

## VALIDACIJA PLINSKO KROMATOGRFSKE METODE ZA DOLOČANJE SESTAVE ETERIČNIH OLJ HMELJA

Miha OCVIRK<sup>16</sup> in Tanja POTOČNIK<sup>17</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 7. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 1. 12. 2017

### Izveček

Eterično olje hmelja ima pomembno vlogo v pivovarstvu, saj vpliva na okus in aromo piva. Od sestave eteričnega olja je odvisno, kateri tip arome prevladuje. Za pivovarje je pomembno, da vedo, kakšna je sestava eteričnega olja posamezne sorte hmelja, z namenom doseganje želene arome, zato na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije redno opravljamo kvalitativne in kvantitativne analize eteričnih olj hmelja. Z namenom optimizacije in skrajšanja analize ter pridobitve dodatnih validacijskih podatkov smo obstoječo metodo predstavili na novejši plinski kromatograf, ki omogoča hitrejšo analizo posameznega vzorca. Validacijski postopek je zajemal preverjanje selektivnosti, linearnosti, točnosti, natančnosti, določitev meje zaznavnosti in meje določanja.

**Ključne besede:** validacija, hmelj, eterično olje, plinska kromatografija

## VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF HOP ESSENTIAL OIL COMPOSITION BY GAS CHROMATOGRAPHY

### Abstract

Hop essential oils are of crucial importance for brewing industry, because they give beer its specific flavour and aroma. With intent to achieve desired aroma in beer, brewers need to know the composition of hop essential oils. At the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing all analyses of hop essential oils are performed according to the Analytica-EBC regularly. With intent to optimise and shorten the time of analysis, and to obtain confirmation of the validation data we moved our method to a newer GC instrument. Determination of validation parameters such as selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of determination was performed.

**Key words:** validation, hop, essential oil, gas chromatography

<sup>16</sup> Univ. dipl. inž. kem. tehnol. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: miha.ocvirk@ihps.si

<sup>17</sup> Univ. dipl. inž. živ. tehnol., prav tam, e-pošta: tanja.potočnik@ihps.si

## 1 UVOD

Eterično olje hmelja ima v pivovarstvu pomembno vlogo, saj daje pivu značilno hmeljno aromo. Eterično olje se nahaja v storžkih hmelja, natančneje v lupulinskih zrnih (Ocvirk in Košir, 2014). Z različno kombinacijo sort hmelja lahko v pivu dosežemo sadno, cvetlično, citrusno, zeliščno ali tipično hmeljno aromo (Čerenak s sod., 2011).

Suhi storžki hmelja vsebujejo med 0,5- 4,0 % eteričnih olj. Komponente olja glede na kemijsko strukturo delimo na ogljikovodike (75 %), spojine s kisikom (24 %) in žveplo vsebujoče spojine (1 %) (Fix, 1999; Šterba in sod., 2015).

S separacijsko tehniko, imenovano plinska kromatografija, je bilo zaznanih že več kot 1000 različnih komponent eteričnega olja, identificiranih pa 440 (Roberts, 2004; Almaguer in sod. 2014). Analiza se izvaja na aparatu, imenovanem plinski kromatograf, in temelji na ločbi komponent zaradi različne hlapnosti in polarnosti preiskovanih spojin. Vzorec injiciramo v zato predvideno mesto, ki je ogreto na določeno temperaturo, pri tem pa se vzorec upari. Nosilni plin, ki mora biti inerten, ponese uparjen vzorec skozi kolono v termostahirani pečici do detektorja. Najpogosteje uporabljen detektor je plamensko ionizacijski detektor. Ob prihodu iona na detektor naraste tok sorazmerno s koncentracijo analita v vzorcu. Detektor torej ne samo zazna komponente, ki se izločajo iz kolone in jih pretvarja v električni signal, ampak izmeri tudi intenziteto signala, ki je sorazmerna z množino neke spojine. Električni signal pretvorimo in vodimo na rekorder oz. integrator. Rezultati analize so podani v grafični obliki in se imenujejo kromatogrami. Vsak kromatografski vrh predstavlja določen analit iz vzorca.

Namen raziskave je predstavitev analizne metode iz starejšega plinskega kromatografa HP 5890A, ki ne podpira avtomatskega injiciranja vzorcev in interpretacije rezultatov, na novejšo napravo Agilent GC 6890. S tem smo želeli skrajšati čas, potreben za kvantitativno določitev sestave eteričnega olja hmelja, saj poteka interpretacija dobljenega kromatograma z računalniško opremo veliko hitreje. Metoda je bila na tej napravi uporabljena prvič, zato je bila potrebna celotna validacija analizne metode.

Validacija je postopek, ki temelji na določanju različnih parametrov, s katerimi zagotovimo zanesljivost metode. Parametri, ki jih pri validaciji določamo, so selektivnost, natančnost, točnost, linearnost, meja zaznavnosti in meja določljivosti (Rutnik, 2017). Validacijo smo izvedli na petih pomembnejših komponentah eteričnega olja hmelja: mircenu, geraniolu,  $\alpha$ -humulenu, borneolu in linalolu, ki so pokazatelji kvalitetne arome piva (Ocvirk in Košir, 2014).

## 2 METODE DELA

Pri delu smo uporabili homogeniziran povprečni vzorec petih vzorcev hmeljnega kultivarja Aurora, zbranih med vzorčenjem hmelja letnika 2016.

Pred kromatografsko analizo smo s parno destilacijo po metodi Analytica- EBC 7.10. (Analytica-EBC, 2007) pripravili eterično olje vzorca hmelja, ki smo ga skozi celoten čas izvajanja analiz hranili v hladilniku. Pred kromatografsko analizo na GC aparaturi je bilo potrebno eterično olje hmelja (0,1 mL) redčiti s heksanom (2 mL) analitske čistosti (Honeywell, Poljska). 2  $\mu$ L redčenega vzorca eteričnega olja smo pod specifičnimi pogoji (Analytica EBC, 2007) injicirali v injektor, segret na 180°C. Uporabili smo nepolarno kapilarno kromatografsko kolono HP-1 (25 m  $\times$  0,2 mm  $\times$  0,11  $\mu$ m) (Hewlett Packard, ZDA), prevlečeno z dimetilpolisiloksanom. Temperaturni program termostatisirane pečice je bil nastavljen na 1 min pri 60 °C, dvig temperature 2,5 °C/min do 190 °C, 1 min pri 190 °C, dvig temperature 70 °C/min do 240 °C in 11 min pri 240 °C. Pretok nosilnega plina je bil nastavljen na 25 mL/min.

Za obdelavo kromatogramov smo uporabili računalniško opremo GC ChemStation (Agilent Tehnologies, ZDA). Osnovna statistika, opravljena na šestih ponovitvah, s katero smo obdelovali dobljene rezultate, je bila narejena s programom MS Excel (Microsoft, ZDA).

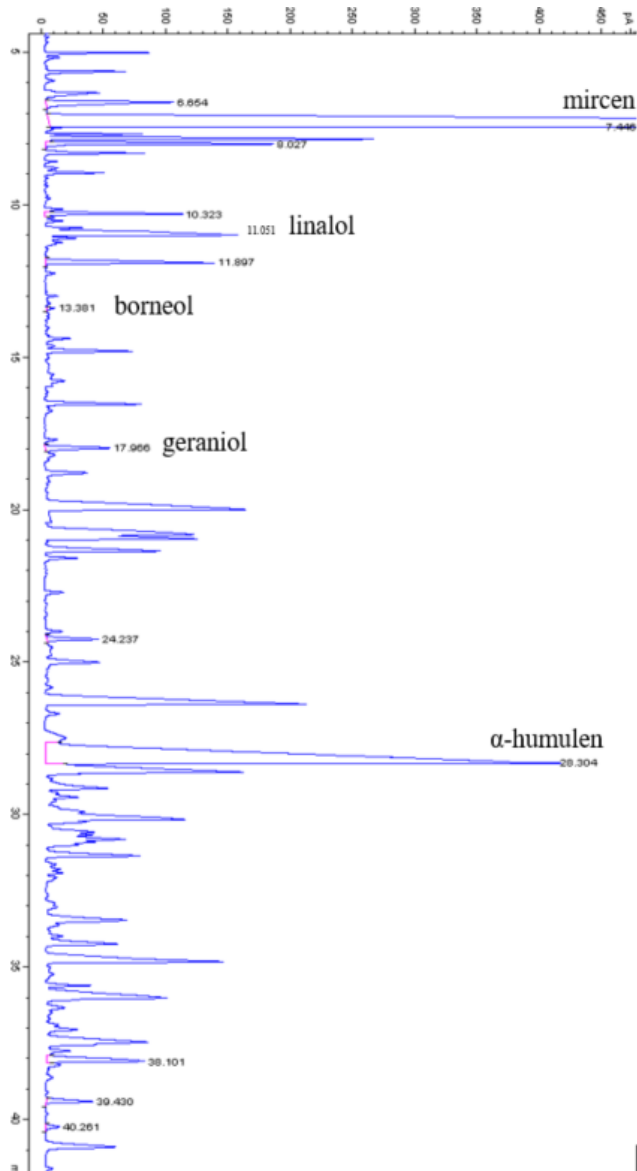
Standardi eteričnih olj, uporabljeni v validaciji, so bili kupljeni pri podjetju Sigma-Aldrich (Švica) in so bili vsi analitske čistosti, razen mircena, ki je bil tehniške čistosti  $\geq 95$  %.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Selektivnost. Da lahko metodo označimo za selektivno, mora biti izpolnjen pogoj, da so kromatografski vrhovi pri določenih retencijskih časih dobro ločeni. Če ta pogoj ni izpolnjen, je metoda neselektivna (Aslanyan in sod., 2016). Dobljene kromatograme smo primerjali z referenčnimi kromatogrami. Kromatografski vrhovi so bili simetrični in na kromatogramu dobro ločeni (slika 1), zato smo metodo opredelili za selektivno.

Natančnost. Vsaka izmerjena meritev se od prave vrednosti navadno vsaj malo razlikuje ali navzgor ali navzdol. Nihanje rezultatov podajamo s standardnim odmikom  $s$  oz. relativnim standardnim odmikom RSD, ki je izražen v odstotkih. Natančnost meritve je obratno sorazmerna s standardnim odmikom. Rečemo lahko tudi, da manjši kot je RSD, bolj natančna je analizna metoda. Natančnost je povezana z naravo meritve, lastnostmi aparature in sposobnostmi analitika, homogenostjo vzorca ter ponovljivimi parametri v okolju (Zupan, 2009; Rutnik,

2017). Kakovost ujemanja rezultatov dobljenih pri enakih pogojih opisuje *ponovljivost*. Kakovost ujemanja rezultatov dobljenih pri različnih pogojih opisuje *obnovljivost*.



**Slika 1:** Kromatogram preiskovanega eteričnega olja hmelja Aurora, posnet na novem plinskem kromatografu Agilent 6890.

Analize izvajamo z različnimi analitiki, v različnih delih dneva in letnega časa, uporabljajo se štiri grelnе kalote za vodno destilacijo itd ... Zato smo z vidika vsakodnevnе uporabe analize natančnost metode preverili z obnovljivostjo. Izvedli smo sedem destilacij z vodno paro ter kvantitativno in kvalitativno analizo dobljenega eteričnega olja. Definirali smo, da je metoda natančna, če je RSD manjši od 20 %. Pri mircenu metoda tega pogoja ne izpolnjuje, saj je RSD 31,76 %, a je zaradi zelo velikega relativnega deleža v olju in njegove velike hlapnosti to vseeno dober rezultat, zato potrjujemo, da je naša metoda pri pogojih obnovljivosti natančna tudi za mircen (preglednica 1). RSD za ostale analite so bili med 3,54 in 4,85 %, kar je sprejemljivo.

Točnost. Podamo jo kot razliko med pravo in izmerjeno vrednostjo (Zupan, 2009). Točnost podamo kot izkoristek metode. Znani koncentraciji komponente smo z metodo standardnega dodatka povečali in z umeritveno krivuljo izračunali koncentracijo. Sprejemljiv kriterij za točnost metode je bil, da so vsi izkoristki med 70 % in 120 %. Rezultati izkoristka metode za posamezne komponente so predstavljeni v preglednici 2. Vsi izkoristki so med 80,2 % in 102,3 %, zato lahko zaključimo, da je metoda točna.

**Preglednica 1:** Povprečna koncentracija analita v vzorcu, standardni odmik in relativni standardni odmik, izračunani na šestih ponovitvah

Komponenta eteričnega olja	Povprečna koncentracija (mg/kg)	s (mg/kg)	RSD (%)
mircen	618,6	196,5	31,76
linalol	112,8	4,00	3,54
geraniol	33,26	1,26	3,80
borneol	3,15	0,15	4,85
$\alpha$ -humulen	588,75	12,35	2,10

**Preglednica 2:** Izkoristek metode in standardni odmik za preiskovane analite

Komponenta eteričnega olja	Izkoristek (%)	s (%)
mircen	102,3	2,4
linalol	92,7	13,9
geraniol	80,2	9,4
borneol	94,2	7,8
$\alpha$ -humulen	100,6	4,6

Linearnost. Linearnost metode je sposobnost, da v določenim območju dobimo linearno proporcionalne odzive detektorja v odvisnosti od koncentracije vzorca

(Zupan, 2009; Rutnik, 2017). V praksi se lahko zgodi, da umeritvena krivulja ni linearna v celotnem koncentracijskem območju. Takrat jo lahko razdelimo na več manjših in tam preizkusimo linearnost, če je korelacijski faktor premice večji ali enak 0,99.

Za določanje linearnosti metode smo pripravili mešanico standardov različnih koncentracij v pričakovanem koncentracijskem območju. Pričakovane masne koncentracije so izračunane iz baze podatkov o relativnem deležu (%) komponent v eteričnem olju hmelja pri metodi MIN-MAX za določanje sortne čistosti hmelja (Kač in Kovačevič, 2000). V preglednici 3 so predstavljene pripravljene koncentracije. Iz rezultatov linearnosti (preglednica 4) vidimo, da so korelacijski faktorji vseh komponent večji od 0,99, kar potrjuje linearnost metode v območju predvidenih koncentracij.

**Preglednica 3:** Različne koncentracije standardnih raztopin preiskovanih komponent

Komponenta eteričnega olja	1. konc. $\gamma(\text{g/L})$	2. konc. $\gamma(\text{g/L})$	3. konc. $\gamma(\text{g/L})$	4. konc $\gamma(\text{g/L})$	5. konc $\gamma(\text{g/L})$
mircen	5,44	10,89	13,62	16,34	21,79
linalol	0,24	0,47	0,59	0,71	0,94
geraniol	0,16	0,32	0,40	0,48	0,64
borneol	0,02	0,05	0,06	0,07	0,09
$\alpha$ -humulen	-	9,36	11,70	14,04	18,72

**Preglednica 4:**  $R^2$  vrednosti in območje linearnosti preiskovanih komponent

Komponenta eteričnega olja	$R^2$	Območje linearnosti
mircen	0,9996	2,70 – 27,20
linalol	0,9994	0,24 – 1,18
geraniol	0,9986	0,16 – 0,81
borneol	0,9940	0,02 – 0,12
$\alpha$ -humulen	0,9946	9,36 – 23,40

Meja zaznavnosti (Limit of detection - LOD). Najnižjo koncentracijo analita v vzorcu, ki jo še lahko zaznamo, ne moremo pa je kvantitativno ovrednotiti, imenujemo meja zaznavnosti. Določimo jo iz odseka in napake umeritvene krivulje (Tevž, 2014). Meje zaznavnosti so predstavljene v preglednici 5.

Meja določljivosti (Limit of quantification - LOQ). Najmanjša možna koncentracija analita, ki jo še lahko kvantitativno določimo, imenujemo meja določljivosti. Izračuna se iz umeritvene krivulje in standardnega odmika (Tevž,

2014). Meje detekcije so predstavljene v preglednici 5. Vse meje zaznavnosti in določljivosti so zadovoljivo nizke, razmeroma visoka je le meja določljivosti  $\alpha$ -humulena.

**Preglednica 5:** Meja zaznavnosti in meja detekcije preiskovanih komponent

Komponenta eteričnega olja	Meja zaznavnosti (g/L)	Meja določljivosti (g/L)
mircen	0,55	1,85
linalol	0,03	0,09
geraniol	0,03	0,09
borneol	0,01	0,02
$\alpha$ -humulen	2,37	7,91

#### 4 ZAKLJUČEK

S tem, ko je bila metoda ponovno uvedena na novejšem instrumentu, smo prepolovili čas, potreben za interpretacijo rezultatov. Na novo smo določili vrednosti validacijskih parametrov, ki so izpolnjevali predhodno postavljene zahteve. Rezultati le teh dokazujejo, da je metoda lahko uporabna za nadaljnje analize eteričnih olj sort hmelja v posodobljeni različici.

**Zahvala.** Raziskovalni program št. 020-2/2011-3 je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

#### 5 VIRI IN LITERATURA

- Almaguer C., Schönberger C., Gastl M., Arendt EK, Becker T. Humulus Lupulus – a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of brewing and Distilling*. 2014; 120: 289-314.
- Analytica-EBC. Section 7 – Hops, Method 7.10 in 7.12; Carl, Getränke-Fachverlag, Nürnberg, 2007.
- Aslanyan M.A., Bobritskaya L.A., Nazarova E.S., Mirnaya T.A., in Zborovskaya T.V. Development and validation of a gas chromatography method for quantitative determination of lavender oil in lavaflam preparation. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016; 50: 200-204.
- Čerenak M., Pavlovič M., Oset Luskar M. in Košir IJ. Characterization of Slovenian hop (*Humulus lupulus* L.) varieties by analysis of essential oil. *Hop Bulletin*. 2011; 18: 27-32
- Fix G. Principles of brewing science – a study of serious brewing issues 2nd edition; Brewers publication, Boulder, USA, 1999.
- Kač M., Kovačevič M. Presentation and determination of hop (*Humulus Lupulus* L.) cultivars by a min-max model on composition of hop essential oil. *Monatsschr. Brauwissenschaft*. 2000; 53: 180-184.

- Ocvirk M., Košir I.J. Pomen linalola v pivovarstvu = Importance of linalool in brewing. *Hmeljarski bilten*. 2014; 21: 68-73.
- Roberts M.T., Dufour J.P., Lewis A.C. Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC6GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *Journal of Separation Science*. 2004; 27: 473-478.
- Rutnik K. Optimizacija in validacija metode za določanje sestave eteričnih olj hmelja s plinsko kromatografijo - diplomsko delo, Univerza v Mariboru, 2017.
- Štěrba K, Čejka P, Čulík J, Jurková M, Krofta K, Pavlovič M, Mikyška A and Olšovská J, Determination of Linalool in Different Hop Varieties Using a New Method Based on Fluidized-Bed Extraction with Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Detection, *Journal of American brewing society for brewing chemistry*. 2015; 73: 151–158.
- Tevž D. Validacija plinsko kromatografske metode za določanje vsebnosti ogljikovodikov C10-C40 v tleh in odpadkih. Diplomsko delo, Univerza v Maribor, 2014.
- Zupan J. Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov. *Inštitut nove revije, zavod za humanistiko in kemijski inštitut*, Ljubljana, 2009.