TSG logo

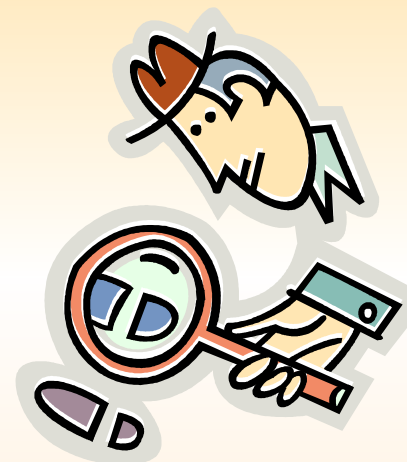
➤ Projekt TRACE

- hlavní cíle

➤ OLIVOVÝ OLEJ

- charakterizace – chemické složení
- faktory ovlivňující chemické složení
- chemické složení – prostředek pro rozlišení olejů?

➤ VLASTNÍ APLIKACE – HS-SPME olivových olejů



➤ TRACEABILITY = DOHLEDATELNOST

- co je a k čemu slouží

Potraviny – EU Směrnice EC/178/2002:

Schopnost zpětně dohledat původ a sledovat potraviny, krmiva a jejich složky ve všech krocích výroby, zpracování a distribuce.



„FROM THE FORK TO THE FARM“

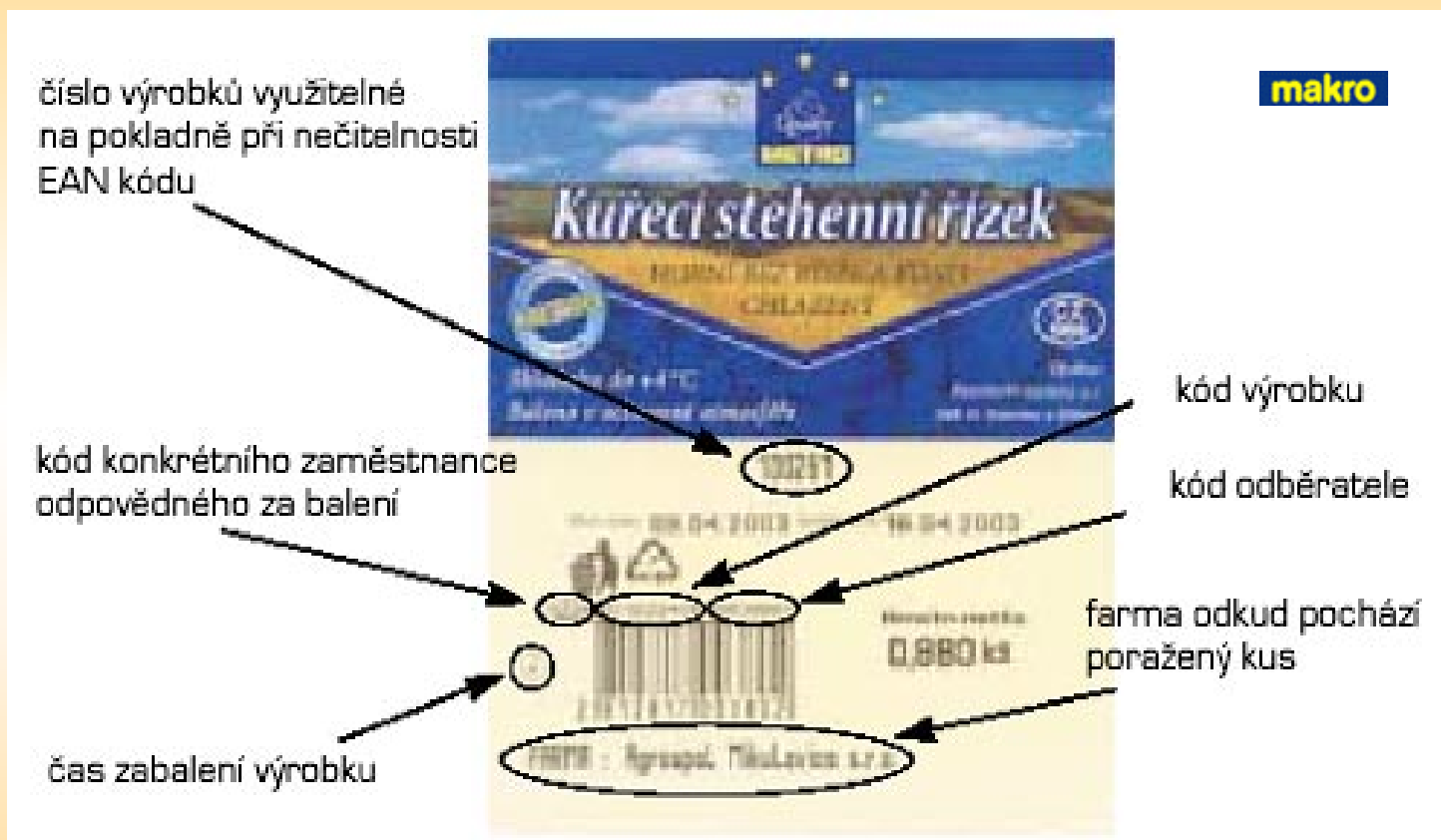


Informovanost **„one step back-one step forward“**

- určení původu závadných výrobků – rychlé odstranění z trhu
- ochrana před zneužitím značek a falšováním výrobků
- poskytnutí informací o specifickém charakteru výrobku spotřebiteli

➤ TRACEABILITY = DOHLEDATELNOST

- co je a k čemu slouží



EDI – elektronická výměna dat (Electronic Data Interchange)

➤ TRACEABILITY = DOHLEDATELNOST

- PDO, PGI, TSG logo

„LOCAL FOODS“ – rok 1992 - EU „loga kvality“

(<http://europa.eu.int/comm/agriculture/qual/en/pgi-11en.htm>)



- **PDO (Protected Designation of Origin)** – potraviny vyráběné, zpracováváné a připravované na daném území daným know-how



- **PGI (Protected Geographical Indication)** – svázáno s územím alespoň v jedné z fází výroba-zpracování-příprava (**Budějovické pivo, Budějovický měšťanský var, Českobudějovické pivo**).



- **TSG (Traditional Speciality Guaranteed)** – neodkazuje na původ, ale zdůrazňuje tradiční charakter buď složení výrobku nebo způsobu výroby

➤ Projekt TRACE

- hlavní cíle



‘TRACING FOOD COMMODITIES IN EUROPE’

(5 let, koordinátor P. Brereton CSL (UK), 13 WP)

- poskytnutí konzumentům kompletních dat o potravinách
- vývoj analytických metod umožňujících určení a ověření původu potravin - **‘fingerprinting a profiling’ metody (NMR, NIR spektroskopie, SPME/GC)**
- zaměření na minerální vody, cereálie, med, **olivový olej**, maso, drůbež a další



➤ OLIVOVÝ OLEJ

- charakterizace – chemické složení

Olivovník evropský (Olea europea L.)

Standard EEC 2568 (1991):

Senzorický test (vzhled, aroma, chuť)

Chemická analýza



- **Majoritní složky (95%)** – triglyceridy, mastné kyseliny (> 70% mononenasyčené, cca 10% polynenas., cca 14% nasycené) estery MK
- **Minoritní složky (5 %)** - tokoferoly (vitamin E), fenoly, steroly, flavonoidy, **těkavé sloučeniny - složky aroma**

➤ OLIVOVÝ OLEJ

- charakterizace – chemické složení

TĚKAVÉ SLOUČENINY – SLOŽKY AROMA přímé metabolity MK a AK

C₆ a C₅ těkavé sloučeniny – „zelená vůně“

- aldehydy (pentanal, hexanal, (E)-2-hexenal)
- alkoholy (ethanol, hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, (E)-2-hexen-1-ol)
- estery (hexylacetát)
- alifatické a aromatické uhlovodíky (hexan)
- ketony (3-pentanon)
- kyseliny (octová, hexanová)

Vznik „Lipoxygenázovou cestou“ (LOX cesta)



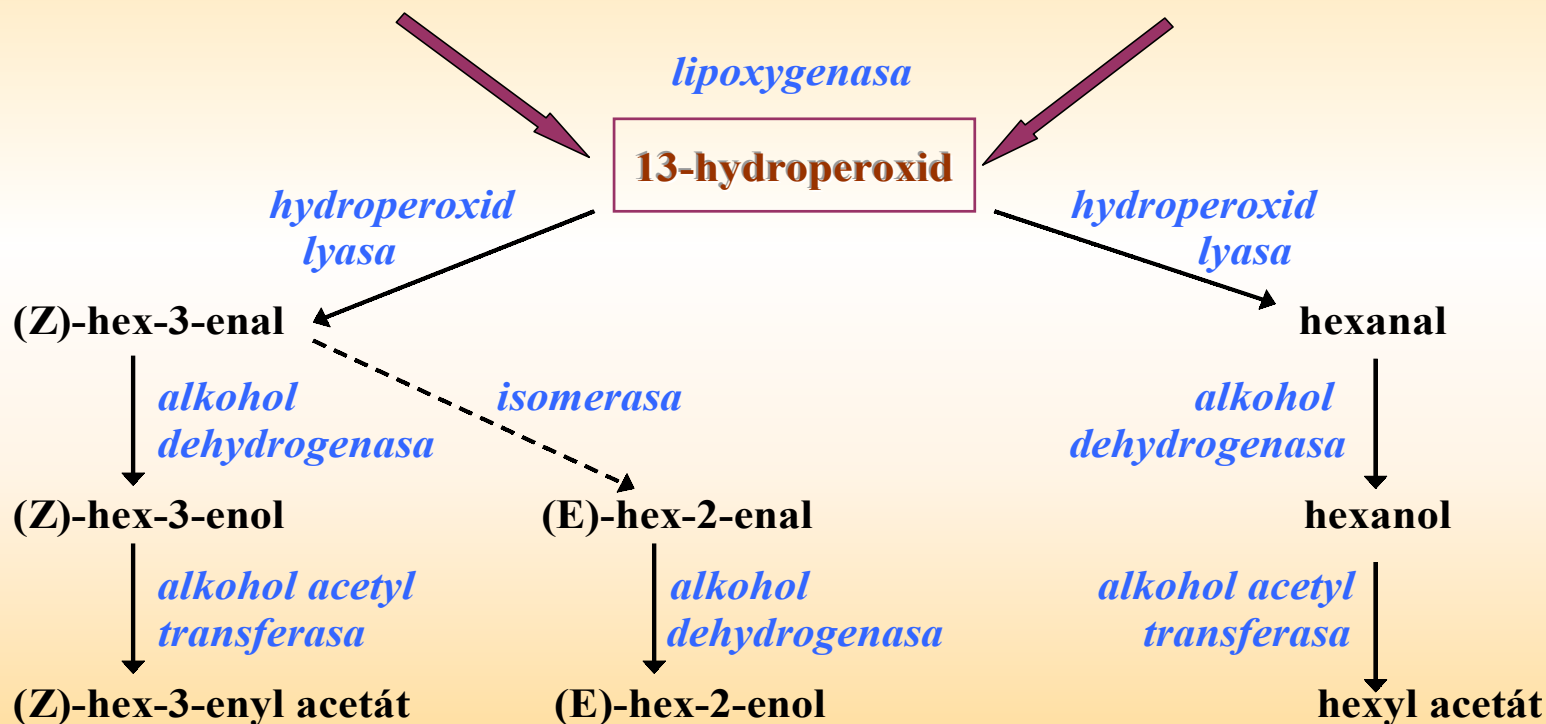
➤ OLIVOVÝ OLEJ

- charakterizace – chemické složení

„Lipoxygenázová cesta“ (LOX)

LINOLENOVÁ KYSELINA

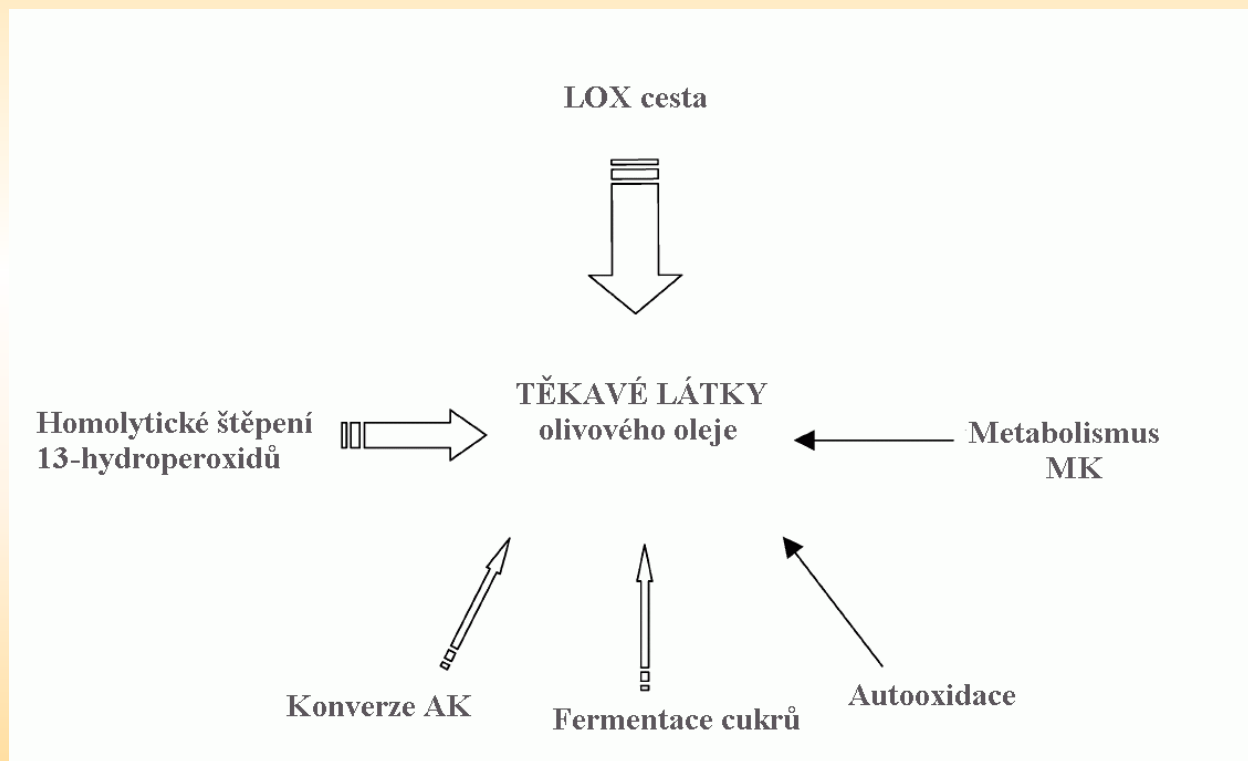
LINOLOVÁ KYSELINA



➤ OLIVOVÝ OLEJ

- charakterizace – chemické složení

Další cesty vzniku těkavých sloučenin



F. Angerosa a kol.: J.Chromat. A, 1054 (2004) 17-31



➤ OLIVOVÝ OLEJ

- faktory ovlivňující chemické složení
-

1. Agronomické a klimatické vlivy

zdraví a zralost plodů, kultivar, klimatické podmínky (srážky, teplota), oblast původu

2. Technologické vlivy

technika sběru (ruční/mechanické trhání, sběr), skladování, mytí, drcení, homogenizace, separace (přídavek horké vody), skladování



OBSAH PREKURZORŮ, ENZYMŮ A JEJICH AKTIVITA



➤ OLIVOVÝ OLEJ

- chemické složení – prostředek pro rozlišení olejů?

1. Těkavé sloučeniny - spíše kvantitativní rozdíly

(E)-hex-2-enal, (E)-hex-2-enol (Z)-hex-3-enol, hexanal, hexanol, nonanal, hexyl acetát a další estery, α -pinen, β -ocimen, farnesen, ethylbenzen, ethyl furan, 2-methyl-4-pentenal

dynamický HS, destilace s H₂O parou, SPME–GC



2. n-alkany – hl. lichý počet C (C₂₉, C₂₅, C₂₇, C₂₃)

Zralost – nemá vliv

Kultivar, rok sklizně – má vliv

on-line LC-GC/FID metoda, přímý nástřik oleje v pentanu

(O.Koprivnjak a kol.: Food Chem 90 (2005) 603-608)

➤ Vlastní aplikace - HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

• CÍLE A PROVEDENÉ EXPERIMENTY

1. Optimalizace SPME metody pro analýzu těkavých sloučenin olivového oleje

- vlákno, inkubace, extrakční doba a teplota

2. HS-SPME / GC-ITD analýza olejů různého původu

- Výběr vhodných sloučenin pro porovnávání olejů
-
- *Statistické zpracování získaných dat*
 - *Vytipování vhodných markerů pro rozlišení olejů dle původu*

3. HS-SPME / GCxGC-TOF analýza olejů různého původu

- *Identifikace markerů*
 - *Statistické zpracování získaných dat*
-

4. Rozlišení olejů na základě analýzy těkavých sloučenin



➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

1. OPTIMALIZACE SPME

- **VZOREK:** 2 g olivového oleje v 10 ml HS lahvičce
- **SPME:** CombiPal (CTC)
 - PDMS 100, PDMS/DVB 65, **PDMS/CX/DVB 30/50**, CWX/DVB 65
 - inkubace **5**, 10, 20, 30 min
 - extrakční doba 5, 10, **15**, 20, 30, 40, 50, 60 min
 - extrakční teplota 30, **40**, 50, 70 °C
 - desorpce 1 min při 250 °C
- **GC/ITD:** Trace GC 2000, MSD Polaris Q
 - kolona: HP-INNOWAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)
 - detekce: Segment Scan (m/z 35 – 650)

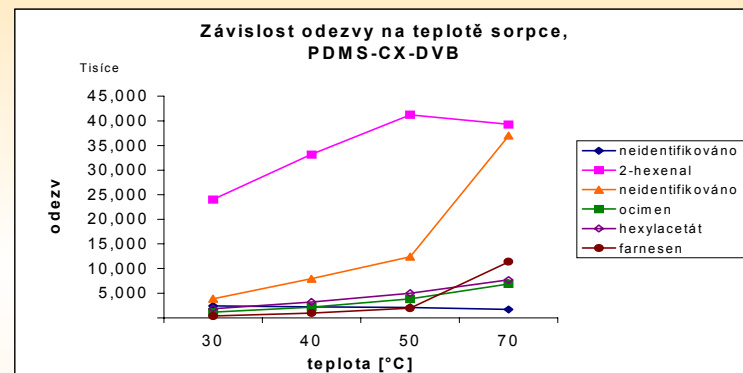
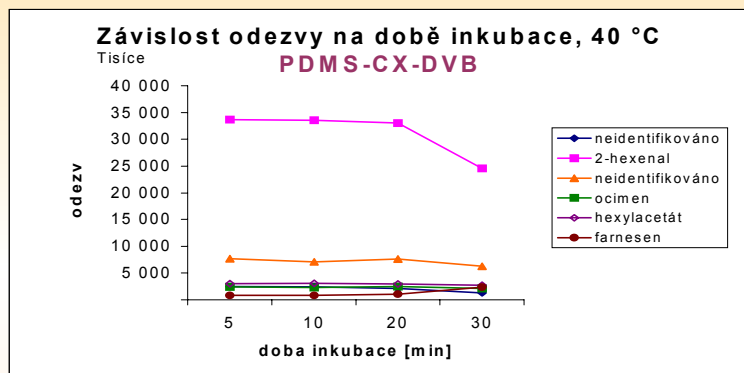


➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

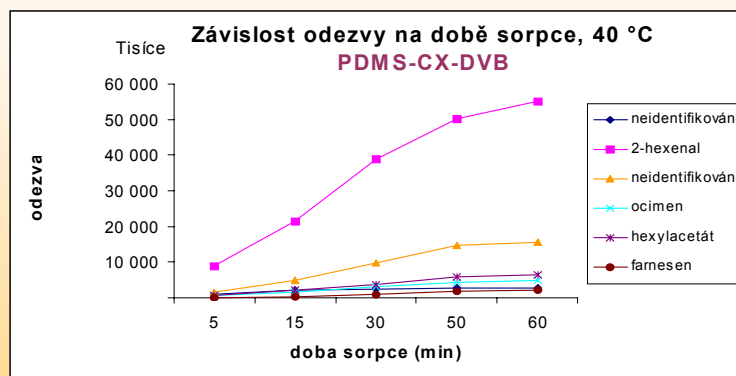
1. OPTIMALIZACE SPME – vlákno PDMS/CX/DVB

INKUBACE 5 min

TEPLOTA SORPCE 40 °C



DOBA SORPCE 15 min



RSD < 10%
(n = 6)



➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

2. HS-SPME / GC-ITD analýza olejů různého původu

DODANÉ VZORKY OLIVOVÉHO OLEJE

- **316 vzorků** extra panenského či PDO olivového oleje

- **různé země původu**
(Itálie, Francie, Řecko, Turecko, Španělsko)



- **různé kultivary**

(Picual, Picudo, Morisca, Arbequino, Hojiblanca, Empeltre, Cornicabra, Serra de Espadan, Lechin, Carboncella, Raja, Frantoio, Leccino, Moraiolo, Pendolino, Coratina, Paesana Bianca, Paesana Nera, Aurina, Olivastro, Rosicola, Gentile di Larino, Paranzana,...)

➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

2. HS-SPME / GC-ITD analýza olejů různého původu

VÝBĚR VHODNÝCH SLOUČENIN PRO POROVNÁVÁNÍ OLEJŮ

number of peak	05050036	05050037	05050038	05050039	05050040	05050041	05050042	05050043	05050044	05050045	05050046
1	314 835	146 312	260 974	202 560		1 051 486	174 894	284 336	188 424	148 594	
2	658 208 201	582 169 590	688 374 631	608 733 048	2 517 411	4 349 751	686 974 440	695 291 949	726 688 146	762 511 616	2 808 424
3											3 328 518
4	3 150 437	2 146 477	1 945 341	1 343 979	4 101 055	5 767 705	2 986 183	6 146 444	218 774	344 681	3 796 862
5	5 577 448	4 034 331	3 793 848	5 620 867	6 368 531	4 812 675	6 448 136	5 746 265	6 874 909	5 700 335	4 702 025
6	2 454 762	2 217 085	3 399 064	2 020 718	3 564 524	5 426 965	2 696 514	3 262 798	1 463 501	641 261	3 501 651
7	1 683 727	1 512 010	2 425 557	1 361 964	305 249	1 511 373	1 883 151	1 210 887	1 901 092	2 501 837	4 70 642
8	638 530	509 757	346 883	756 424	2 281 024	2 604 383	689 495	682 445	469 863	539 290	1 098 928
9	5 345 514	3 730 458	5 649 679	4 737 786	5 585 958	4 825 921	5 142 922	4 664 663	6 516 379	6 111 739	4 752 072
10	1 114 752	1 338 452	1 069 365	1 695 348	3 786 366	3 252 122	2 60 566	2 054 670	4 358 793	1 958 604	3 394 831
11	1 964 870	1 236 558	2 557 374	2 153 461	4 157 063	7 169 411	4 027 828	5 787 388	713 790	942 508	2 633 577
12	218 735	170 326	255 632				347 245		225 845	175 502	
13	432 284	317 520	268 289	495 275	1 204 390	872 228	412 227	529 513	349 357	235 249	848 065
14	2 447 419	2 227 045	1 522 734	2 707 374	10 287 484	5 952 982	1 585 088	2 640 846	1 647 238	1 791 715	8 733 361
15	9 317	88 511	15 599	129 833	2 158 884	279 691	53 852	121 149	148 241	114 394	207 503
16											
17				509 056	704 008				476 087	478 829	469 340
18	420 140	565 662	394 772	439 421	798 821	795 494	269 830	683 540	347 606	440 683	462 454
19	1 098 680	710 519	521 800	738 877	2 327 606	2 271 023	952 566	697 824	922 186	902 624	1 688 787
20											
21											
22	86 946			35 839	79 441			314 514			
23	724 919	794 443	515 260	591 064	908 611	663 675	238 810	793 544	620 543	745 894	498 212
24	84 054 383	86 988 409	48 820 673	79 196 605	148 719 880	121 176 430	30 593 334	96 261 496	65 153 969	76 986 933	91 509 784
25											
26	163 112	84 318	214 052	239 622	295 779	210 797	88 425	202 893	137 952	47 347	342 291
27	637 105	160 214	657 270	527 230	1 156 945	802 697	311 738	662 357	374 608	477 172	585 340
28	153 096	77 487	145 030	120 499	169 273	160 532	86 533	148 385	91 403	117 956	136 575
29							69 407	62 113			251 474
30							80 512	123 302	152 124	78 531	188 933
31	78 490	62 407	97 097	151 180	137 049	79 079	67 093	60 544	74 156	76 369	308 996
32	332 334	436 126	516 764	715 684	425 049	700 961	124 585	509 417	1 071 168	578 199	333 649
33	835 567	546 164	653 538	987 260	1 992 074	1 448 718	668 737	801 974	775 124	678 123	2 134 288
34	116 779	125 855	459 887	197 190	265 802	254 760		112 640	91 718	95 591	201 176
35	2 131 959	1 775 584	955 445	1 886 266	3 190 701	2 569 665	3 108 252	1 418 066	976 633	1 009 649	1 572 698
36	1 274 440	773 719	1 524 630	1 346 362	1 991 973	1 912 897	1 743 860	1 178 995	852 346	1 125 470	2 142 548
37	170 783	104 101	241 626	222 551	294 292	234 042	206 197	174 263	128 470	127 699	267 399
38	325 140	315 624	190 329	316 490	557 289	434 282	75 094	367 846	285 887	340 360	311 193
39	5 096 615	3 494 076	3 040 614	4 003 961	5 221 376	6 805 258	4 839 868	3 398 409	1 703 914	2 901 244	2 247 175
40	1 221 425	1 633 867	1 035 275	3 900 239	3 175 706	1 489 716	39 077	1 360 133	1 023 739	1 949 887	2 410 605
41	120 523	71 265	117 594	123 986	102 442	102 442		112 772	73 479	46 502	
42	1 582 723	38 549	1 551 201	1 582 611	2 046 816	1 629 619	1 796 696	1 530 812	1 791 706	1 722 160	1 391 289
43	219 243	114 011	191 880	276 098	387 756	234 842	490 454	227 193	141 617	81 726	549 621
44	155 032	131 675	171 663	209 736	168 105	155 761	123 529	177 528	149 232	80 411	133 056
45	31 191	32 459	40 107	49 749			49 913	41 605			52 006
46	12 148 375	11 880 548	9 967 338	11 245 310	11 259 037	10 736 335	10 023 271	11 333 532	10 298 854	10 145 587	9 453 431

**DĚTEKOVÁNO AŽÍ 130 SLOUČENIN
VÝBĚR ZUŽEN NA 46**



➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

2. HS-SPME / GC-ITD analýza olejů různého původu

STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT

- **CÍL:** nalezení charakteristického chromatografického vzoru ('fingerprint') u olejů různého původu, umožňujícího zpětné určení původu neznámého oleje
- **PROMĚNNÉ:** země původu, producentská oblast, kultivar, detekované sloučeniny
- **NÁSTROJE: TRACE WP 6 :** *"...the specifications will be statistical in nature and it will be difficult to present them in a way that non-specialists can understand."*

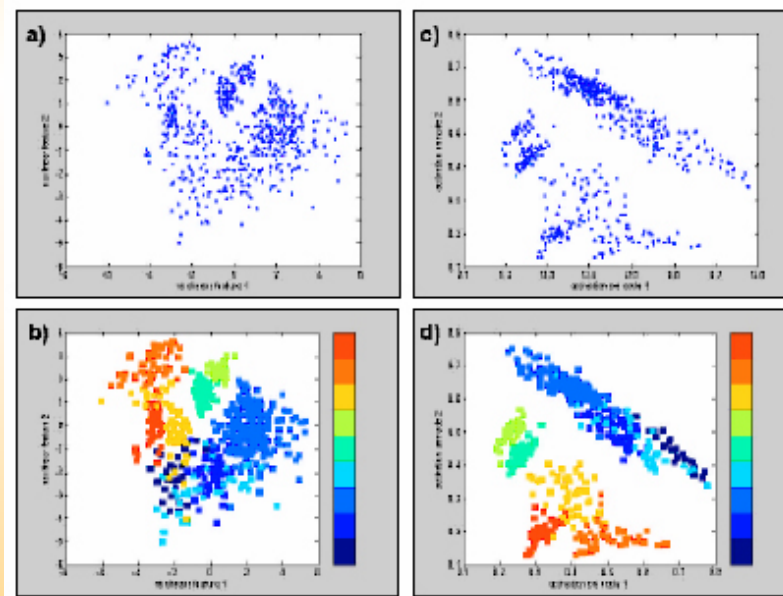
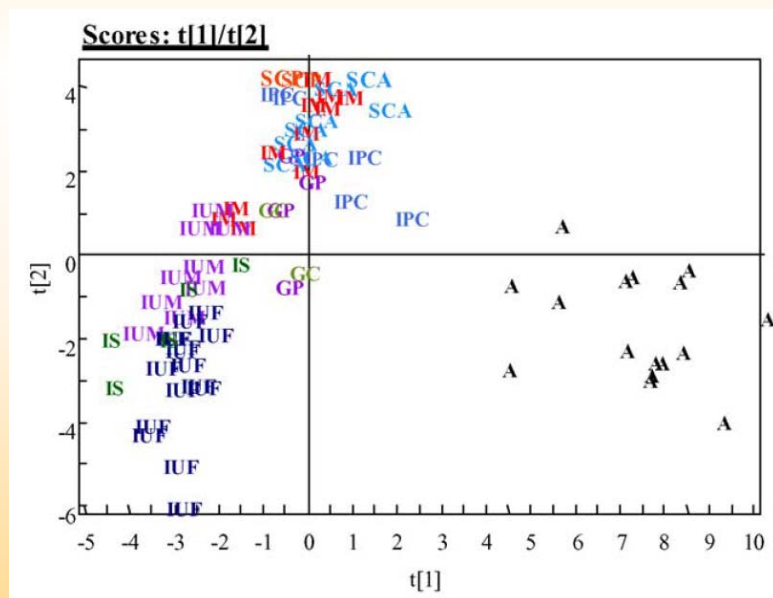


➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

2. HS-SPME / GC-ITD analýza olejů různého původu

STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÍCEROZMĚRNÝCH DAT

- PCA – analýza hlavních komponent
- Postupná lineární diskriminační analýza
- atd.



➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ



2. HS-SPME / GC-ITD analýza olejů různého původu

ILUSTRACE NAMĚŘENÝCH DAT

SROVNÁNÍ 4 OLEJŮ – Itálie, PDO Sabina Italia

MĚSTO **NEROLA**

Oblast Lazio RM



05050046: kultivary
Raja, Carbonella, Leccino

05050047: kultivary
neznámé

MĚSTO **FARA SABINA**

Oblast Lazio RI

05050039: kultivary
Carbonella, Raja, Leccino

05050038: kultivary
Carbonella, Raja, Frantorio

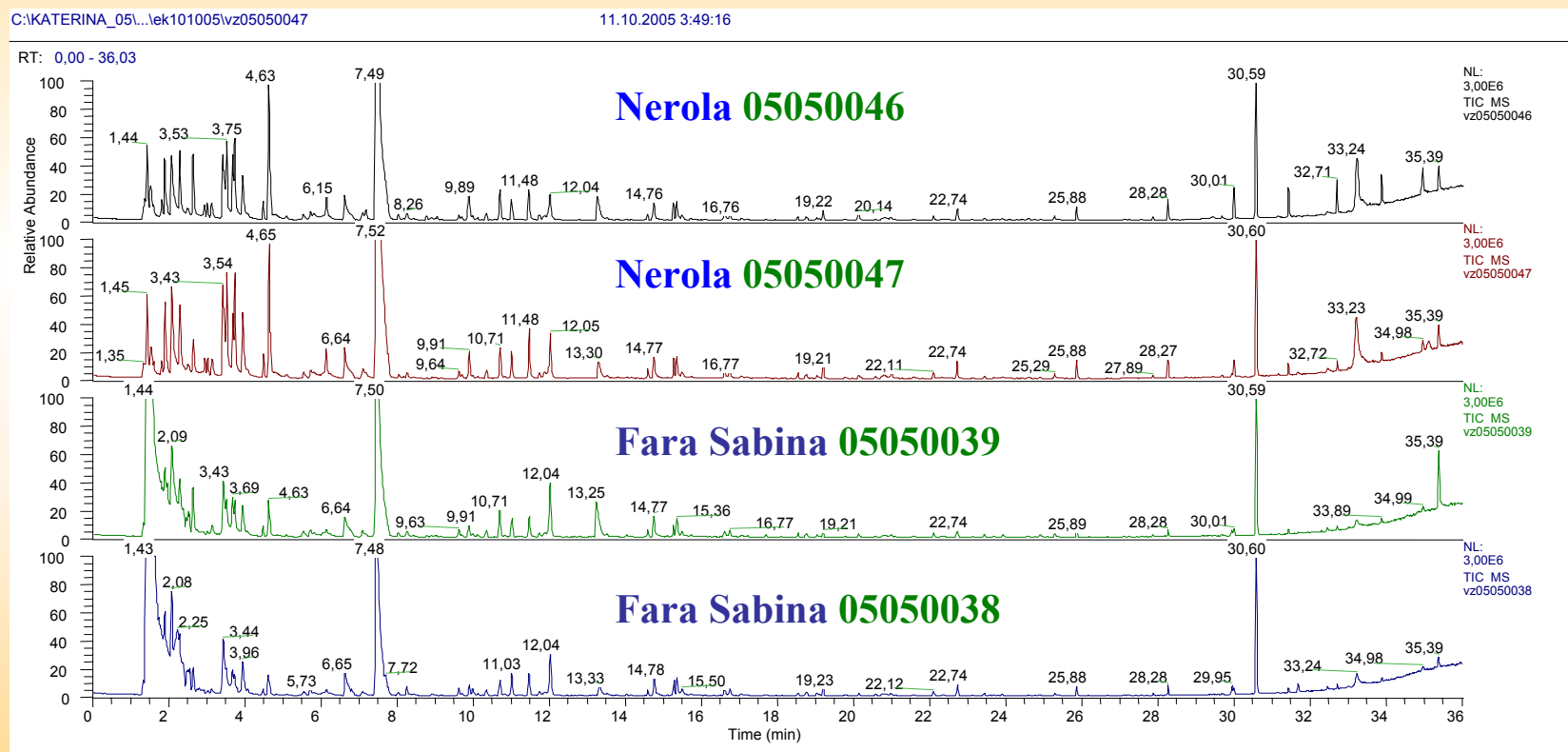


➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ



2. HS-SPME / GC-ITD analýza olejů různého původu

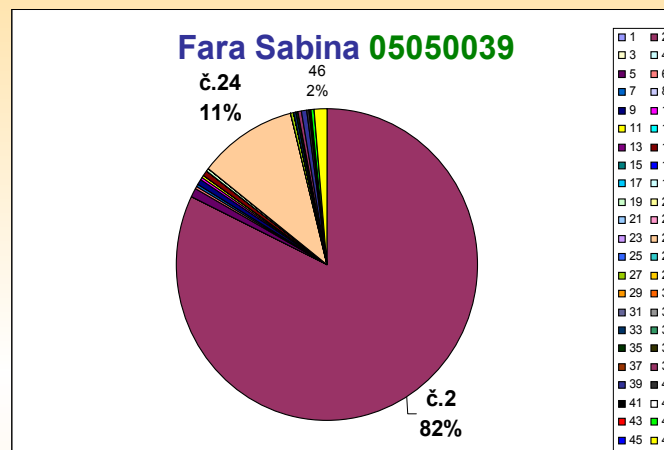
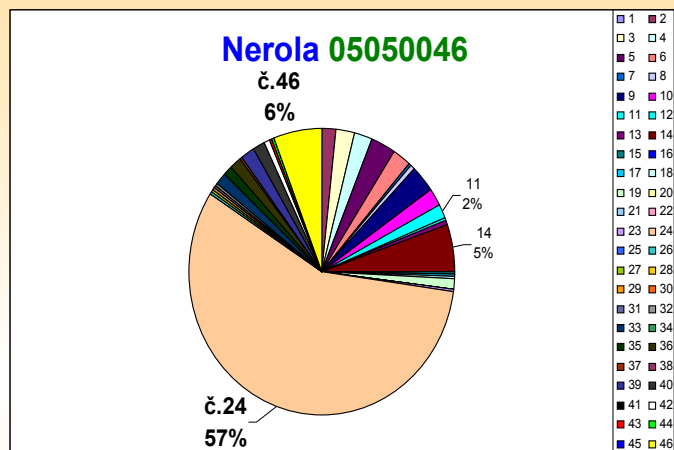
ILUSTRACE NAMĚŘENÝCH DAT: SROVNÁNÍ 4 OLEJŮ



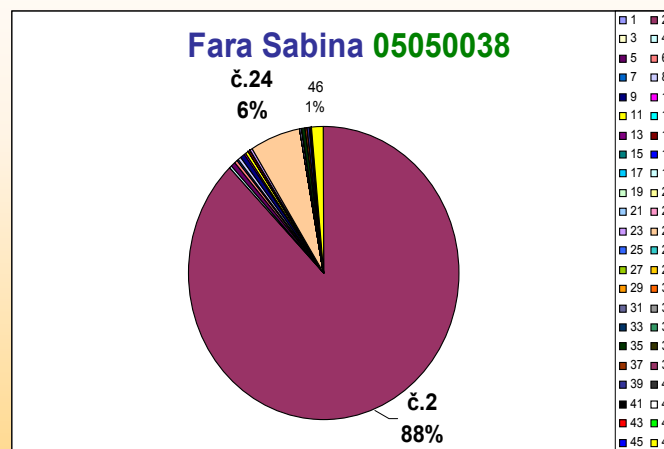
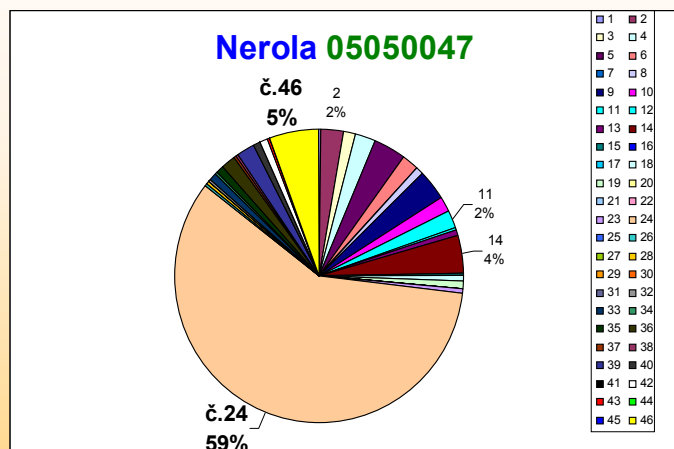
➤ HS-SPME / GC-ITD OLIVOVÝCH OLEJŮ



ILUSTRACE NAMĚŘENÝCH DAT: SROVNÁNÍ 4 OLEJŮ



stejně
↔
kultivary



2= triptan
24= 2-hexenal
46= DEP



➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

3. HS-SPME / GC(xGC) -TOF analýza

Extra virgin olej Monini

- vlákno PDMS/DVB
- GC HP 6890, Agilent
- MSD Pegasus 4D, LECO Instr.



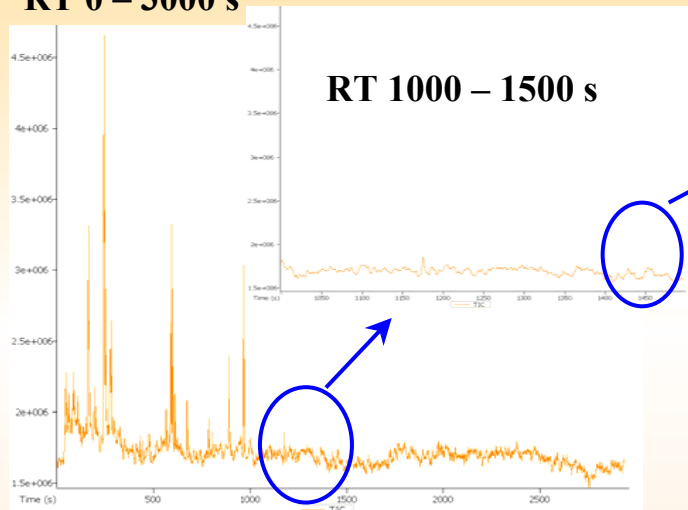
kolona 1: **DB-5** (10 m x 0,18 mm x 0,18 μ m)

kolona 2: **BPX-50** (1 m x 0,1 mm x 0,1 μ m)

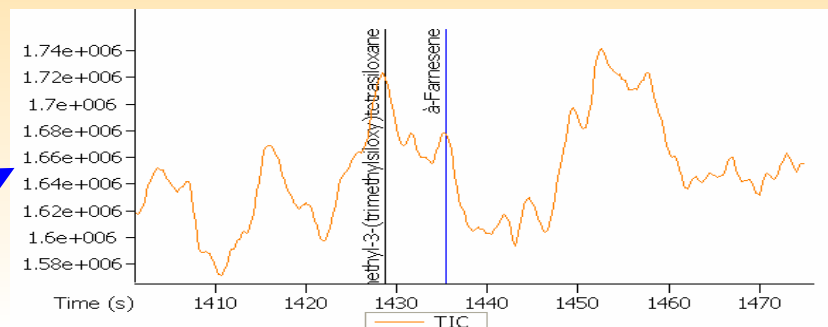
➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

3. HS-SPME / GC -TOF analýza: Extra virgin olej Monini

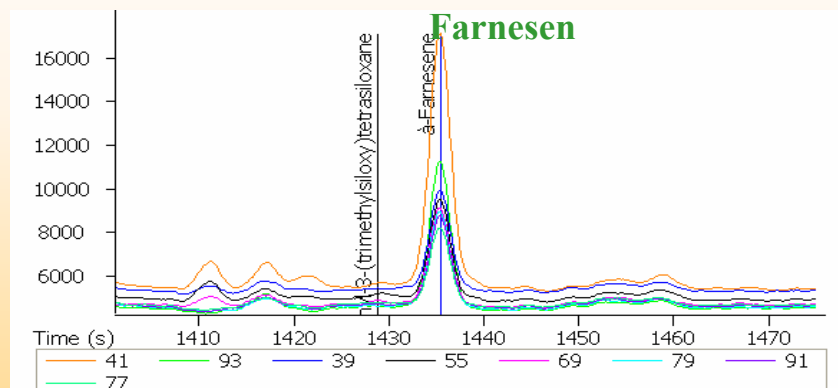
RT 0 – 3000 s



RT 1400 – 1480 s : TIC



RT 1400 – 1480 s : DEKONVOLUCE



**POČET DETEKOVANÝCH
SLOUČENIN:**

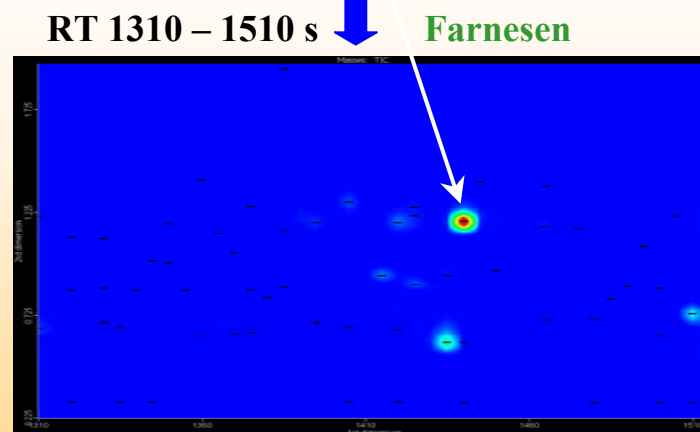
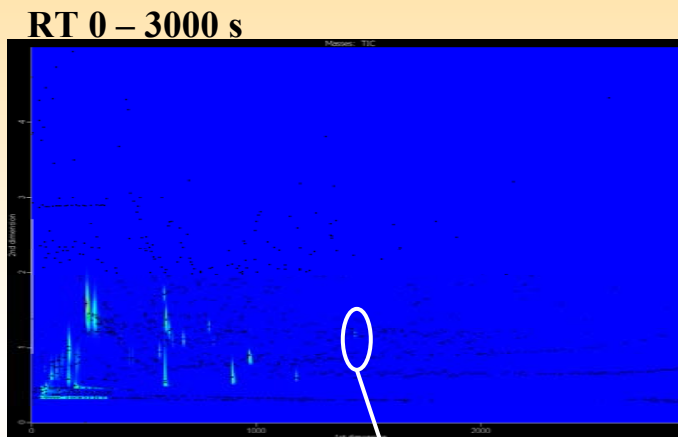
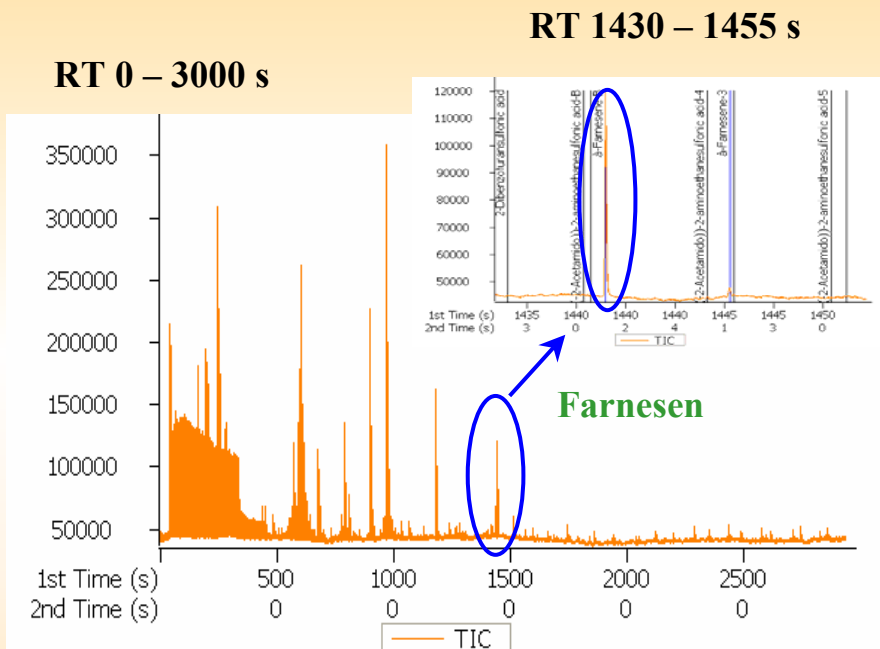
S/N 200 : 61

S/N 10 : 328 (132 unknowns)



➤ HS-SPME OLIVOVÝCH OLEJŮ

3. HS-SPME / GCxGC -TOF analýza: Extra virgin olej Monini



ZÁVĚRY:

- **HS-SPME** – účinný nástroj pro analýzu těkavých sloučenin olivového oleje
- **GC(xGC)-TOF** – slibný identifikační potenciál
- **Rozlišení původu olivových olejů na základě analýzy těkavých sloučenin** je pravděpodobně možné



Děkuji za pozornost



VŠCHT
V PRAZE

SPME A GC NOVÉ PERSPEKTIVY PRO APLIKACE, 19.1. 2006

Katerina.Holadova@vscht.cz



SIGMA-ALDRICH