

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

DIPLOMSKO DELO

Nina Zupan

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Določanje tokoferolov v oljih s HPLC

DIPLOMSKO DELO

VISOKOŠOLSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Nina Zupan

MENTOR: prof. dr. Helena Prosen

DELOVNI MENTOR: Maja Križan, univ. dipl. kem.

Ljubljana, 2019

IZJAVA O AVTORSTVU

diplomskega dela

Spodaj podpisana Nina Zupan sem avtorica diplomskega dela z naslovom: *Določanje tokoferolov v oljih s HPLC*.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je diplomsko delo izključno rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela pod mentorstvom prof. dr. Helene Prosen in delovnim mentorstvom Maje Križan, univ. dipl. kem.;
- sem poskrbela, da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem diplomskem delu, navedena oziroma citirana v skladu z navodili;
- se zavedam, da je plagiatorstvo, v katerem so tuje misli oziroma ideje predstavljene kot moje lastne, kaznivo po zakonu (Zakon o avtorski in sorodnih pravicah – uradno prečiščeno besedilo (ZASP-UPB3) (Ur. list RS, št. 16/2007));
- sem poskrbela za slovnično in oblikovno korektnost diplomskega dela;
- je elektronska oblika diplomskega dela identična tiskani obliki diplomskega dela.

V Ljubljani, 20.06.2019

Podpis avtorice:

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici Heleni Prosen in delovni mentorici Maji Križan za strokovno vodenje, nasvete in pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se možu Gregorju, hčerki Sari ter sinu Aljažu za vso podporo, potrpežljivost, odrekanje in razumevanje, ki so mi jih izkazali v času študija.

Zahvala tudi mojim bližnjim, ki so me spodbujali in mi omogočili študij ob delu.

Hvala tudi mojim sošolcem (Urški, Blažu B., Blažu J. in Goranu) za spodbujanje, zapiske in pomoč pri učenju.

Zahvaljujem se tudi sodelavkam in sodelavcem iz Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano, za razumevanje in pomoč pri izvajanju analiz.

Če želimo uspeli, moramo najprej sploh verjeti, da lahko uspemo (Michael Korda).

Določanje tokoferolov v oljih s HPLC

Povzetek: Vitamin E se sintetizira in shranjuje v listih in semenih rastlin. Sestavljen je iz štirih oblik tokoferolov (α -, β -, γ -, δ -tokoferol) in štirih oblik tokotrienolov (α -, β -, γ -, δ -tokotrienol). Glavni vir vitamina E so rastlinska olja. V sklopu diplomskega dela smo naredili validacijo analizne metode za določanje tokoferolov v rastlinskih oljih. Vzorec olja smo raztopili v heksanu, nato ga redčili v metanolu, ga dali na mešalnik za epruvete, centrifugirali in filtrirali skozi 0,45 μm filter. Za analizo smo uporabili RP-HPLC in kolono C_{18} , ki pa ne omogoča ločitve vseh štirih tokoferolov. Alfa in delta tokoferol sta bila določena posamično, beta in gama tokoferol pa kot vsota obeh. Skozi validacijo smo določili mejo zaznave, mejo določljivosti, linearnost metode, delovno območje metode, pravilnost metode, ponovljivost metode, obnovljivost metode ter robustnost metode. Ocenili smo merilno negotovost z analizo certificiranega referenčnega materiala. Analizirali smo vsebnosti tokoferolov v šestnajstih različnih rastlinskih oljih. Opravili smo tudi analizo več vzorcev sončničnih olj, oljčnih olj in bučnih olj ter primerjali vsebnosti tokoferolov v enakih matricah.

Ključne besede: tokoferoli, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, validacija analizne metode

Determination of tocopherols in oils by HPLC

Abstract: Vitamin E is synthesized and stored in leaves and plant seeds. It consists of four forms of tocopherols (α -, β -, γ -, δ -tocopherol) and four forms of tocotrienols (α -, β -, γ -, δ -tocotrienol). The main source of vitamin E are vegetable oils. As part of the diploma thesis we have validated the analytical method for the determination of tocopherols in vegetable oils. The sample of the oil was dissolved in hexane, then diluted in methanol, placed on a tube mixer, centrifuged and filtered through a 0.45 μm filter. For the analysis, RP-HPLC and the C_{18} column were used, which did not enable the separation of all four tocopherols. Alpha and delta tocopherol were determined individually, beta and gamma tocopherol as the sum of both. Through validation we determined the limit of detection, the limit of determination, the linearity of the method, the working range of the method, the accuracy of the method, the repeatability of the method, the method's reproducibility and the robustness of the method. We determined the measurement uncertainty by analyzing the certified reference material. We analyzed the contents of tocopherols in sixteen different vegetable oils. We also analyzed several samples of sunflower oils, olive oils and pumpkin oils, and compared the levels of tocopherols in the same matrices.

Keywords: tocopherols, high performance liquid chromatography, validation of the analytical method

Kazalo

1	Uvod	1
1.1	Vitamin E.....	1
1.2	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	3
1.3	Validacija analizne metode.....	5
1.3.1	Selektivnost in specifičnost metode.....	5
1.3.2	Meja zaznave (LOD).....	6
1.3.3	Meja določljivosti (LOQ).....	6
1.3.4	Delovno območje metode.....	7
1.3.5	Linearnost metode.....	7
1.3.6	Pravilnost metode.....	7
1.3.7	Natančnost metode.....	8
1.3.8	Robustnost metode.....	8
1.4	Merilna negotovost.....	8
1.4.1	Izračun merilne negotovosti iz CRM-ja.....	9
2	Namen dela	11
3	Eksperimentalni del	13
3.1	Oprema.....	13
3.2	Kemikalije in materiali.....	13
3.3	Priprava standardnih raztopin in vzorcev.....	14
3.3.1	Priprava osnovnih standardnih raztopin (OSR).....	14
3.3.2	Priprava kontrolnih vzorcev.....	14
3.3.3	Priprava standardnih raztopin za kalibracijo.....	15
3.3.4	Priprava vzorca.....	15
3.3.5	Priprava vzorca s standardnim dodatkom 10 mg/L.....	15
3.4	Kromatografski pogoji.....	16
4	Rezultati in razprava	17
4.1	Validacija analizne metode.....	18

4.1.1	Meja zaznave (LOD)	18
4.1.2	Meja določljivosti (LOQ)	19
4.1.3	Linearnost	20
4.1.4	Delovno območje metode	22
4.1.5	Pravilnost metode	23
4.1.6	Natančnost metode	30
4.1.7	Robustnost metode	32
4.2	Ocena merilne negotovosti	33
4.3	Primerjava olj	37
5	Sklepne ugotovitve	39
6	Literatura	40

Kazalo grafov

Graf 4.1: Umeritvena krivulja za alfa tokoferol	21
Graf 4.2: Umeritvena krivulja za beta+gama tokoferol.....	22
Graf 4.3: Umeritvena krivulja za delta tokoferol	22

Kazalo slik

Slika 1.1: Alfa tokoferol	1
Slika 1.2: Beta tokoferol.....	1
Slika 1.3: Gama tokoferol.....	2
Slika 1.4: Delta tokoferol	2
Slika 1.5: Tokotrienol	2
Slika 1.6: Sistem HPLC na katerem sem izvajala analize	4
Slika 3.1: Vzorci pred filtracijo	15
Slika 4.1: Kontrolni standard MIX 2	17
Slika 4.2: Kromatogram olja grozdnih pečk.....	17
Slika 4.3: Kromatogram sojinega olja	18
Slika 4.4: Kromatogram sojinega olja in sojinega olja s standardnim dodatkom	18

Kazalo tabel

Tabela 1.1: Sestava tokoferolov [2,3,4,5].....	1
Tabela 1.2: Okvirne vsebnosti vitamina E v oljih [7].....	3
Tabela 1.3: Minimalne zahteve za validacijo	5
Tabela 3.1: Koncentracije analitov na posameznih nivojih umeritvene krivulje	15
Tabela 4.1: Potrditev LOQ: α -tokoferol	19
Tabela 4.2: Potrditev LOQ: β + γ -tokoferol	19
Tabela 4.3: Potrditev LOQ: δ -tokoferol	19
Tabela 4.4: Podatki za umeritveno krivuljo za alfa tokoferol	20
Tabela 4.5: Podatki za umeritveno krivuljo za beta+gama tokoferol.....	20
Tabela 4.6: Podatki za umeritveno krivuljo za delta tokoferol.....	21
Tabela 4.7: Izkoristki metode glede na standardni dodatek (α -tokoferol).....	24
Tabela 4.8: Izkoristki metode glede na standardni dodatek (β + γ tokoferol).....	26
Tabela 4.9: Izkoristki metode glede na standardni dodatek (δ -tokoferol).....	28
Tabela 4.10: Analiza certificiranega referenčnega materiala	29
Tabela 4.11: Natančnost v krajšem časovnem obdobju – ponovljivost (α -tokoferol)....	30
Tabela 4.12: Natančnost v krajšem časovnem obdobju – ponovljivost (δ -tokoferol)....	30
Tabela 4.13: Natančnost v krajšem časovnem obdobju – ponovljivost (δ -tokoferol)....	32
Tabela 4.14: Natančnost v daljšem časovnem obdobju – obnovljivost (α -tokoferol)....	32
Tabela 4.15: Natančnost v daljšem časovnem obdobju – obnovljivost (β + γ -tokoferol) 32	
Tabela 4.16: Natančnost v daljšem časovnem obdobju – obnovljivost (δ -tokoferol)	33
Tabela 4.17: Določitev analitov v arašidovem olju pri spremenjenih pogojih analize ..	33
Tabela 4.18: Določitev analitov v sojinem olju pri spremenjenih pogojih analize	34
Tabela 4.19: Rezultati določitev za α -tokoferol	34
Tabela 4.20: Rezultati določitev za β + γ -tokoferol	35
Tabela 4.21: Rezultati določitev za δ -tokoferol	37
Tabela 4.22: Rezultati analize vzorcev sončničnih olj	37
Tabela 4.23: Rezultati analize vzorcev oljčnih olj	38
Tabela 4.24: Rezultati analize vzorcev bučnih olj.....	35

Seznam uporabljenih kratic in simbolov

C ₁₈	oznaka reverznofazne kolone
CRM	certificirani referenčni material (ang. <i>certified reference material</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IC	ionskoizmenjevalna kromatografija (ang. <i>ion-exchange chromatography</i>)
LOD	meja zaznave (ang. <i>limit of detection</i>)
LOQ	meja določljivosti (ang. <i>limit of quantification</i>)
MN	merilna negotovost (ang. <i>measurement uncertainty</i>)
NP	normalnofazna kromatografija (ang. <i>normal-phase chromatography</i>)
RP	reverznofazna kromatografija (ang. <i>reversed-phase chromatography</i>)
RSD	relativni standardni odmik (ang. <i>relative standard deviation</i>)
<i>s</i>	standardni odmik (ang. <i>standard deviation</i>)
SEC	velikostna izključitvena kromatografija (ang. <i>size-exclusion chromatography</i>)

1 Uvod

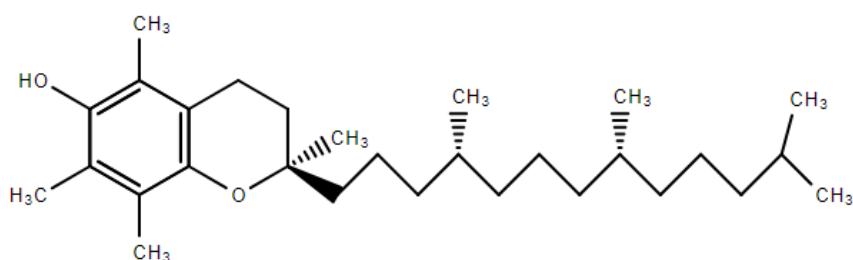
1.1 Vitamin E

Naravni vitamin E obstaja v osmih različnih oblikah, ki ga sestavljajo štiri oblike tokoferolov (α -, β -, γ -, δ -tokoferol) in štiri oblike tokotrienolov (α -, β -, γ -, δ -tokotrienol). Ti se razlikujejo po številu in poziciji metilnih skupin, prisotnih na 5- in 7-poziciji kromanolnega obroča. Vsi tokoli imajo 16-C stransko verigo, pritrjeno na kromanolni obroč, po kateri se ločijo tokoferoli od tokotrienolov. Tokotrienoli imajo v verigi tri dvojne vezi (slika 1.5) [1].

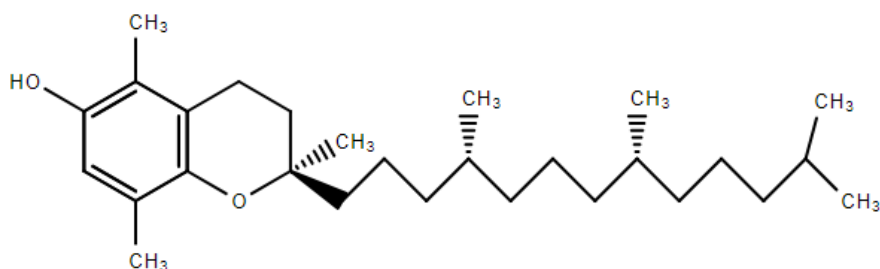
V tabeli 1.1 so prikazane molekulske formule, molekulske mase in CAS številke tokoferolov, molekulske strukture pa na slikah 1.1, 1.2, 1.3 in 1.4.

Tabela 1.1: Sestava tokoferolov [2,3,4,5]

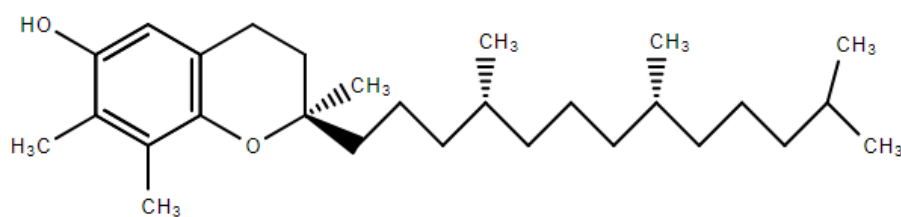
	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Molekulska formula	$C_{29}H_{50}O_2$	$C_{28}H_{48}O_2$	$C_{28}H_{48}O_2$	$C_{27}H_{46}O_2$
Molekulska masa	430,717 g/mol	416,69 g/mol	416,69 g/mol	402,663 g/mol
CAS številka	10191-41-0	148-03-8	54-28-4	119-13-1



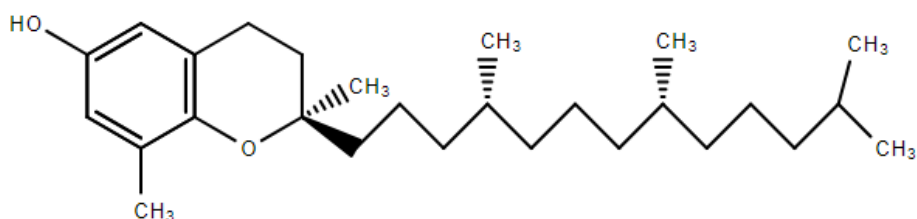
Slika 1.1: Alfa tokoferol



Slika 1.2: Beta tokoferol



Slika 1.3: Gama tokoferol



Slika 1.4: Delta tokoferol

α -tokotrienol: $R_1=CH_3$

$R_2=CH_3$

β -tokotrienol: $R_1=H$

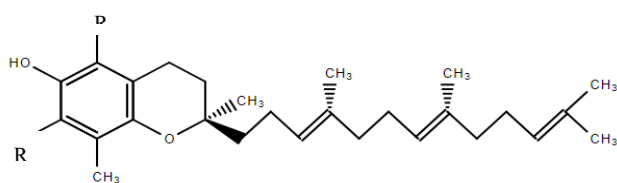
$R_2=CH_3$

γ -tokotrienol: $R_1=CH_3$

$R_2=H$

δ -tokotrienol: $R_1=H$

$R_2=H$



Slika 1.5: Tokotrienol

Vitamin E je v maščobah topni antioksidant. Hidroksilna skupina na kromanskem obroču sodeluje pri reakcijah z radikali z oddajo vodikovega atoma. Stranska veriga pa poveča hidrofobnost molekule in omogoča prehajanje skozi biološke membrane.

Naravni vir tokoferola se navaja s predpono d- ali RRR- (npr. d- α -tokoferol oz. RRR- α -tokoferol). Ta zajema en stereoizomer, ki ga najdemo v rastlinah. Tokoferol, pridobljen s sintezo, pa se navaja s predpono dl- ali all-rac- (npr. dl- α -tokoferol oz. all-rac- α -tokoferol). Ta zajema 8 stereoizomerov tokoferola v enakih razmerjih. IUPAC ime α -tokoferola je 3,4-dihidro-2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-2H-benzopiran-6-ol [6].

Vitamin E se nahaja v listih in semenih rastlin, kjer se sintetizira in shranjuje. Glavni vir so rastlinska olja, pri katerih pa se njegova vsebnost razlikuje. Vitamin E povečuje odpornost olj proti oksidaciji, kar podaljšuje čas uporabnosti olja. α -tokoferol je biološko najbolj aktivna oblika za naše telo. S prostimi radikali vstopa v reakcijo in jih nevtralizira. Pri zaščiti olj pa je najbolj pomembna oblika δ -tokoferol [7]. V tabeli 1.2 so navedene okvirne vsebnosti tokoferolov za olja, saj se le te v vzorcih razlikujejo.

Tabela 1.2: Okvirne vsebnosti vitamina E v oljih [7]

Sončnično olje	60-77 mg/100 g
Oljčno olje	12,07 mg/100 g (95 % je α -tokoferola)
Bučno olje	4 mg/100 g
Olje koruznih kalčkov	42 mg/100 g
Sezamovo olje	42,6 mg/100 g
Sojino olje	83-168 mg/100 g
Laneno olje	9 mg/100 g
Konopljinno olje	6,3 mg/100 g
Lešnikovo olje	28,3 mg/100 g
Olje pšeničnih kalčkov	257 mg/100 g

Vitamin E najdemo v vseh plasteh kože in je glavni lipofilni antioksidant v njej. Zaradi antioksidativnih učinkov ga uporabljamo v kozmetičnih izdelkih, saj spodbuja obnavljanje celic, pospešuje celjenje ran, zavira vnetja, zmanjšuje poškodbe kože zaradi ultravijoličnega sevanja in gladi površino kože [8].

Pravilnik o prehranskih dopolnilih določa pogoje, ki jih morajo izpolnjevati prehranska dopolnila, ki se dajejo v promet kot živila. V njem so navedena naslednje oblike vitamina E, ki se lahko uporabljajo za proizvodnjo prehranskih dopolnil: d- α -tokoferol, dl- α -tokoferol, d- α -tokoferil acetat, dl- α -tokoferil acetat in d- α -tokoferil kisli sukcinat.

Priporočen dnevni vnos vitamina E za odrasle je naslednji: najnižja priporočena dnevna količina vitamina E je 1,5 mg, najvišja dnevna količina vitamina E je 30 mg. Priporočen dnevni vnos je 10 mg [9].

1.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je široko uporabljena analizna metoda za analizo biomolekul, farmacevtskih učinkovin, polimerov in številnih organskih in anorganskih molekul. Pri HPLC uporabljamo kolono z majhnimi delci sorbenta, skozi katero s pomočjo črpalke črpamo mobilno fazo pri visokem tlaku. Prednosti HPLC so hitra in natančna kvantitativna analiza vzorcev, avtomatizacija z uporabo natančnih vzorčevalnikov.

Kromatografske tehnike glede na mehanizem ločevanja:

- Normalnofazna kromatografija (NP) temelji na adsorpciji/desorpciji analitov na polarni stacionarni fazi (silikagel ali aluminijev oksid). Za mobilno fazo se uporabljajo nepolarna topila (npr. heksan). Polarna stacionarna faza upočasnjuje potovanje polarnih komponent skozi kolono zaradi tvorbe močnih interakcij. NP kromatografijo uporabljamo za ločevanje nepolarnih komponent in izomerov ter za ločevanje kompleksnejših vzorcev po pripadajočih funkcionalnih skupinah.

- Reverznofazna kromatografija (RP) temelji na interakciji med nepolarno stacionarno fazo (silikati, modificirani z različnimi funkcionalnimi skupinami) in polarno mobilno fazo (mešanice metanola, acetonitrila z vodo). Polarni analiti se eluirajo iz kolone prvi, medtem ko nepolarni analiti močneje interagirajo s hidrofobno stacionarno fazo. V primerjavi z normalnofazno kromatografijo je tukaj obrnjen vrstni red elucije komponent[10].

Inštrument HPLC (Slika 1.6) je sestavljen iz različnih komponent: rezervoar mobilne faze, visokotlačna črpalka, injektor, kolona, detektor, izpis kromatograma.



Slika 1.6: Sistem HPLC, na katerem sem izvajala analize

HPLC črpalka mora biti sposobna generirati visoke tlake (500 bar), hkrati pa zagotavljati natančnost in točnost pri vsakem pretoku. Pretok mobilne faze se običajno giblje od 0,1 ml/min do 10 ml/min in mora biti brez pulziranja. Črpalka se mora hitro odzvati na spremembo sestave mobilne faze. Vzdrževanje in popravila morajo biti preprosta in enostavna za izvedbo.

Detektor mora zaznati spremembo, ko se analit eluira iz kolone. UV detektor je najpogosteje uporabljen detektor, je relativno neobčutljiv na temperaturno nihanje, ima široko linearno območje. Fluorescenčni detektor je zelo občutljiv in specifičen, z njim določimo snovi, ki fluorescirajo ali njihove derivate. Je do 1000x bolj občutljiv od UV detektorja.

Kolone so največkrat narejene iz nerjavečega jekla, saj morajo biti odporne na visoke tlake in korozivnost. Polnjene so z delčki, ki so prekriti s stacionarno fazo [11].

1.3 Validacija analizne metode

Validacija analizne metode je postopek, pri katerem ovrednotimo karakteristike analizne metode ter ugotovimo, ali je metoda primerna za določeno analizo aplikacijo. Z validacijo zagotovimo pravilnost in zanesljivost rezultatov. Oprema za validacijo mora biti ustrezno vzdrževana, preverjena/kalibrirana in mora ustrezati zahtevanim specifikacijam.

Zaželeno je, da si pred izvedbo validacije pripravimo plan dela in določimo zaporedje. Definiramo namen in obseg metode, parametre validacije, izvedbo meritev. Izvedemo vse predvidene meritve v okviru validacije, obdelamo in izračunamo podatke. Pripravimo poročilo o validaciji in ocenimo merilno negotovost.

Predvidena uporaba validirane metode nam služi za določanje obsega validacije, v tabeli 1.3 so navedene minimalne zahteve pri validaciji.

Tabela 1.3: Minimalne zahteve za validacijo

Obseg	Interna metoda	Metoda, povzeta po standardu	Modificirana metoda, povzeta po standardu
Selektivnost	X	-	(X) npr. sprememba detekcije
Delovno območje, linearnost	X	-	(X) npr. sprememba delovnega območja
Meja zaznave	X	X	X
Meja določljivosti	X	X	X
Pravilnost	X	X	X
Ponovljivost	X	X	X
Obnovljivost	X	X	X
Robustnost	X	-	-
Vpliv matrice	X	X	(X) npr. sprememba matrice
Merilna negotovost	X	X	X

1.3.1 Selektivnost in specifičnost metode

Selektivnost metode je zmožnost določevanja neke snovi v prisotnosti drugih sestavin vzorca. Če na določeno koncentracijo analita v vzorcu ne vpliva nobena druga komponenta iz tega vzorca, je metoda selektivna. Specifična metoda je tista metoda, ki je popolnoma selektivna.

1.3.2 Meja zaznave (LOD)

Meja zaznave (detekcije) je najmanjši signal, ki ga lahko zaznamo, vendar ga ne moremo kvantitativno ovrednotiti. Določimo jo tako, da analiziramo vsaj 6 paralelnih slepih raztopin (x_{sl}), izračunamo standardni odmik in LOD.

Izračun standardnega odmika (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad 1.1$$

x_i ... vrednost slepe raztopine

\bar{x} ... povprečna vrednost slepih raztopin

n ... število meritev

Izračun LOD:

$$X_{LOD} = \bar{x}_{sl} + 3 \cdot s_{sl} \quad 1.2$$

\bar{x}_{sl} ... povprečna vrednost slepih raztopin

s_{sl} ... standardni odmik slepih raztopin

Ko signal slepe raztopine ni zaznaven, naredimo vsaj 6 meritev slepega vzorca, ki smo mu dodali minimalno količino standarda (merjenega analita). Izračunamo standardni odmik in LOD.

Izračun LOD:

$$X_{LOD} = 3 \cdot s_{sl} \quad 1.3$$

1.3.3 Meja določljivosti (LOQ)

Meja določljivosti je najnižja koncentracija merjenega analita, ki jo še lahko določimo s sprejemljivo pravilnostjo in natančnostjo. Običajno je najnižja točka umeritvene krivulje.

Izračun lahko naredimo z enakimi zvezami kot za LOD, le da v izračunu faktor 3 zamenjamo za faktor 10.

Izračun LOQ:

$$\begin{aligned} X_{LOQ} &= \bar{x}_{sl} + 10 \cdot s_{sl} \\ X_{LOQ} &= 10 \cdot s_{sl} \end{aligned} \quad 1.4$$

1.3.4 Delovno območje metode

Določeno je s spodnjo in zgornjo koncentracijsko mejo, do katere lahko vsebnost analita v vzorcu določimo s sprejemljivo pravilnostjo in natančnostjo. Meja določljivosti (LOQ) je spodnja meja delovnega območja metode. Z odzivnostjo inštrumenta in vplivom redčenja pa je omejena zgornja meja delovnega območja. Z razredčevanjem vzorcev lahko razširimo delovno območje, vendar moramo to potrditi z določitvijo realnih vzorcev in zagotoviti ustrezno točnost (natančnost in pravilnost). Določimo ga z analizo raztopin in vzorcev različnih koncentracij.

1.3.5 Linearnost metode

Linearnost metode je interval, v katerem je signal linearno sorazmeren koncentraciji analita. Izmerimo signal slepe raztopine in vsaj 5 standardnih raztopin različnih koncentracij v celotnem delovnem območju in izračunamo regresijsko premico po metodi najmanjših kvadratov.

1.3.6 Pravilnost metode

Pove nam, koliko rezultat, določen z analizo metodo, odstopa od pravilne vrednosti. Določimo jo lahko z analizo ustreznega referenčnega materiala (RM) ali certificiranega referenčnega materiala (CRM). V primeru analize CRM-ja izračunamo povprečno vrednost 6-ih določitev in jo nato primerjamo s certificirano vrednostjo. Pomembno je, da se povprečna vrednost določitev nahaja znotraj intervala: certificirana vrednost \pm MN. Določimo jo tudi z analizo vzorcev s standardnim dodatkom in izračunom izkoristkov. Našo metodo lahko primerjamo z drugo akreditirano/validirano metodo, ki temelji na drugačnem principu določanja analita. Sodelujemo lahko v medlaboratorijskih primerjalnih testih.

Izračun izkoristka (η) CRM-ja:

$$\eta(\%) = \left(\frac{\bar{x}}{x_{CRM}} \right) \cdot 100 \quad 1.5$$

\bar{x} ...povprečna vrednost določitev CRM-ja

x_{CRM} ... certificirana vrednost CRM-ja

Izračuna izkoristka standardnega dodatka:

$$\eta(\%) = \left(\frac{c_{sd} - c_0}{c_{std}} \right) \cdot 100 \quad 1.6$$

c_{sd} ...koncentracija s standardnim dodatkom

c_0 ...koncentracija vzorca

c_{std} ...teoretična koncentracija dodanega standarda

1.3.7 Natančnost metode

Natančnost metode nam pove, koliko se ujemajo rezultati iz enega homogenega vzorca, analizirani pod enakimi pogoji. Je odvisna od koncentracije analita, zato jo moramo preveriti pri različnih koncentracijah in matricah.

Ponovljivost metode je natančnost, ki smo jo dobili iz določitev pri ponovljivih pogojih v krajšem časovnem obdobju. Izberemo si vsaj dva vzorca za vsako matrico. Enega na spodnjem delu delovnega območja in enega na zgornjem delu delovnega območja. V enem dnevu vsak vzorec analiziramo 6-krat. Izračunamo povprečno vrednost, standardni odmik in relativni standardni odmik.

Izračun relativnega standardnega odmika (RSD):

$$\text{RSD}(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \cdot 100\% \quad 1.7$$

Obnovljivost metode je natančnost, ki smo jo dobili iz določitev pri obnovljivih pogojih v daljšem časovnem obdobju. Določitev izvedemo 6-krat z istim vzorcem in metodo v daljšem časovnem obdobju. Izračunamo povprečno vrednost, standardni odmik in relativni standardni odmik.

1.3.8 Robustnost metode

Robustnost metode nam pove, koliko je metoda odporna na majhne spremembe pri izvajanju analize. Testiramo jo z namernim vnašanjem majhnih sprememb (sprememba pretoka, temperature, različni proizvajalci kemikalij...). Pri validacijah metod, povzetih po standardih, se robustnost ne testira, saj je bila že preverjena v okviru standardizacije metod [12,13].

1.4 Merilna negotovost

Merilna negotovost je parameter, ki je povezan z merilnim rezultatom in označuje raztros vrednosti, ki jih je mogoče upravičeno pripisati merjeni veličini. Za oceno merilne negotovosti rezultatov meritev lahko uporabimo različne pristope v skladu s Standardom SIST EN ISO/IEC 17025, ki obravnava merilno negotovost v poglavju 5.4.6. Pri oceni merilne negotovosti mora biti merjenec jasno definiran. Identificirati moramo možne izvore merilne negotovosti. Kvantificirati moramo komponente negotovosti. Ocena naključnih napak je komponenta negotovosti za obnovljivost znotraj laboratorija (u_{RW}). Ocena sistematičnih napak je komponenta negotovosti za odstopanje metode in laboratorija (u_b). Izračunati moramo kombinirano in razširjeno merilno negotovost. Kombinirana standardna negotovost (*combined standard uncertainty*, u_c) rezultata je standardni odmik, enak kvadratnemu korenu celotne variance, ki ga dobimo s kombinacijo vseh komponent negotovosti, ovrednotenih z upoštevanjem zakona o širjenju negotovosti (*law of propagation of uncertainty*). Razširjena negotovost

(*expanded uncertainty*, U) je interval, v katerem se nahaja rezultat z določeno stopnjo zaupanja. U dobimo z množenjem kombinirane standardne negotovosti s faktorjem pokritja k . Izbira faktorja k je odvisna od stopnje zaupanja (za stopnjo zaupanja 95 % je v primeru normalne porazdelitvene funkcije $k=2$) [14].

1.4.1 Izračun merilne negotovosti iz CRM-ja

Pri oceni komponente negotovosti, povezane z odstopanjem metode in laboratorija, upoštevamo odstopanje. To je razlika med povprečno izmerjeno vrednostjo in sprejeto referenčno vrednostjo. Upoštevamo tudi standardni odklon izmerjenih vrednosti CRM ter negotovost referenčne vrednosti.

Izračun komponente negotovosti:

$$u_b = \sqrt{b^2 + \left(\frac{C_{V,b}}{\sqrt{n_M}}\right)^2} + u_{C_{ref}}^2 \quad 1.8$$

b ...odstopanje, razlika med povprečno izmerjeno vrednostjo in sprejeto referenčno vrednostjo

$C_{V,b}$... standardni odklon izmerjenih vrednosti RM

n_M ... število meritev (za izračun odstopanja) na RM

$u_{C_{ref}}$... negotovost referenčne vrednosti

Izračun relativne kombinirane negotovosti ($u_{c,rel}$):

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{Rw,rel}^2 + u_{b,rel}^2} \quad 1.9$$

$u_{Rw,rel}$...relativna negotovost obnovljivosti znotraj laboratorija

$u_{b,rel}$...relativna negotovost, povezana z odstopanjem metode in laboratorija

Izračun relativne razširjene negotovosti (U_{rel}):

$$U_{rel} = k \cdot u_{c,rel} \quad 1.10$$

k ...faktor pokritja

$u_{c,rel}$...relativna kombinirana negotovost

Enačbe veljajo, kadar imamo na voljo le en CRM, tako kot je bilo v našem primeru [15].

2 Namen dela

Namen diplomskega dela je validirati analizno metodo za določanje tokoferolov v oljih. Določili bomo koncentracijo α -tokoferola, vsoto koncentracij β -tokoferola in γ -tokoferola ter koncentracijo δ -tokoferola.

Tokoferole bomo določali v hladno stiskanih oljih in v rafiniranih oljih, saj nas zanima, ali so tokoferoli prisotni tudi v rafiniranih oljih.

Tokoferole bomo določali z RP-HPLC (reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) in kolono C₁₈. Kromatograme bomo obdelali s programsko opremo OpenLAB EZchrom.

Pri validaciji bomo določili:

- LOD, LOQ: Analizirali bomo 10 vzorcev olja z minimalno količino vitamina E ali topila z minimalno dodano količino standarda vitamina E. Iz teh določitev bomo izračunali $3 \cdot s$ (LOD) in $10 \cdot s$ (LOQ).
- Delovno območje metode, ki ga bomo potrdili z realnimi vzorci.
- Linearnost metode z različnimi koncentracijami standardnih raztopin skozi celotno delovno območje.
- Pravilnost metode bomo potrdili z analizo ustreznega referenčnega materiala (CRM).
- Ponovljivost metode z 6-kratno analizo istega vzorca v enem dnevu; izračunali bomo povprečno vrednost, standardni odmik in relativni standardni odmik.
- Obnovljivost metode iz naključne razlike rezultatov paralelnih kontrolnih ali realnih vzorcev skozi celotno koncentracijsko območje.
- Robustnost metode z minimalno spremembo pretoka in temperature kolone.

Ocenili bomo merilno negotovost metode po ISO 11352. Analizirali bomo tudi nekaj olj z enakimi matricami, da vidimo primerjavo koncentracij tokoferolov med njimi.

3 Eksperimentalni del

Za osnovo postopka določitve tokoferolov smo uporabili strokovni članek, ki opisuje analizo tokoferolov s HPLC v rastlinskih oljih [16]. Postopek iz članka smo nato prilagodili našim laboratorijskim zmogljivostim. Separacijo tokoferolov smo dosegli z reverznofazno HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Olje smo raztopili v heksanu, nato smo ga redčili v metanolu in ekstrahirali tokoferole v metanol, vzorec smo nato prefiltrirali. Inštrument injicira del ekstarhiranega vzorca v mobilno fazo in pod visokim tlakom potiska komponente skozi kolono do detektorja. Ločevanje komponent temelji na porazdelitvi analita med mobilno in stacionarno fazo. Zaradi različnega retencijskega časa komponent lahko ločimo alfa, beta+gamma in delta tokoferol. Za detekcijo uporabljamo pretočni spektrofotometrični detektor - DAD detektor (*diode array detector*). Retencijski čas je identifikacijski parameter, ploščina vrha pa kvantifikacijski parameter. Koncentracijo tokoferolov izračunamo iz umeritvene krivulje s pomočjo računalniškega programa.

3.1 Oprema

- Kromatograf za tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo (Agilent-Technologies, 1200 Series), HPLC z DAD (*Diode array detector*) detektorjem enota za razplinjevanje mobilnih faz, termostat za kolono (± 1 °C) in program za obdelavo podatkov
- Mešalnik za epruvete: Multi Reax, Heidolph
- Analizna tehtnica, Mettler Toledo AT 261
- Centrifuga: Centric, Tehnica

3.2 Kemikalije in materiali

- Metanol – CH_3OH , J.T.Baker, (Ultra) Gradient HPLC Grade
- *n*-Heksan – C_6H_{14} , Merck, $\geq 99,0$ %
- 2-Propanol - $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, J.T.Baker, 99,7 %
- Alfa-tokoferol, Sigma-Aldrich, kat. št.: SU-47783, 96,8 %
- Beta-tokoferol, Sigma-Aldrich, kat. št.: SU-46401-U, $c=50$ mg/mL, 98,0 %
- Gama-tokoferol, Sigma-Aldrich, kat. št.: SU-47785, 97,0%
- Delta-tokoferol, Sigma-Aldrich, kat. št.: SU-47784, 97,0%
- Standard Reference Material[®] 3278, Sigma-Aldrich, kat. št.: NIST3278
- Deionizirana voda (Mili Q), Millipore[®]
- Membranski filtri, Sartorius, velikost por 0,45 μm
- Merilne bučke 5 mL, 10 mL, oznaka A
- Centrifugirke

- Brizge, 5 mL, BD Discardit
- Pipeta 100-1000 μL , Brand
- Pipeta 10-100 μL , Mettler Toledo
- Razdeljevalec Handystep electronic, Brand

3.3 Priprava standardnih raztopin in vzorcev

3.3.1 Priprava osnovnih standardnih raztopin (OSR)

- Osnovna standardna raztopina alfa-tokoferola ($c=1000\text{ mg/L}$)
V merilno bučko natehtamo ustrezno maso alfa-tokoferola, raztopimo v 2-propanolu in dopolnimo do oznake.
- Osnovna standardna raztopina beta-tokoferola ($c=1000\text{ mg/L}$)
V merilno bučko odpipetiramo ustrezeni volumen beta-tokoferola in dopolnimo do oznake z metanolom.
- Osnovna standardna raztopina gama-tokoferola ($c=1000\text{ mg/L}$)
V merilno bučko natehtamo ustrezno maso gama-tokoferola, raztopimo v 2-propanolu in dopolnimo do oznake.
- Osnovna standardna raztopina delta-tokoferola ($c=1000\text{ mg/L}$)
V merilno bučko natehtamo ustrezno maso delta-tokoferola, raztopimo v 2-propanolu in dopolnimo do oznake.
- MIX 100 ($c=100\text{ mg/L}$)
V merilno bučko odpipetiramo ustrezeni volumen OSR raztopine (alfa, beta, gama, delta-tokoferola) in dopolnimo do oznake z metanolom.

3.3.2 Priprava kontrolnih vzorcev

- MIX 2
V merilno bučko odpipetiramo ustrezeni volumen MIX 100 in dopolnimo do oznake z metanolom.
 c (alfa-tokoferol) = 2 mg/L
 c (beta+gama-tokoferol) = 4 mg/L
 c (delta-tokoferol) = 2 mg/L
- MIX 10
V merilno bučko odpipetiramo ustrezeni volumen MIX 100 in dopolnimo do oznake z metanolom.
 c (alfa-tokoferol) = 10 mg/L
 c (beta+gama-tokoferol) = 20 mg/L
 c (delta-tokoferol) = 10 mg/L

3.3.3 Priprava standardnih raztopin za kalibracijo

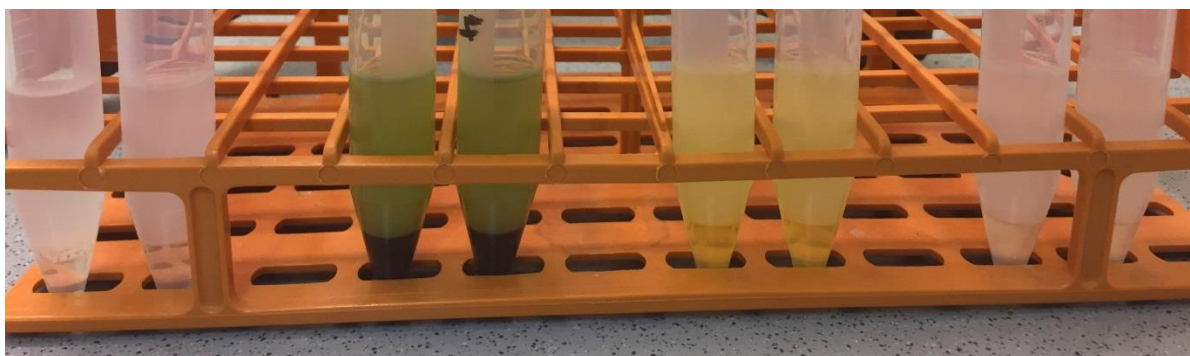
Standardne raztopine za kalibracijo smo pripravili v območju od 0,5 mg/L do 40 mg/L (tabela 3.1). V merilne bučke smo odpipetirali ustrezen volumen standardne raztopine (MIX 100) in dopolnili do oznake z metanolom.

Tabela 3.1: Koncentracije analitov na posameznih nivojih umeritvene krivulje

Standardna raztopina	Konc. (mg/L) α -, δ -tokoferol	Konc. (mg/L) β + γ -tokoferol
L1	/	0,5
L2	0,5	1,0
L3	1,0	2,0
L4	2,0	5,0
L5	5,0	10,0
L6	10,0	20,0
L7	20,0	40,0

3.3.4 Priprava vzorca

V merilno bučko smo natehtali vzorec, ga raztopili v *n*-heksanu in dopolnili do oznake z *n*-heksanom. Odpipetirali smo ustrezen volumen tako pripravljenega vzorca v centrifugirko in s Handystepom dodali metanol. Centrifugirke smo dali na mešalnik za epruvete za 1 min. Nato smo centrifugirke prestavili v centrifugo za 5 min. Vzorec (slika 3.1) smo nato prefiltrirali v vialo skozi 45 μ m membranski filter. Vzorec smo pripravili v paralelkah.



Slika 3.1: Vzorci pred filtracijo

3.3.5 Priprava vzorca s standardnim dodatkom 10 mg/L

V merilno bučko smo natehtali vzorec, ga raztopili v *n*-heksanu, dodali ustrezen volumen standarda MIX 100 (3.3.1.5) in dopolnili do oznake z *n*-heksanom. Odpipetirali smo ustrezen volumen tako pripravljenega vzorca v centrifugirko in s Handystepom dodali metanol. Centrifugirke smo dali na mešalnik za epruvete za 1 min. Nato smo centrifugirke prestavili v centrifugo za 5 min. Vzorce smo nato prefiltrirali v

vialo skozi 45 μm membranski filter. Vzorec s standardnim dodatkom smo pripravili v paralelkah.

3.4 Kromatografski pogoji

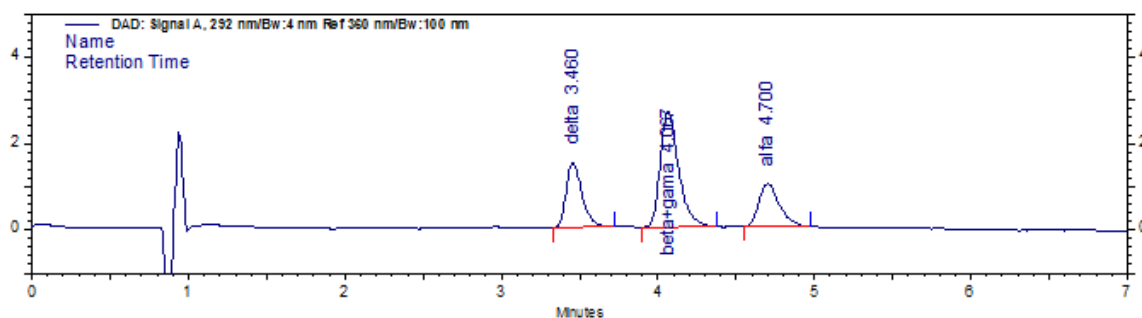
Metoda: VITAMINI E olje.met
Predkolona: C-18, 4x3,0 mm, Phenomenex,
Kolona: Kinetex 2,6 μm C18, 100x4,6 mm, Phenomenex,
Mobilna faza: A: 96,0 % metanol
B: 4,0 % voda (Milli Q)
Pretok eluenta: 1,0 mL/min
Čas analize: 13 min
Volumen injiciranja: 20 μL
Temperatura kolone: 45 °C
Detekcija: $\lambda = 292$ (4 nm)
 $\lambda_{\text{ref}} = 360$ nm (100 nm)

4 Rezultati in razprava

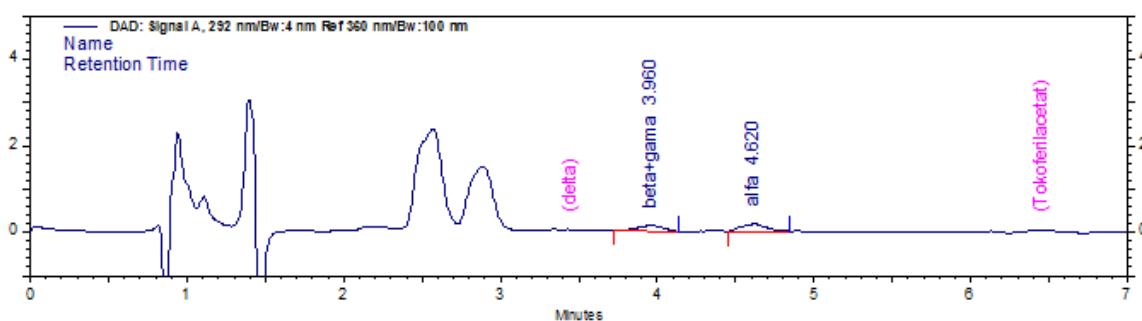
Pri validaciji analizne metode smo analizirali 16 različnih matric rastlinskih olj (sezamovo olje, ričkovo olje, sončnično olje, mandljevo olje, bučno olje, oljčno olje, konoplino olje, orehovo olje, olje koruznih kalčkov, repično olje, olje pšeničnih kalčkov, olje črne kumine, olje grozdnih pečk, sojino olje, lešnikovo olje, arašidovo olje). Za primerjavo vrednosti med koncentracijami tokoferolov v enakih matricah smo analizirali tudi različne vzorce oljčnih, sončničnih ter bučnih olj. Primeri kromatogramov standardne raztopine in nekaterih olj so na slikah 4.1 – 4.4.

Vsak vzorec smo pripravili v paralelkah in z dvema različnima standardnima dodatkom.

Kromatogrami kontrolnih standardov se razlikujejo od kromatogramov vzorcev. Pri vzorcih so na kromatogramih lahko prisotne še druge komponente vzorca, ki pa jih naš kontrolni vzorec nima (slika 4.1 in 4.2).

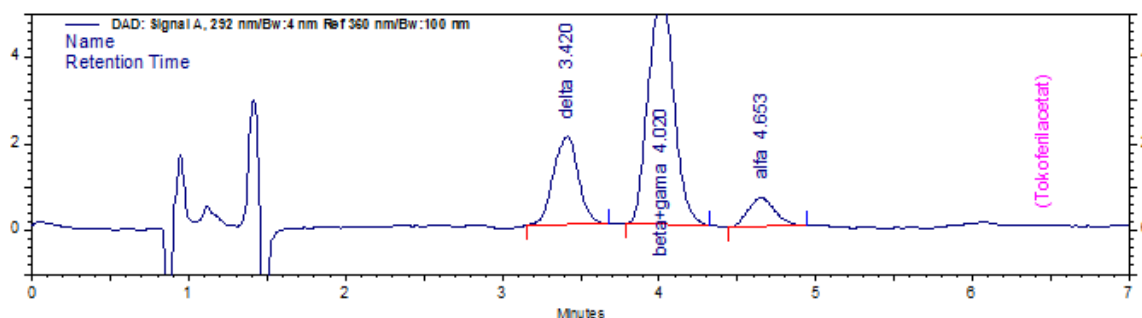


Slika 4.1: Kontrolni standard MIX 2

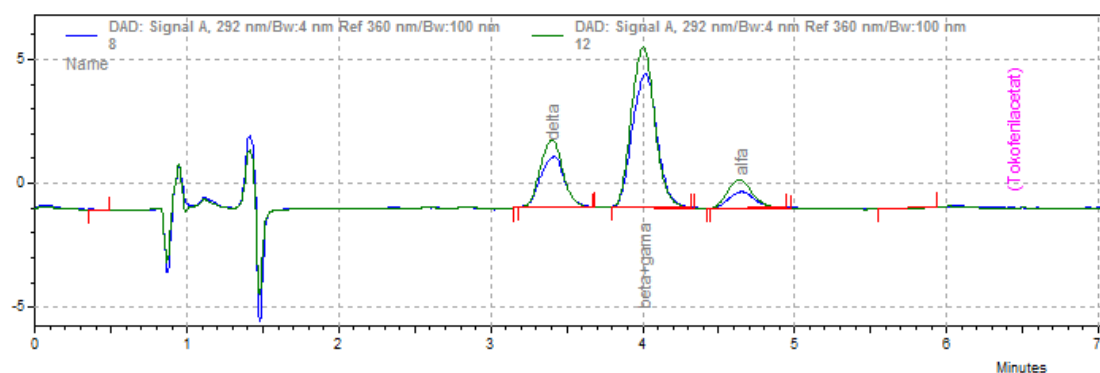


Slika 4.2: Kromatogram olja grozdnih pečk

Vsako matrico smo analizirali še s standardnim dodatkom (sliki 4.3 in 4.4), da smo preverili retencijski čas tokoferolov v vzorcu.



Slika 4.3: Kromatogram sojinega olja



Slika 4.4: Kromatogram sojinega olja in sojinega olja s standardnim dodatkom.

Modra barva prikazuje vzorec brez standardnega dodatka, zelena barva pa prikazuje vzorec s standardnim dodatkom.

4.1 Validacija analizne metode

Pred začetkom validacije smo izdelali plan validacije, kjer smo opredelili obseg validacije.

4.1.1 Meja zaznave (LOD)

Za alfa tokoferol smo mejo zaznave določili iz standardnega odmika serije desetih meritev olja (oljčno olje) z minimalno koncentracijo alfa tokoferola.

Meja zaznave ($x_{\text{povprečna}} + 3 \cdot s$) je 0,34 mg/L alfa tokoferola.

Za beta+gamma tokoferol in delta tokoferol smo mejo zaznave določili iz standardnega odmika serije desetih meritev olja (oljčno olje), ki smo ji dodali majhno koncentracijo osnovne standardne raztopine 1000 mg/L (beta, gama, delta) tokoferola.

Meja zaznave ($3 \cdot s$) je 0,10 mg/L beta+gama tokoferola.

Meja zaznave ($3 \cdot s$) je 0,05 mg/L delta tokoferola.

4.1.2 Meja določljivosti (LOQ)

Za alfa tokoferol smo mejo določljivosti določili iz standardnega odmika serije desetih meritev olja (oljčno olje) z minimalno koncentracijo alfa tokoferola.

Meja določljivosti ($x_{\text{povprečna}} + 10 \cdot s$) je 0,49 mg/L alfa tokoferola.

Za beta+gama tokoferol in delta tokoferol smo mejo določljivosti določili iz standardnega odmika serije desetih meritev olja (oljčno olje), ki smo ji dodali majhno koncentracijo osnovne standardne raztopine 1000 mg/L (beta, gama, delta) tokoferola.

Meja določljivosti ($10 \cdot s$) je 0,34 mg/L beta+gama tokoferola.

Meja določljivosti ($10 \cdot s$) je 0,16 mg/L delta tokoferola.

Odločili smo se, da se bo delovno območje metode pričelo višje od LOQ.

Vrednost 0,5 mg/L α -, β + γ -, δ - tokoferola predstavlja prvo točko umeritvene krivulje, kar ustreza 2,5 mg/100 g olja pri ustrezni natehti.

Natančnost določanja alfa, beta+gama, delta tokoferola pri koncentraciji, ki ustreza vrednosti 0,5 mg/L, smo potrdili z analizo realnih vzorcev v krajšem časovnem obdobju. Postavili smo si pogoj, da naj bo RSD meritev pod 10 %. Vrednosti RSD meritev so navedene v tabelah 4.1, 4.2 in 4.3.

Tabela 4.1: Potrditev LOQ: α -tokoferol

Matrica	Št. meritev	Povpr. koncentracija (mg/L)	s	RSD (%)
Bučno olje	6	0,58	0,04	7,2
Ričkovo olje	6	0,51	0,03	6,7
Konoplino olje	6	0,82	0,05	6,2
Orehovo olje	6	0,61	0,04	7,1

Tabela 4.2: Potrditev LOQ: β + γ -tokoferol

Matrica	Št. meritev	Povpr. koncentracija (mg/L)	s	RSD (%)
Mandljevo olje	6	0,59	0,02	2,7
Bučno olje	6	0,71	0,04	5,2
Konoplino olje	6	0,85	0,05	6,2
Orehovo olje	6	0,63	0,05	8,4

Tabela 4.3: Potrditev LOQ: δ -tokoferol

Matrica	Št. meritev	Povpr. koncentracija (mg/L)	s	RSD (%)
Olje koruznih kalčkov	6	0,52	0,03	6,7
Bučno olje	6	0,47	0,03	6,2
Konoplino olje	6	0,55	0,02	3,8
Orehovo olje	6	0,63	0,07	11,1

LOQ smo potrdili, saj je bil v večini primerov RSD pod 10 %, kar je bila naša zahteva. Izstopal je le RSD pri orehovem olju, ki je bil 11,1 % za δ -tokoferol.

4.1.3 Linearnost

Umeritveno krivuljo smo izdelali tako, da smo analizirali standardne raztopine α -, β + γ - in δ - tokoferola s 7 različnimi koncentracijami. Raztopine smo analizirali v treh serijah. Pogoj, ki smo si ga postavili, je da je korelacijski koeficient umeritvene krivulje večji od 0,995. Koncentracije in ploščine vrhov so podane v tabelah 4.4, 4.5 in 4.6. Izračunali smo povprečje ploščin pri vseh treh umeritvenih krivuljah in jih obdelali v računalniškem programu Excel, kjer smo tudi izrisali grafe (graf 4.1, 4.2, 4.3), iz katerih je razviden korelacijski koeficient umeritvene krivulje in ta ustreza našim zahtevam. S tem smo potrdili linearnost.

Tabela 4.4: Podatki za umeritveno krivuljo za alfa tokoferol

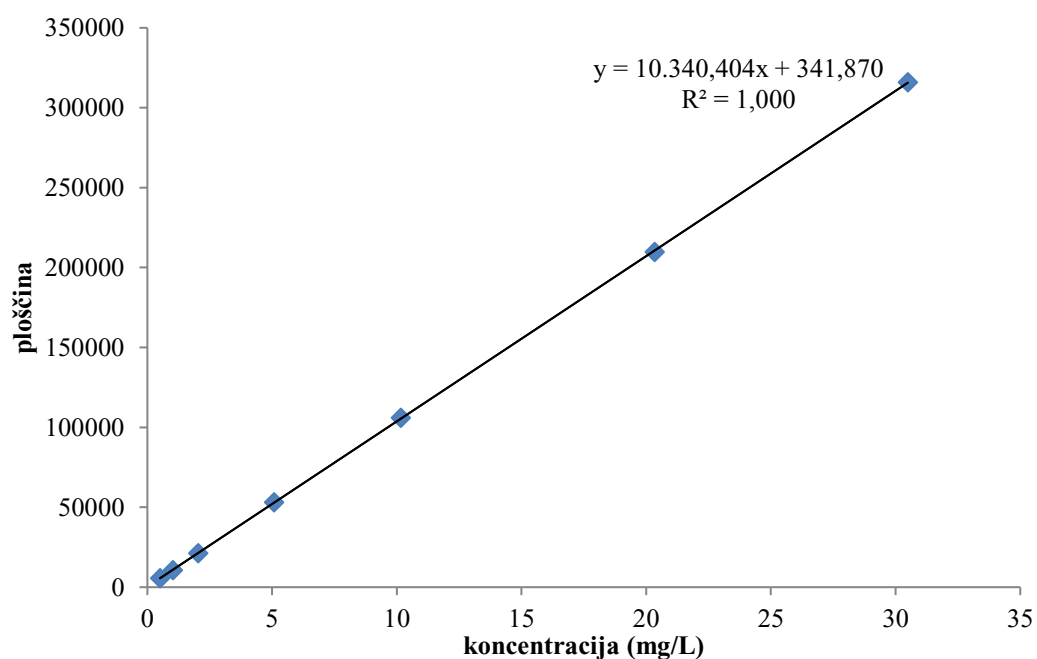
Alfa tokoferol (mg/L)	Ploščina vrha			Povprečje
	1. umeritvena	2. umeritvena	3. umeritvena	
0,51	5826	5576	5425	5609
1,02	10373	10830	10506	10570
2,03	21369	21576	20987	21311
5,08	53288	53170	52847	53102
10,16	106012	106360	105718	106030
20,33	210096	209583	209522	209734
30,49	316215	317315	314282	315937

Tabela 4.5: Podatki za umeritveno krivuljo za beta+gama tokoferol

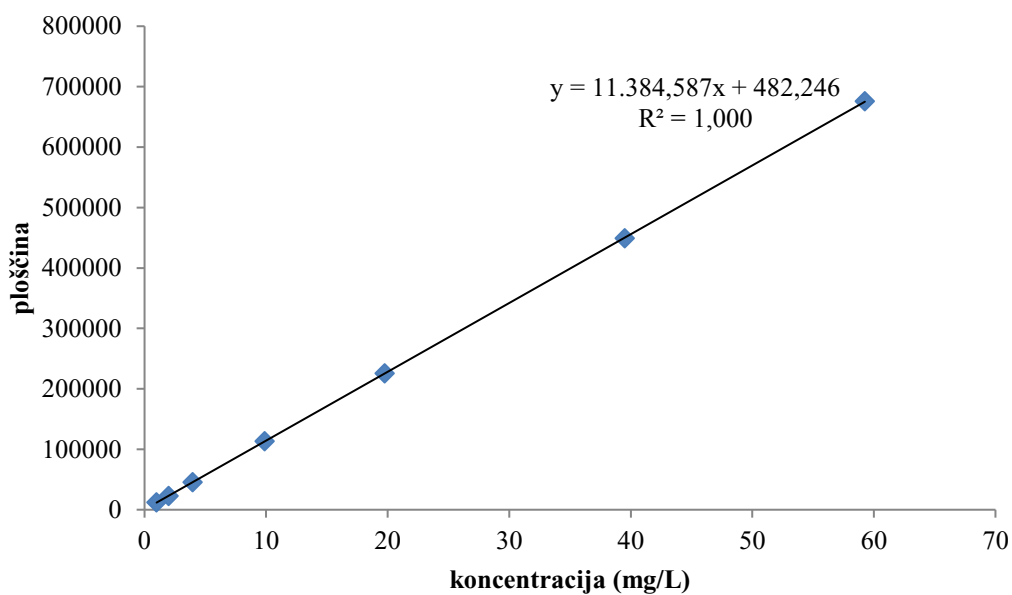
Beta+gama tokoferol (mg/L)	Ploščina vrha			Povprečje
	1. umeritvena	2. umeritvena	3. umeritvena	
0,99	12059	12134	11642	11945
1,98	22458	22790	22961	22736
3,95	45516	45269	45466	45417
9,88	113404	113089	113152	113215
19,75	226244	225359	225502	225702
39,51	450527	448580	448703	449270
59,26	677447	675233	674279	675653

Tabela 4.6: Podatki za umeritveno krivuljo za delta tokoferol

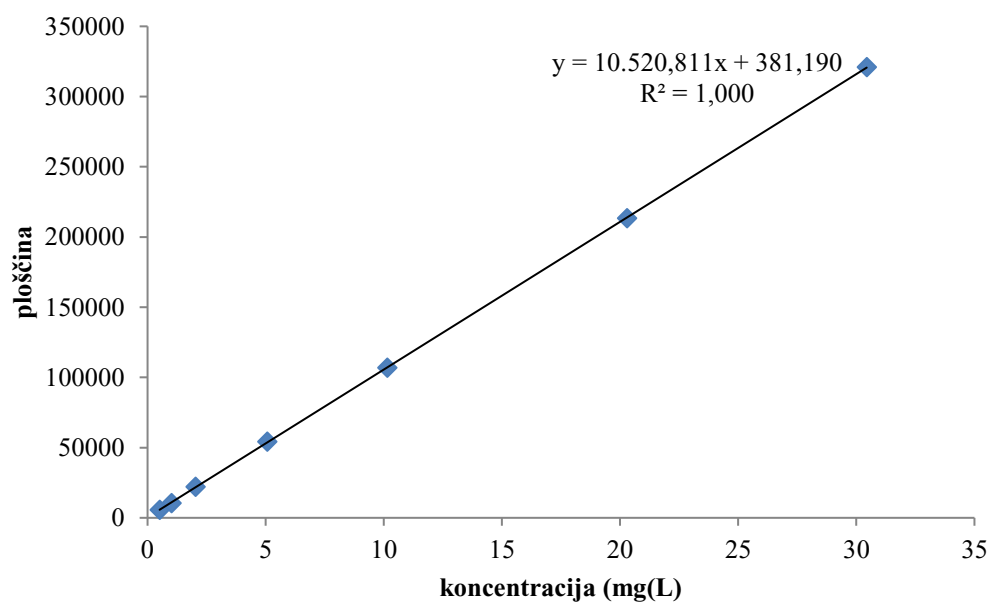
Delta tokoferol (mg/L)	Ploščina vrha			Povprečje
	1. umeritvena	2. umeritvena	3. umeritvena	
0,51	6005	5734	5543	5761
1,01	10699	10526	10423	10549
2,03	22152	22431	21668	22084
5,07	54301	54063	54030	54131
10,15	107324	107000	106726	107017
20,29	214257	213071	213011	213446
30,44	321630	320020	320980	320877



Graf 4.1: Umeritvena krivulja za alfa tokoferol



Graf 4.2: Umeritvena krivulja za beta+gama tokoferol



Graf 4.3: Umeritvena krivulja za delta tokoferola

4.1.4 Delovno območje metode

Delovno območje metode smo določili glede na realne koncentracije tokoferolov v vzorcih:

- alfa tokoferol: od 2,5 do 250 mg/100 g
- beta+gama tokoferol: od 2,5 do 100 mg/100 g
- delta tokoferol: od 2,5 do 30 mg/100 g.

Z ustrežno redčitvijo vzorca z *n*-heksanom lahko določimo tudi koncentracije nad delovnim območjem metode.

4.1.5 Prilnost metode

4.1.5.1 Izkoristek metode – standardni dodatek

Prilnost metode smo ocenili tako, da smo različnim matricam olj dodali različne količine standardnega dodatka, ki so prikazane v tabelah 4.7, 4.8 in 4.9. Naš cilj je bil, da so izkoristki standardnih dodatkov med 80 % in 120 %.

Tabela 4.7: Izkoristki metode glede na standardni dodatek (α -tokoferol)

Matrica	Vzorec-konc. (mg/100 g)	Std. dodatek (mg/L)	Vzorec+std. d. (mg/100 g)	Izkoristek (%)
Sezamovo olje	0,4	20	20,7	101,5
Sezamovo olje	0,4	2,5	2,5	86,0
Ričkovo olje	2,6	5	7,0	88,0
Ričkovo olje	2,6	1	3,6	100,0
Sončnično olje-h.s	64,3	5	67,2	57,0
Sončnično olje-h.s.	64,3	15	75,1	71,7
Mandljevo olje	37,2	8	42,8	70,6
Mandljevo olje	37,2	2	38,2	52,5
Bučno olje	2,3	5	6,6	86,0
Bučno olje	2,3	10	11,1	87,5
Oljčno olje	20,4	2	22,2	92,5
Oljčno olje	20,4	10	29,2	88,0
Konopljino olje	4,9	5	9,3	89,0
Konopljino olje	4,9	15	18,5	90,7
Orehovo olje	3,3	5	8,0	93,0
Orehovo olje	3,3	15	17,4	94,0
Sončnično olje-raf.	57,7	5	61,4	74,0
Sončnično olje-raf.	57,7	15	69,7	80,0
Olje koruznih kalčkov	21,4	5	26,1	95,0
Olje koruznih kalčkov	21,4	15	37,0	104,3
Repično olje-raf.	24,9	5	28,5	71,0
Repično olje-raf.	24,9	10	33,2	83,0
Repično olje-h.s.	21,9	5	26,0	81,0
Repično olj-h.s.	21,9	15	29,8	79,0
Olje pšeničnih kalčkov	226,7	10	232,7	60,0
Olje pšeničnih kalčkov	226,7	50	264,8	76,2
Olje črne kumine	2,7	5	7,2	89,0
Olje črne kumine	2,7	10	11,3	85,5
Olje grozdnih pečk	2,4	5	6,4	79,0
Olje grozdnih pečk	2,4	10	10,7	83,0
Sojino olje	8,5	5	12,4	79,0
Sojino olje	8,5	15	16,8	55,3
Lešnikovo olje	32,4	5	38,2	117,0
Lešnikovo olje	32,4	10	40,4	80,5
Arašidovo olje	17,2	5	20,2	60,0
Arašidovo olje	17,2	15	29,5	82,3

Tabela 4.8: Izkoristki metode glede na standardni dodatek ($\beta+\gamma$ tokoferol)

Matrica	Vzorec-konc. (mg/100 g)	Std. dodatek (mg/L)	Vzorec+std. d. (mg/100 g)	Izkoristek (%)
Sezamovo olje	47,5	40	92,4	112,4
Sezamovo olje	47,5	5	51,1	72,0
Ričkovo olje	67,7	10	75,5	78,5
Ričkovo olje	67,7	2	68,5	40,0
Sončnično olje-h.s	4,7	10	13,9	92,5
Sončnično olje-h.s.	4,7	30	32,2	91,8
Mandljevo olje	8,4	16	22,7	89,4
Mandljevo olje	8,4	4	11,8	85,0
Bučno olje	40,6	10	49,3	86,5
Bučno olje	40,6	20	58,2	88,0
Oljčno olje	0,9	4	4,5	89,9
Oljčno olje	0,9	20	19,2	91,5
Konopljino olje	65,3	10	73,6	83,5
Konopljino olje	65,3	30	92,5	90,8
Orehovo olje	23,2	10	32,8	96,5
Orehovo olje	23,2	30	51,1	93,2
Sončnično olje-raf.	4,4	10	13,6	92,5
Sončnično olje-raf.	4,4	30	31,5	90,5
Olje koruznih kalčkov	68,4	10	79,0	105,5
Olje koruznih kalčkov	68,4	30	99,8	104,5
Repično olje-raf.	29,1	10	38,0	89,0
Repično olje-raf.	29,1	20	46,7	88,0
Repično olje-h.s.	35,2	10	44,2	90,5
Repično olj-h.s.	35,2	30	52,8	88,3
Olje pšeničnih kalčkov	83,5	20	104,5	105,0
Olje pšeničnih kalčkov	83,5	100	169,7	86,2
Olje črne kumine	0,0	10	9,4	94,0
Olje črne kumine	0,0	20	18,9	94,5
Olje grozdnih pečk	1,4	10	10,1	87,0
Olje grozdnih pečk	1,4	20	19,1	88,3
Sojino olje	53,0	10	61,0	80,5
Sojino olje	53,0	30	71,1	60,3
Lešnikovo olje	1,4	10	10,9	95,0
Lešnikovo olje	1,4	20	19,2	89,0
Arašidovo olje	15,6	10	24,2	86,0
Arašidovo olje	15,6	30	42,5	89,8

Tabela 4.9: Izkoristki metode glede na standardni dodatek (δ -tokoferol)

Matrica	Vzorec (mg/100 g)	Std. dodatek (mg/L)	Vzorec+std. d. (mg/100 g)	Izkoristek (%)
Sezamovo olje	0,8	20	21,5	103,8
Sezamovo olje	0,8	2,5	3,2	98,0
Ričkovo olje	5,2	5	10,6	109,0
Ričkovo olje	5,2	1	6,2	100,0
Sončnično olje-h.s	0,1	5	5,0	98,0
Sončnično olje-h.s.	0,1	15	14,7	97,7
Mandljevo olje	0,9	8	8,4	93,1
Mandljevo olje	0,9	2	2,7	90,0
Bučno olje	10,6	5	14,9	86,0
Bučno olje	10,6	10	19,6	90,0
Oljčno olje	0,0	2	2,0	100,0
Oljčno olje	0,0	10	9,7	97,0
Konopljino olje	2,9	5	7,6	94,0
Konopljino olje	2,9	15	17,7	98,3
Orehovo olje	3,8	5	9,1	106,3
Orehovo olje	3,8	15	19,3	103,3
Sončnično olje-raf.	0,0	5	4,7	93,3
Sončnično olje-raf.	0,0	15	14,5	96,1
Olje koruznih kalčkov	1,9	5	6,8	99,0
Olje koruznih kalčkov	1,9	15	17,0	101,0
Repično olje-raf.	0,7	5	5,4	94,1
Repično olje-raf.	0,7	10	10,4	97,1
Repično olje-h.s.	0,6	5	6,0	108,0
Repično olj-h.s.	0,6	10	10,5	99,0
Olje pšeničnih kalčkov	0,0	10	9,2	91,5
Olje pšeničnih kalčkov	0,0	50	40,9	81,7
Olje črne kumine	0,0	5	4,0	80,0
Olje črne kumine	0,0	10	8,9	89,0
Olje grozdnih pečk	0,0	5	4,9	98,0
Olje grozdnih pečk	0,0	10	9,5	94,5
Sojino olje	20,7	5	25,0	105,0
Sojino olje	20,7	15	30,6	65,7
Lešnikovo olje	0,0	5	4,9	98,0
Lešnikovo olje	0,0	10	9,5	94,5
Arašidovo olje	1,2	5	6,5	105,0
Arašidovo olje	1,2	15	16,4	101,3

Pri α -tokoferolu so bili izkoristki manjši od 80 % pri sončničnem olju-h.s. (75,0 % in 71,7 %), mandljevem olju (70,6 % in 52,5 %), sončničnem olju-raf. (74,0 %), repičnem olju-raf. (71,0 %), repičnem olju-h.s. (79,0 %), olju pšeničnih kalčkov (60,0 % in 76,2 %), olju groznih pečk (79,0 %), sojinem olju (79,0 % in 55,3 %) in arašidovem olju (60,0 %). Pri $\beta+\gamma$ -tokoferolu so bili izkoristki za ričkovo olje (40 % in 78,5 %), sezamovo olje (72,0 %) ter sojino olje (60,3 %). Pri δ -tokoferolu pa je izstopal izkoristek za sojino olje, ki je bil 65,7 %.

4.1.5.2 Določitev analitov v CRM-ju

Pravilnost metode (točnost) smo določili s 6 določitvami analitov v certificiranem referenčnem materialu v istem dnevu. Uporabili smo Standard Reference Material[®] 3278: Tocopherols in Edible Oils. Naš cilj je bil doseči izkoristke določitev, ki so znotraj naše merilne negotovosti, ti so prikazani v tabeli 4.10.

Certificiran referenčni material je bil zasnovan tako, da vsebuje vse štiri oblike tokoferolov. To so dosegli z mešanjem različnih vrst izbranih olj. CRM vsebuje 10 % sojinega olja, 10 % repičnega olja, 10 % žafranikega olja in 70 % sončničnega olja. CRM je bil pripravljen tako, da so združili olja in dodali kompatibilen antioksidant za stabilizacijo tokoferolov (BTH – butiliran hidroksitoluen). Mešanico so najprej ročno stresali, za nekaj minut so jo postavili v ultrazvočno kopel in nato mešali na magnetnem mešalniku 2 h, da so zagotovili popolno mešanje olj. Mešanico so nato napolnili v atmosferi argona v 2 ml ampule. Ampule se shranjujejo v temnem prostoru pri sobni temperaturi [17].

Certificirane vrednosti tokoferolov:

α -tokoferol... $(290,1 \pm 6,5)$ $\mu\text{g/g}$	δ -tokoferol... $(28,8 \pm 1,8)$ $\mu\text{g/g}$
β -tokoferol... $(11,38 \pm 0,52)$ $\mu\text{g/g}$	$\beta+\gamma$ -tokoferol... $122,88$ $\mu\text{g/g}$
γ -tokoferol... $(111,5 \pm 5,8)$ $\mu\text{g/g}$	

Tabela 4.10: Analiza certificiranega referenčnega materiala

meritve	Alfa-tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	Beta+gama-tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	Delta-tokoferol ($\mu\text{g/g}$)
1	277,6	137,8	29,6
2	275,8	136,7	32,1
3	275,7	142,9	31,9
4	274,6	140,4	30,6
5	269,4	137,9	31,3
6	277,7	142,5	25,0
povprečje	275,13	139,7	30,08
s	3,05	2,62	2,65
RSD (%)	1,11	1,88	8,82
izkoristek	94,80 %	113,70 %	104,40 %

Rezultati določitve CRM-ja so nam pokazali, da določimo vrednosti koncentracije tokoferolov znotraj postavljenih mej.

4.1.6 Natančnost metode

Natančnost metode v krajšem (tabele 4.11, 4.12, 4.13) in daljšem časovnem obdobju (tabele 4.14, 4.15, 4.16) smo preverili na različnih realnih vzorcih. Ponovljivost metode naj bo <10 %, ter obnovljivost metode <20 %.

Obnovljivost metode smo določili v obdobju 20 dni in s tem hkrati potrdili obstojnost vzorcev 14 dni pri -18 °C.

Tabela 4.11: Natančnost v krajšem časovnem obdobju – ponovljivost (α -tokoferol)

Matrica	Št. meritev	Koncentracija (mg/100 g)	<i>s</i>	RSD (%)
Olje koruznih kalčkov	6	22,0	0,4	2,0
Ričkovo olje	6	2,5	0,2	6,5
Bučno olje	6	2,9	0,2	7,4
Mandljevo olje	6	40,4	0,8	1,9
Sončnično olje	6	63,4	1,0	1,6
Konopljino olje	6	4,1	0,2	6,0
Olje pšeničnih kalčkov	6	228,7	1,8	0,78
Orehovo olje	6	3,3	0,2	7,0

Tabela 4.12: Natančnost v krajšem časovnem obdobju – ponovljivost (β + γ -tokoferol)

Matrica	Št. meritev	Koncentracija (mg/100 g)	<i>s</i>	RSD (%)
Olje koruznih kalčkov	6	71,5	0,9	1,2
Ričkovo olje	6	66,1	1,0	1,5
Bučno olje	6	47,2	1,2	2,5
Mandljevo olje	6	8,8	0,3	3,0
Konopljino olje	6	64,1	0,6	1,0
Olje pšeničnih kalčkov	5	87,8	2,5	2,8
Orehovo olje	6	22,5	0,5	2,2

Tabela 4.113: Natančnost v krajšem časovnem obdobju – ponovljivost (δ -tokoferol)

Matrica	Št. meritev	Koncentracija (mg/100 g)	<i>s</i>	RSD (%)
Olje koruznih kalčkov	6	2,6	0,1	4,8
Bučno olje	6	14,1	0,6	4,1
Konopljino olje	6	2,8	0,1	5,0
Orehovo olje	6	3,5	0,4	10,7

Pri ponovljivosti je bila določitev δ -tokoferola pri orehovem olju izven predvidenih mej, ker je bil RSD 10,7%. Koncentracija analita je bila pri orehovem olju tudi bolj na spodnjem delu umeritvene krivulje.

Tabela 4.14: Natančnost v daljšem časovnem obdobju – obnovljivost (α -tokoferol)

Matrica	Koncentracija (mg/100 g)	Št. meritev	<i>s</i>	RSD (%)
Sezamovo olje + 20 mg/L	19,5	6	1,3	6,5
Sezamovo olje + 2,5 mg/L	2,5	6	0,2	6,1
Ričkovo olje + 5 mg/L	4,9	6	1,5	31,1
Ričkovo olje + 1 mg/L	2,9	6	0,5	16,6
Olje koruznih kalčkov	22,3	5	0,5	2,2
Bučno olje	3,4	4	0,3	7,9

Pri obnovljivosti je bila določitev α -tokoferola izven predvidenih mej, saj je bil RSD 31,1 %. Koncentracija analita je tudi v tem primeru bila na spodnjem delu umeritvene krivulje.

Tabela 4.15: Natančnost v daljšem časovnem obdobju – obnovljivost (β + γ -tokoferol)

Matrica	Koncentracija (mg/100 g)	Št. meritev	<i>s</i>	RSD (%)
Sezamovo olje + 20 mg/L	97,0	6	3,4	3,5
Sezamovo olje + 2,5 mg/L	54,2	6	2,3	4,2
Ričkovo olje + 5 mg/L	77,2	6	1,4	1,8
Ričkovo olje + 1 mg/L	70,7	6	2,2	3,1
Olje koruznih kalčkov	74,9	5	2,9	3,8
Bučno olje	49,5	4	2,8	5,7

Tabela 4.16: Natančnost v daljšem časovnem obdobju – obnovljivost (δ -tokoferol)

Matrica	Koncentracija (mg/100 g)	Št. meritev	<i>s</i>	RSD (%)
Sezamovo olje + 20 mg/L	23,9	6	1,3	5,5
Sezamovo olje + 2,5 mg/L	3,5	6	0,3	7,2
Ričkovo olje + 5 mg/L	11,4	6	0,7	6,6
Ričkovo olje + 1 mg/L	7,3	6	2,2	3,1
Olje koruznih kalčkov	2,9	5	0,4	12,2
Bučno olje	13,8	4	0,9	6,9

4.1.7 Robustnost metode

Robustnost metode smo preverili z dvema vzorcema, ki vsebujeta alfa, beta+gama in delta tokoferol. Za analizo smo vzeli arašidovo (tabela 4.17) in sojino olje (tabela 4.18). Želeli smo preveriti vplive na hitrost analize. V prvem poskusu smo želeli pospešiti analizo. Spremenili smo pretok z 1 mL/min na 1,1 mL/min. V drugem poskusu pa smo želeli upočasniti analizo. Spremenili smo temperaturo kolone s 45 °C na 40 °C. Koncentracije analitov določene pri spremenjenih pogojih naj bodo znotraj 20 %, glede na koncentracije določene po validirani metodi.

Tabela 4.17: Določitev analitov v arašidovem olju pri spremenjenih pogojih analize

	Vzorec	α -tokoferol (mg/100 g)	$\beta+\gamma$ -tokoferol (mg/100 g)	δ -tokoferol (mg/100 g)
Vzorec, analiziran po validirani metodi	Arašidovo olje	17,2	15,6	1,2
Sprememba pretoka	Arašidovo olje	16,4	14,8	1,1
Sprememba temperature	Arašidovo olje	16,8	15,1	1,1

Tabela 4.18: Določitev analitov v sojinem olju pri spremenjenih pogojih analize

	Vzorec	α -tokoferol (mg/100 g)	$\beta+\gamma$ -tokoferol (mg/100 g)	δ -tokoferol (mg/100 g)
Vzorec, analiziran po validirani metodi	Sojino olje	8,5	53,0	20,7
Sprememba pretoka	Sojino olje	9,4	51,5	21,2
Sprememba temperature	Sojino olje	9,4	51,4	20,0

Koncentracije analitov so znotraj postavljenih mej in s tem smo potrdili robustnost metode.

4.2 Ocena merilne negotovosti

Certificirane vrednosti tokoferolov in intervali zaupanja, pridobljeni iz certifikata za CRM:

α -tokoferol... (290,1 \pm 6,5) $\mu\text{g/g}$

β -tokoferol... (11,38 \pm 0,52) $\mu\text{g/g}$

γ -tokoferol... (111,5 \pm 5,8) $\mu\text{g/g}$

δ -tokoferol... (28,8 \pm 1,8) $\mu\text{g/g}$

$\beta+\gamma$ -tokoferol... 122,88 $\mu\text{g/g}$

$$u_b = \sqrt{b^2 + \left(\frac{s_b}{\sqrt{n_M}}\right)^2 + u_{Cref}^2} \quad 4.1$$

b... razlika med povprečno izmerjeno vrednostjo in sprejeto referenčno vrednostjo

s_b ... standardni odklon določenih vrednosti RM

n_M ... število določitev (za izračun odstopanja) na RM

u_{Cref} ... negotovost referenčne vrednosti

CRM smo analizirali v paralelkah v 11-ih serijah v obdobju dveh mesecev, podatki so prikazani v tabelah 4.19, 4.20 in 4.21.

Tabela 4.19: Rezultati določitve za α -tokoferol

Št. meritev	1. paralelka ($\mu\text{g/g}$)	2. paralelka ($\mu\text{g/g}$)	Povprečje ($\mu\text{g/g}$)
1	296,5	282,6	289,6
2	288,0	280,9	284,5
3	280,7	290,0	285,4
4	292,9	289,5	291,2
5	273,0	271,0	272,0
6	278,3	278,8	278,6
7	282,0	276,5	279,3
8	284,8	279,9	282,4
9	274,4	273,5	274,0
10	275,2	281,7	278,5
11	281,6	283,1	282,4

Povprečje: $\bar{x}(\alpha\text{-tokoferol})=281,6 \mu\text{g/g}$

$s=6,0$

RSD=2,1 %

Tabela 4.20: Rezultati določitve za $\beta+\gamma$ -tokoferol

Št. meritev	1. paralelka ($\mu\text{g/g}$)	2. paralelka ($\mu\text{g/g}$)	Povprečje ($\mu\text{g/g}$)
1	142,7	133,6	138,2
2	140,6	137,8	139,2
3	138,0	145,1	141,6
4	142,6	141,8	142,2
5	135,2	126,0	130,6
6	127,9	136,0	132,0
7	135,2	132,5	133,9
8	132,6	125,8	129,2
9	130,9	125,1	128,0
10	124,7	128,3	126,5
11	137,6	125,9	131,8

Povprečje: $\bar{x}(\beta+\gamma\text{-tokoferol})=133,9 \mu\text{g/g}$

$s=5,5$

RSD=4,1 %

Tabela 4.21: Rezultati določitve za δ -tokoferol

Št. meritev	1. paralelka ($\mu\text{g/g}$)	2. paralelka ($\mu\text{g/g}$)	Povprečje ($\mu\text{g/g}$)
1	26,2	24,5	25,4
2	25,7	22,3	24,0
3	27,5	25,4	26,5
4	29,5	28,4	29,0
5	25,2	26,2	25,7
6	25,1	26,2	25,7
7	27,3	23,8	25,6
8	26,0	25,1	25,6
9	30,0	27,9	29,0
10	29,7	30,0	29,9
11	28,0	27,4	27,9

Povprečje: $\bar{x}(\delta\text{-tokoferol})=26,7 \mu\text{g/g}$

$s=1,9$

RSD=7,0 %

- Izračun negotovosti referenčne vrednosti.

Certificirano referenčno vrednost so pridobili iz medlaboratorijskega testiranja in interval zaupanja predstavlja tri standardne odklone.

$$u_{\text{Cref}}(\alpha\text{-tokoferol})=\frac{6,5}{290,1} \mu\text{g/g}=0,0224 \mu\text{g/g}$$

$$u_{\text{Cref}}(\beta\text{-tokoferol})=\frac{0,52}{11,38} \mu\text{g/g}=0,0457 \mu\text{g/g}$$

$$u_{\text{Cref}}(\gamma\text{-tokoferol})=\frac{5,8}{111,5} \mu\text{g/g}=0,0520 \mu\text{g/g}$$

$$u_{\text{Cref}}(\delta\text{-tokoferol})=\frac{1,8}{28,8} \mu\text{g/g}=0,0625 \mu\text{g/g}$$

4.2

- Izračun relativne negotovosti referenčne vrednosti ($u_{\text{Cref,rel}}$):

$$u_{\text{Cref,rel}}(\alpha\text{-tokoferol})=\frac{u_{\text{Cref}}=0,0224}{C_{\text{ref}}=290,1}=0,0000772$$

$$u_{\text{Cref,rel}}(\beta\text{-tokoferol})=\frac{0,0457}{11,38}=0,004016$$

$$u_{\text{Cref,rel}}(\gamma\text{-tokoferol})=\frac{0,0520}{111,5}=0,000466$$

$$u_{\text{Cref,rel}}(\delta\text{-tokoferol})=\frac{0,0625}{28,8}=0,002170$$

$$u_{\text{Cref,rel}}(\beta+\gamma\text{-tokoferol})=\frac{0,004016+0,000466}{2}=0,002241$$

4.3

- Izračun odstopanja, ki je razlika med povprečno izmerjeno vrednostjo in sprejeto referenčno vrednostjo.

$$\begin{aligned} b(\alpha\text{-tokoferol}) &= \bar{x} - C_{ref} = 281,6 - 290,1 = -8,5 \\ b(\beta+\gamma\text{-tokoferol}) &= 133,9 - 122,8 = 11,1 \\ b(\delta\text{-tokoferol}) &= 26,7 - 28,8 = -2,1 \end{aligned} \quad 4.4$$

- Izračun relativnega odstopanja

$$\begin{aligned} b_{rel}(\alpha\text{-tokoferol}) &= \frac{b}{C_{ref}} = \frac{-8,5}{290,1} = -0,0293 \\ b_{rel}(\beta+\gamma\text{-tokoferol}) &= \frac{11,1}{122,8} = 0,0903 \\ b_{rel}(\delta\text{-tokoferol}) &= \frac{-2,1}{28,8} = -0,0729 \end{aligned} \quad 4.5$$

- Izračun koeficienta sipanja določenih vrednosti RM. Ta je enak komponenti relativne negotovosti obnovljivosti znotraj laboratorija.

$$\begin{aligned} C_{v,b}(\alpha\text{-tokoferol}) &= \frac{s}{\bar{x}} = RSD = 0,0211 = u_{Rw,rel}(\alpha\text{-tokoferol}) \\ C_{v,b}(\beta+\gamma\text{-tokoferol}) &= 0,0412 = u_{Rw,rel}(\beta+\gamma\text{-tokoferol}) \\ C_{v,b}(\delta\text{-tokoferol}) &= 0,0700 = u_{Rw,rel}(\delta\text{-tokoferol}) \end{aligned} \quad 4.6$$

- Izračun komponente relativne negotovosti, povezane z odstopanjem rezultatov od prave vrednosti

$$\begin{aligned} u_{b,rel}(\alpha\text{-tokoferol}) &= \sqrt{b_{rel}^2 + \left(\frac{C_{v,b}}{\sqrt{n_M}}\right)^2 + u_{C_{ref},rel}^2} \\ &= \sqrt{(-0,0293)^2 + \left(\frac{0,0211}{\sqrt{11}}\right)^2 + 0,0000772^2} = 0,02998 = 3,00 \% \\ u_{b,rel}(\beta+\gamma\text{-tokoferol}) &= \sqrt{(0,0903)^2 + \left(\frac{0,0412}{\sqrt{11}}\right)^2 + 0,002241^2} = 0,0912 = 9,12 \% \\ u_{b,rel}(\delta\text{-tokoferol}) &= \sqrt{(-0,0729)^2 + \left(\frac{0,0700}{\sqrt{11}}\right)^2 + 0,002170^2} = 0,07592 = 7,59 \% \end{aligned} \quad 4.7$$

- Izračun relativne kombinirane negotovosti

$$\begin{aligned} u_{c,rel}(\alpha\text{-tokoferol}) &= \sqrt{u_{Rw,rel}^2 + u_{b,rel}^2} = \sqrt{0,0211^2 + 0,02998^2} = 0,03666 = 3,67 \% \\ u_{c,rel}(\beta+\gamma\text{-tokoferol}) &= \sqrt{0,0412^2 + 0,0912^2} = 0,1000 = 10,00 \% \\ u_{c,rel}(\delta\text{-tokoferol}) &= \sqrt{0,0700^2 + 0,07592^2} = 0,1033 = 10,33 \% \end{aligned} \quad 4.8$$

- Izračun relativne razširjene negotovosti

Faktor pokritja: $k=2$

$$U_{\text{rel}}(\alpha\text{-tokoferol})=k \cdot u_{\text{c,rel}}=2 \cdot 0,0367=0,0734=7,3 \%$$

$$U_{\text{rel}}(\beta+\gamma\text{-tokoferol})=2 \cdot 0,1000=0,2000=20 \%$$

4.9

$$U_{\text{rel}}(\delta\text{-tokoferol})=2 \cdot 0,1033=0,2066=21 \%$$

Ocenjena merilna negotovost za α -tokoferol je 7,3 %, za $\beta+\gamma$ -tokoferol 20 % in za δ -tokoferol 21 %.

4.3 Primerjava olj

Analizirali smo olja iz iste vrste rastlin, da smo videli primerjavo v koncentraciji tokoferolov, znotraj ene vrste olja oz. iste matrice (tabele 4.22 - 4.24).

Tabela 4.22: Rezultati analize vzorcev sončničnih olj

Vzorec	α -tokoferol (mg/100 g)	$\beta+\gamma$ -tokoferol (mg/100 g)	Vsota tokoferolov (mg/100 g)
Sončnično olje 1 - rafinirano	57,7	4,4	62,1
Sončnično olje 2 - rafinirano	57,8	5,3	63,1
Sončnično olje 3 - rafinirano	53,4	4,0	57,4
Sončnično olje 4 - rafinirano	58,3	4,3	62,6
Sončnično olje 5 - rafinirano	73,0	3,8	76,8
Sončnično olje 6 - rafinirano	51,1	4,1	55,2
Sončnično olje 7 - hladno stiskano	64,3	4,7	69,0

En vzorec sončničnega olja je bil hladno stiskan, vsi ostali vzorci pa so bili vzorci rafiniranih olj. Koncentracije v sončničnem olju za α -tokoferol se gibljejo od 51,1 mg/100 g do 73,0 mg/100 g olja. Koncentracije za $\beta+\gamma$ -tokoferol pa se gibljejo od 3,8 mg/100 g do 5,3 mg/100 g olja. Najvišjo vrednost α -tokoferola (73,0 mg/100 g) je imel vzorec sončničnega olja 5, ki je rafinirano olje, sledil pa mu je vzorec sončničnega olja 7, ki je hladno stiskano olje z 64,3 mg/100 g. Tudi pri vsoti tokoferolov ima največ tokoferolov vzorec sončničnega olja 5, sledi pa mu vzorec sončničnega olja 7.

Tabela 4.23: Rezultati analize vzorcev oljčnih olj

Vzorec	α -tokoferol (mg/100 g)
Oljčno olje 1 - ekstra deviško	20,4
Oljčno olje 2 - hladno stiskano	15,8
Oljčno olje 3 - hladno stiskano	13,9
Oljčno olje 4 - hladno stiskano	20,6

Vzorci oljčnih olj vsebujejo samo α -tokoferol. Koncentracije se gibljejo od 13,9 mg/100 g do 20,6 mg/100 g olja. Najvišji vrednosti tokoferola imata vzorec oljčnega olja 1 in 4. Vzorec 1 je ekstra deviško oljčno olje. To je najbolj kakovostna kategorija. Vzorec oljčnega olja 4 pa je ekološko pridelan in predelan iz sorte oljk Leccino.

Tabela 4.24: Rezultati analize vzorcev bučnih olj

Vzorec	α -tokoferol (mg/100g)	$\beta+\gamma$ -tokoferol (mg/100g)	δ -tokoferol (mg/100g)	Vsota tokoferolov (mg/100g)
Bučno olje 1 – hladno stiskano	2,3	40,6	10,6	53,5
Bučno olje 2	4,4	47,9	11,0	63,3
Bučno olje 3	8,2	46,7	9,2	60,6
Bučno olje 4	4,8	46,8	9,0	60,6
Bučno olje 5	5,3	49,9	8,7	63,9

Bučno olje vsebuje vse α -, $\beta+\gamma$ - in δ -tokoferole. Najvišje koncentracije so pri $\beta+\gamma$ -tokoferolu in se gibljejo od 40,6 mg/100 g do 49,9 mg/100 g olja. Koncentracije α -tokoferola se gibljejo od 2,3 mg/100 g do 8,2 mg/100 g olja. Koncentracije δ -tokoferola se gibljejo od 8,7 mg/100 g do 11,0 mg/100 g olja. Najnižjo vsoto tokoferolov ima vzorec bučnega olja 1, ki je hladno stiskano (53,5 mg/100 g). Vsi ostali vzorci bučnih olj, ki so pridobljeni s praženjem bučnih semen in nato s stiskanjem, pa imajo zelo podobne vsebnosti tokoferolov (od 60,6 mg/100 g do 63,9 mg/100 g olja).

5 Sklepne ugotovitve

V diplomski nalogi smo razvili in validirali analizno metodo za določevanje alfa, beta+gama in delta tokoferola v rastlinskih oljih z RP-HPLC. Razvoj metode je bil namenjen rutinski uporabi metode pri analiziranju tokoferolov v rastlinskih oljih.

Pri validaciji smo preverjali naslednje parametre: mejo zaznave, mejo določljivosti, delovno območje metode, linearnost metode, pravilnost metode, ponovljivost metode, obnovljivost metode in robustnost metode.

Meja zaznave za α -tokoferol je 0,34 mg/L, $\beta+\gamma$ -tokoferol je 0,10 mg/L, δ -tokoferol je 0,05 mg/L.

Meja določljivosti za α -tokoferol je 0,49 mg/L, $\beta+\gamma$ -tokoferol je 0,34 mg/L, δ -tokoferol je 0,16 mg/L. Vendar smo prvo točko umeritvene krivulje postavili nekoliko višje na 0,5 mg/L. To tudi ustreza 2,5 mg/100 g olja pri ustrezni natehti. Ponovljivost na LOQ območju smo potrdili z analizo vzorcev v krajšem časovnem obdobju. Vzorec olja smo pripravili 6-krat in ga v istem dnevu tudi analizirali. Pogoji, ki smo si ga postavili, je bil, da naj bo RSD določitev znotraj 10 %. To smo z določitvami tudi potrdili na različnih matricah. Izstopal je le RSD pri orehovem olju, ki je bil 11,1 % za δ -tokoferol.

Delovno območje metode smo potrdili z realnimi vzorci. Za α -tokoferol je od 2,5 do 250 mg/100 g, za $\beta+\gamma$ -tokoferol je od 2,5 do 100 mg/100 g in za δ -tokoferol je od 2,5 do 30 mg/100 g.

Za preverjanje linearnosti metode smo raztopine za umeritveno krivuljo analizirali v treh serijah. Izračunali smo povprečje ploščin vrhov iz serij in s pomočjo računalniškega programa Excel izrisali graf, iz katerega je razviden korelacijski koeficient umeritvene krivulje. Linearnost smo potrdili pri α -, $\beta+\gamma$ - in δ -tokoferolu, saj je pri vseh korelacijski koeficient umeritvenih krivulj presegal naš pogoj, ki je bil 0,995.

Z dodatkom različnih količin standardnega dodatka k oljem smo potrdili pravilnost metode, saj so bili izkoristki med 80 % in 120 % in so večinoma izpolnili naše pogoje. Izkoristki za α -tokoferol so bili malenkost nižji od izkoristkov za $\beta+\gamma$ - in δ -tokoferol. Pri α -tokoferolu smo imeli izkoristke manjše od 80 % pri sončničnem olju-h.s. (75,0 % in 71,7 %), mandljevem olju (70,6 % in 52,5 %), sončničnem olju-raf. (74,0 %), repičnem olju-raf. (71,0 %), repičnem olju-h.s. (79,0 %), olju pšeničnih kalčkov (60,0 % in 76,2 %), olju groznih pečk (79,0 %), sojinem olju (79,0 % in 55,3 %) in arašidovem olju (60,0 %). Pri $\beta+\gamma$ -tokoferolu so izstopali izkoristki za ričkovo olje (40 % in 78,5 %), sezamovo olje (72,0 %) ter sojino olje (60,3 %). Pri δ -tokoferolu pa je izstopal izkoristek sojinega olja, ki je bil 65,7 %.

Pravilnost metode smo potrdili z analizo certificiranega referenčnega materiala: Standard Reference Material® 3278: Tocopherols in Edible Oils. Pogoj, ki smo si ga postavili je bil, da naj bo koncentracija CRM-ja znotraj naše merilne negotovosti. Opravili smo analizo CRM-ja v 6-ih določitvah znotraj ene serije. Izkoristek glede na certificirane vrednosti tokoferolov pri α -tokoferolu je bil 94,8 %, pri β + γ -tokoferolu je bil 113,7 % in pri δ -tokoferolu 104,4 %.

Ponovljivost oz. natančnost v krajšem časovnem obdobju smo preverili na različnih matricah. Pogoj, ki smo si ga postavili za ponovljivost je bil, da naj bo RSD določitev <10 %. Večina določitev je bila znotraj pogoja. Izstopala je le določitev delta tokoferola v orehovem olju, kjer je bil RSD 10,7 %. Koncentracija analita je bila na spodnjem delu umeritvene krivulje. Obnovljivost oz. natančnost v daljšem časovnem obdobju smo tudi preverili na različnih matricah. Pogoj, ki smo si ga postavili, je bil, da naj bo RSD določitev <20 %. Večina določitev je izpolnjevala pogoj. Izstopala je le določitev alfa tokoferola v ričkovem olju, kjer je bil RSD 31,1 %. Koncentracija je bila na spodnjem delu umeritvene krivulje. Obnovljivost metode je bila določena v obdobju 20 dni in s tem smo hkrati potrdili obstojnost vzorcev 14 dni pri -18 °C.

Robustnost metode smo potrdili z analizo vzorcev arašidovega in sojinega olja, ki vsebujeta α -, β + γ - in δ -tokoferole. V prvem poskusu smo spremenili pretok z 1 mL/min na 1,1 mL/min. V drugem poskusu pa smo spremenili temperaturo kolone s 45 °C na 40 °C. Koncentracije vseh tokoferolov so bile primerljive tudi pri spremenjenih pogojih analize. Koncentracije analitov, določene pod spremenjenimi pogoji analize, so bile znotraj 20 % glede na koncentracije analitov, analiziranih z validirano metodo.

Merilno negotovost smo ocenili z analizo certificiranega referenčnega materiala: Standard Reference Material® 3278: Tocopherols in Edible Oils. V vsaki seriji določitev smo poleg analizirali tudi CRM v paralelkah. V obdobju dveh mesecev smo pridobili vrednosti v 11-ih serijah vzorcev. Ocenjena merilna negotovost za α -tokoferol je 7,3 %, za β + γ -tokoferol 20 % in za δ -tokoferol 21 %.

Naredili smo tudi primerjavo olj iz iste vrste rastline. Analizirali smo 7 vzorcev sončničnih olj, 4 vzorce oljčnih olj in 5 vzorcev bučnih olj. Vzorci sončničnih olj vsebujejo največ α -tokoferola: od 51,1 mg/100 g do 73,0 mg/100 g olja, β + γ -tokoferola pa od 3,8 mg/100 g do 5,3 mg/100 g olja. Delta tokoferola ne vsebujejo. Vzorci oljčnih olj vsebujejo samo alfa tokoferol in koncentracije so od 13,9 mg/100 g do 20,6 mg/100 g olja. Vzorci bučnih olj pa vsebujejo α -, β + γ - in δ -tokoferole. Koncentracije α -tokoferola se gibljejo od 2,3 mg/100 g do 8,2 mg/100g olja. Koncentracije β + γ -tokoferola so v območju od 40,6 mg/100 g do 49,9 mg/100 g olja. Koncentracije δ -tokoferola pa so od 8,7 mg/100 g do 11,0 mg/100 g olja.

Med validacijo smo ugotovili, da je pri nekaterih matricah potrebno dodatno spiranje kolone z metanolom med posameznimi vzorci, saj se v 13 min analize iz kolone niso

izločile vse komponente olja. S tem so posledično vplivale na analizo (bazno linijo) pri naslednjem vzorcu. Te matrice so sončnično olje, olje črne kumine, olje koruznih kalčkov, bučno olje in olje pšeničnih kalčkov.

6 Literatura

- [1] R. K. Saini, Y. -S. Keum: Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International* 82. **2016**, 59-70.
- [2] *Alpha-tocopherol*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14985#section=Top> (pridobljeno 10.12.2018)
- [3] *Beta-tocopherol*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6857447#section=Top> (pridobljeno 10.12.2018)
- [4] *Gamma-tocopherol*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92729#section=Top> (pridobljeno 10.12.2018)
- [5] *Delta-tocopherol*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92094#section=Top> (pridobljeno 10.12.2018)
- [6] M. Avsec: *Ocena varne uporabe fenolnih antioksidantov in njihovih derivatov v kozmetičnih izdelkih*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo 2015, magistrska naloga
- [7] M. Merljak, P. Jakob Merljak: *Olja za prehrano, zdravje in nego telesa*. Ljubljana: ČZD Kmečki glas, d.o.o. 2014, str. 19, 40, 55, 68, 82, 97, 102, 106, 122, 137, 168.
- [8] D. Janeš, N. Kočevar Glavač: *Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora. Velenje: Širimo dobro besedo, d.o.o. 2015, str. 284-286.*
- [9] Uradni list RS, Št.82/2003: *Pravilnik o prehranskih dopolnilih*. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2003-01-3942/pravilnik-o-prehranskih-dopolnilih> (pridobljeno 14.12.2018)
- [10] M. W. Dong: *Modern HPLC for Practicing Scientists*. New York: John Wiley & Sons 2016, str. 2–9.
- [11] V. R. Mayer: *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Chichester: John Wiley & Sons 2010, str. 9,59,91,96,101,117.
- [12] A. Koželj: *Validacija metod*. SP-II-NLZOH-CKA-07. 2017.
- [13] J. Zupan: *Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov*. Ljubljana: LITTERA PICTA d.o.o. 2009, str. 24, 39-42.

- [14] Slovenska akreditacija: Merilna negotovost pri kemijskem preskušanju v skladu s standardom SIST EN ISO/IEC 17025. 2006. <http://www.slo-akreditacija.si/files/documents/24/files/oa03.pdf> (pridobljeno 22.3.2019)
- [15] M. Križan, M. Novak: Določitev merilne negotovosti. SP-II-NLZOH-CKA-06. 2016.
- [16] E. Gimeno, A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventós, M. C. de la Torre, M. C. López-Sabater: Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2000**, 881, 251-254.
- [17] C. A. Rimmer, K. Putzbach, K. E. Sharpless, L. C. Sander, J. H. Yen: Preparation and Certification of Standard Reference Material 3287 Tocopherols in Edible Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 6794-6798.