

APARATURA BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Zastosowanie analizy związków lotnych techniką HS-SPME-GC/MS w badaniach autentyczności wybranych produktów spożywczych

MARCIN BRYŁA, ANNA BEREZIŃSKA, AGNIESZKA OBIEDZIŃSKA, MIECZYŚLAW
OBIEDZIŃSKI

SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE, WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI

STRESZCZENIE

Na podstawie badań własnych wykonanych w ostatnich latach dokonano przeglądu możliwości wykorzystania techniki analizy fazy nadpowierzchniowej (head-space) za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME – solid phase microextraction) i analizy na drodze chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Obiektami badań były kawy Arabica i Robusta, sery pleśniowe, bio-oleje roślinne oraz sery pleśniowe. Celem pracy była ocena przydatności wybranych wyróżników składu chemicznego ziarna kawowego do rozróżniania kaw różnych gatunków i o różnym pochodzeniu geograficznym oraz serów pleśniowych. W zależności od obiektów, badania związków lotnych uzupełniano badaniami innych związków występujących w matrycy żywnościowej m.in.: steroli, składu kwasów tłuszczowych. Uzyskane wyniki poddane zostały statystycznej analizie składowych głównych (PCA). W oparciu o analizę związków lotnych uzyskano dość wyraźne grupowanie pod względem pochodzenia geograficznego. Wskazano również na możliwości wykorzystania techniki HS-SPME-GCMS jako specyficznego i skutecznego e-Nosa dla celów autentyczności i identyfikowalności produktów spożywczych. Dotychczasowe rezultaty badań wskazują na dalsze, różnorodne możliwości zastosowania sprzężonych technik analitycznych w analizie jakości i bezpieczeństwa żywności.

Appliance of volatile analysis technique HS-SPME-GC/MS in the studies of authenticity of chosen food products

ABSTRACT

Our work carried out in recent years was scoped to investigate the possible use of solid-phase head space micro extraction techniques coupled to gas chromatography - mass spectrometry to the food analysis. The aim of this study was to evaluate the usefulness of the product chemical composition as a factor allowing to distinguish different species of coffee and blue cheeses and differentiate its geographical origin. Arabica

and Robusta coffee, blue cheese and various bio-oils samples were taken into investigation. Composition of the volatile headspace fraction was determined. Additional chemical analysis including determination of the fatty acid composition and sterol contents was also performed. Obtained results were statistically analyzed applying principal component analysis (PCA). Results of this study revealed that determination of the volatile fraction composition was sufficient to differentiate the sample geographical origin, and the fairly clear grouping was obtained. The possibility of HS-SPME technique GC-MS as a specific and effective e-nose for authenticity and traceability of food products was also indicated. Results of this and previous research indicate various further possibilities of the combined analytical techniques application in the area of food quality and food safety.

1. WSTĘP

Prawo Unii Europejskiej stawia wysoko kwestię ochrony konsumentów przed nieuczciwymi praktykami ze strony producentów żywności. W pogoni za zyskiem ekonomicznym producenci żywności łamiąc prawo, nie stosują się do wymagań autentyczności i identyfikowalności żywności. Rozwój technik analitycznych otwiera nowe możliwości dla badań nad autentycznością żywności. Spośród technik analitycznych, zauważa się niesłabnącą popularność technik chromatograficznych i spektrometrycznych, które mogą być skuteczne w ocenie autentyczności żywności.

Asortyment produktów spożywczych takich jak kawy, oleje, czy sery pleśniowe jest bardzo szeroki i obejmuje produkty zróżnicowane zarówno pod względem obróbki technologicznej surowca jak i pochodzenia geograficznego. Szerokość asortymentu i zróżnicowanie cenowe wymienionych produktów wyraźnie sugeruje istnienie różnic jakościowych. To z kolei wydaje się zależeć od pochodzenia geograficznego.

2. METODYKA I MATERIAŁ BADAWCZY

Materiał badawczy stanowiło pięć kaw z gatunku arabika pochodzących z Kolumbii (K), Gwatemali (G), Kostaryki (CR), Brazylii (B) i Etiopii (E). Próbkę palonego ziarna kawowego otrzymano od pobliskiej palarni. Podobnie uzyskano próbki ziarna kawy Robusta (R, kraj pochodzenia: Indie) z końcowego etapu palenia.

Próbki z końcowego etapu palenia (ziarno palone) pobrano w piętnastej minucie, gdy temperatura osiągnęła 208°C. Proces palenia przeprowadzono w piecu firmy PROBAT.

Ziarno przechowywano w szczelnie zamkniętych torebkach aluminiowych w warunkach pokojowych. Ziarna kawy mielono w młynku laboratoryjnym firmy Retsh Grindomix bezpośrednio przed przystąpieniem do analiz.

Wykonano analizy frakcji nadpowierzchniowej metodą SPME-GC/MS, analizy składu kwasów tłuszczowych i steroli metodą GC-MS.

2.1. Analiza związków lotnych

W celu przeprowadzenia analizy frakcji lotnej, do 250-mililitrowego słoika odważono 2 g świeżo zmielonego ziarna z dokładnością do 0,001 g. Dodawano 1 µl standardu wewnętrznego (roztwór 1,2-dichlorobenzenu o stężeniu 1µl/ml). Słoik zamykano i umieszczano w termostacie. Do słoika wprowadzano igłę SPME, wysuwano włókno (CAR/PDMS/DVB) i prowadzono ekstrakcję składników fazy nadpowierzchniowej przez 30 min. w temperaturze 40°C. Po zakończeniu ekstrakcji włókno wsuwano do igły i przenoszono do komory nastrzykowej chromatografu gazowego.

Składniki fazy nadpowierzchniowej rozdzielano i identyfikowano w chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC/MS-QP20105, Schmiadzu). Warunki rozdziału chromatograficznego: temperatura komory nastrzykowej: 222°C, gaz nośny: hel, ciśnienie gazu nośnego: 51,7 kPa, przepływ w kolumnie: 1,03 ml/min, dzielnik strumienia: 1:24,3; prędkość liniowa gazu nośnego: 36,6 cm/s, rodzaj kolumny: ZB-WAX, długość – 30,0 m, grubość fazy stacjonarnej – 0,25 µm, średnica wewnętrzna – 0,25 µm. Warunki pracy spektrometru mas: temperatura źródła jonów – 220°C, napięcie na detektorze – 1,07 kV, szybkość przemieszczania (skanowania) – 5000, zakres przemieszczania – 39,00-450,00 (m/z), tryb pracy spektrometru – całkowity prąd jonowy (TIC).

Zawartość związków wyrażono w postaci ilorazów powierzchni pików składników frakcji lotnej przez powierzchnię pików standardu wewnętrznego. Dla każdego rodzaju kawy analizę przeprowadzono w dwóch niezależnych powtórzeniach.

2.2. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych

W celu wykonania analizy zawartości składu kwasów tłuszczowych do próbek wirówkowych naważono

0,5 g świeżo mielonej kawy. Następnie dodawano 6 ml acetonu i prowadzono ekstrakcję tłuszczu w wirówce przez 5 min. przy 8000 obrotach/min. Po ekstrakcji pobierano 2 ml fazy acetonowej do zważonej probówki, dodawano 0,1 ml standardu wewnętrznego (kwas heneikozanowy, C21:0) i odparowywano aceton w strumieniu azotu do sucha. Następnie do probówki zawierającej tłuszcz dodawano 1,5 ml heksanu oraz 0,5 ml 0,5 M KOH w metanolu i prowadzono metylację przez 0,5 godziny, wstrząsając okresowo próbkę. 1 ml fazy heksanowej przelewano do ampułki zawierającej 4 ml kwasu cytrynowego. Następnie 0,7 ml fazy heksanowej pobierano do ampułki zawierającej bezwodny siarczan sodu w celu usunięcia ewentualnych pozostałości wody. Do fiołki chromatograficznej pobierano 0,5 ml przesącza. Do analizy chromatograficznej pobierano 1 µl próbki. Warunki rozdzielania chromatograficznego: temperatura komory nastrzykowej – 230°C, gaz nośny – hel; ciśnienie gazu nośnego – 104,4 kPa; przepływ w kolumnie – 0,88 ml/min, dzielnik strumienia – 1:30,0; prędkość liniowa gazu nośnego: 24,1 cm/s, rodzaj kolumny – BPX90, długość – 60,0 m, grubość fazy stacjonarnej – 0,25 µm, średnica wewnętrzna: 0,25 mm. Warunki pracy spektrometru mas: temperatura źródła jonów – 200°C, temperatura linii łączącej – 220°C, napięcie na detektorze – 0,5 kV, szybkość przemiatań (skanowania) – 5000, zakres przemiatań – 50,00-500,00 (m/z); tryb pracy spektrometru – całkowity prąd jonowy (TIC).

2.3. Analiza zawartości steroli

W celu oznaczenia zawartości steroli do próbek wirówkowych naważono 1 g świeżo zmielonej kawy, następnie dodawano 6 ml acetonu i prowadzono ekstrakcję tłuszczu w wirówce przez 10 min. przy 8000 obr./min. Do probówki zważonej z dokładnością do 0,0001 g przelewano 3 ml fazy acetonowej, dodawano 100 µl standardu wewnętrznego (5- α -cholestan o stężeniu 20 mg/50 ml w chloroformie) i odparowywano w strumieniu azotu. Po odparowa-

niu acetonu i chloroformu dodawano 1,5 ml heksanu i 0,5 ml 0,5 M KOH w metanolu w celu przeprowadzenia transestryfikacji. Proces przeprowadzono w temperaturze pokojowej przez 0,5 godziny, wytrząsając próbkę w równych odstępach czasu. Po ukończonej transestryfikacji 200 µl roztworu frakcji niezmydlonej przenoszono do fiołki chromatograficznej i odparowywano rozpuszczalniki w strumieniu azotu. Następnie dodawano 100 µl odczynnika BSTFA z 1% TCMS oraz taką samą ilość pirydyny. Próbkę wytrząsano i prowadzono proces upochodnienia przez 24 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodawano 1 ml heksanu. Do analizy chromatograficznej pobierano 1 µl próbki.

Warunki rozdzielania chromatograficznego: temperatura komory nastrzykowej – 250°C, gaz nośny – hel, ciśnienie gazu nośnego – 52,3 kPa, przepływ w kolumnie – 0,98 ml/min, dzielnik strumienia – 1:10,0; prędkość liniowa gazu nośnego – 36,0 cm/s, rodzaj kolumny: DB-5ms, długość – 30,0 m, grubość fazy stacjonarnej – 0,25 µm, średnica wewnętrzna – 0,25 mm. Warunki pracy spektrometru mas: temperatura źródła jonów – 230°C, temperatura linii łączącej – 240°C, napięcie na detektorze – 1,3 kV, szybkość przemiatań (skanowania) – 2000, zakres przemiatań – 100,00-600,00 (m/z), tryb pracy spektrometru – całkowity prąd jonowy

3. OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

3.1. Analiza składu kwasów tłuszczowych

W tłuszczu badanych kaw zidentyfikowano 7 kwasów tłuszczowych: palmitynowy (C16:0), stearynowy (C18:0), oleinowy (C18:1), linolowy (C18:2), linolenowy (C18:3), arachidowy (C20:0) i behenowy (C22:0). Wyniki analizy składu kwasów tłuszczowych dla kaw palonych zestawiono w Tabeli 1.

Najwyższy udział procentowy stwierdzono dla kwasów linolowego (średnio ok. 45,0%) i palmitynowego (średnio ok. 35,0%) (Tab. 1). Kwasy stearynowy i oleinowy występowały w pośrednich ilościach (ok.

Tabela 1. Wyniki analizy składu kwasów tłuszczowych badanych kaw palonych

Kraj pochodzenia	Udział kwasów tłuszczowych w próbkach badanych kaw [%]						
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C20:0	C 18:3	C 22:0
B	34,1	7,9	11,7	42,5	2,2	1,1	0,4
E	35,6	6,7	8,2	45,8	1,7	1,4	0,3
G	36,1	6,8	7,3	46,2	2,1	1,1	0,3
CR	35,4	6,6	8,1	45,7	2,3	1,3	0,3
K	35,3	7,2	9,4	44,0	2,2	1,4	0,3
I (Robusta)	35,5	6,6	8,0	45,6	2,3	1,6	0,4

6,5-11,0%). Udziały kwasów arachidowego i linolenowego nie przekraczały 2,3%, zaś kwasu behenowego – 0,4%. Kawy kostarykańskie charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością kwasu C18:2 od pozostałych.

Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi. Przykładowo, Clarke i Vitzthum [1] zidentyfikowali wszystkie wymienione powyżej związki oraz kwas lignocerowy w tłuszczu zielonych ziaren Arabiki i Robusty. Martín i wsp. [2] oznaczyli 10 kwasów tłuszczowych w próbkach kaw zielonych i palonych (Arabiki i Robusty) o różnym pochodzeniu geograficznym, w tym kwasy mirystynowy (C14:0), palmitoleinowy (C16:1) i eikozenowy (C20:1), których nie wykryto w bieżącym badaniu. W celu zredukowania wymiarowości zjawiska i zilustrowania zależności między oznaczonymi kwasami tłuszczowymi dane poddano analizie metodą składowych głównych (SG). Do opisu doświadczenia wybrano trzy pierwsze składowe główne objaśniające ogółem 88,59% zmienności całkowitej.

Pierwsza składowa główna opisywała 41,72% całkowitej zmienności i była dość silnie dodatnio skorelowana (współczynniki korelacji 0,692 i wyższe) z kwasami C18:1, C18:0, C20:0 i C22:0 (Wyk. 1 i 3). Pierwsza składowa główna odróżniła próbki kaw etiopskich i kostarykańskich od kaw kolumbijskich i brazylijskich, które zawierały więcej kwasów C18:0 i C18:1, z którymi składowa była silnie dodatnio skorelowana (Wyk. 2 i 4).

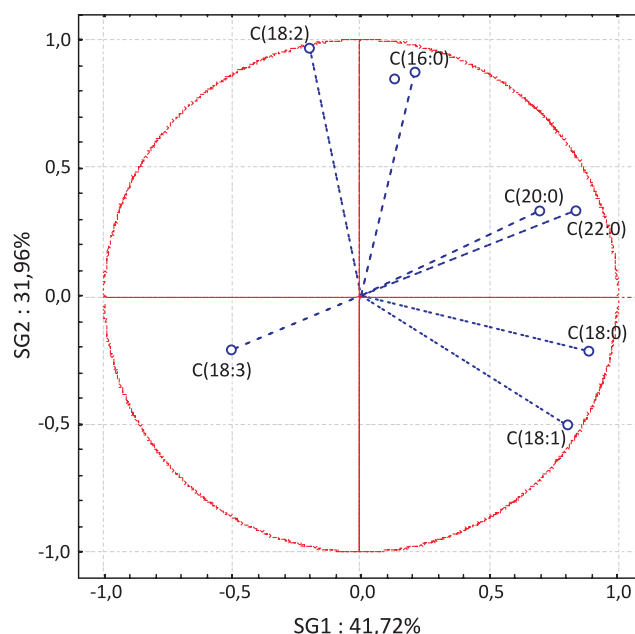
Druga składowa główna, opisująca 31,96% zmienności całkowitej, rozróżniła próbki kaw brazylijskich i etiopskich od gwatemalskich (Wyk. 2). Kawy brazylijskie zawierały więcej kwasu C18:1 i C18:0, podczas gdy kawy gwatemalskie charakteryzowały się większą zawartością kwasów C18:2 i C16:0.

Omawiana składowa główna przyjmowała słabe ujemne współczynniki korelacji, odpowiednio -0,214 i -0,506, z kwasami C18:0 i C18:1 oraz silne dodatnie współczynniki korelacji (0,862 i 0,966) z kwasami C16:0 i C18:3 (Wyk. 1).

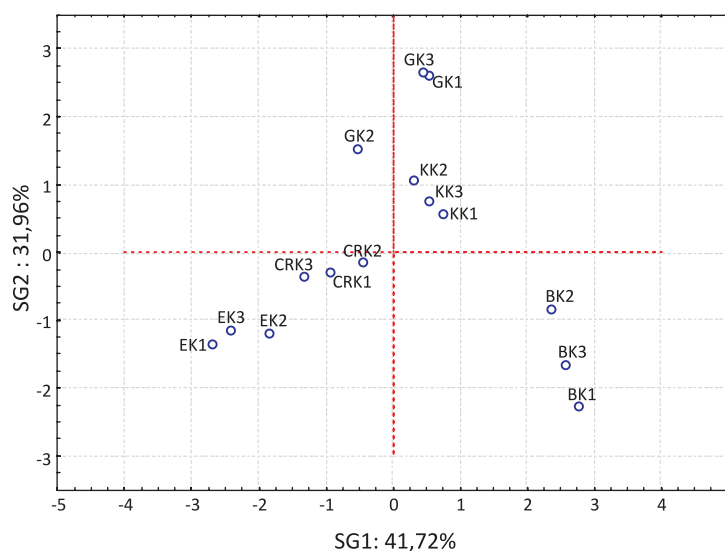
Trzecia składowa główna (14,91% całkowitej zmienności) odróżniła próbki kaw kolumbijskich od pozostałych (Wyk. 4). Kawy kolumbijskie odznaczały się najwyższą zawartością kwasów palmitynowego i linolenowego, z którymi omawiana składowa była skorelowana ujemnie (Wyk. 3).

Uzyskane wyniki sugerują, że możliwe jest różnicowanie kaw ze względu na pochodzenie geograficzne w oparciu o analizę składu kwasów tłuszczowych. Trudno jest jednoznacznie wskazać związek kluczowy dla odróżnienia

konkretnej kawy od pozostałych. Oznaczone kwasy tłuszczowe występowały we wszystkich badanych kawach. Obserwowane grupowanie mogło być zatem efektem różnic ilościowych w profilach kwasów tłuszczowych. Rozwiązaniem tego problemu może być analiza wartości sztucznych zmiennych, składowych głównych, konstruowanych w oparciu o wartości wszystkich zmiennych wyjściowych (zawartości kwasów tłuszczowych). Zastosowanie analizy składowych głównych umożliwia również redukcję wymiarowości zjawiska i wzrokową ocenę zależności między próbkami kaw.



Wykres 1. Współczynniki korelacji kwasów tłuszczowych z pierwszą i drugą SG – kawy z końcowego etapu palenia



Wykres 2. Analiza składu kwasów tłuszczowych. Wartości pierwszej i drugiej SG dla kaw z końcowego etapu palenia

Kawy z końcowego etapu palenia – porównanie Arabiki i Robusty

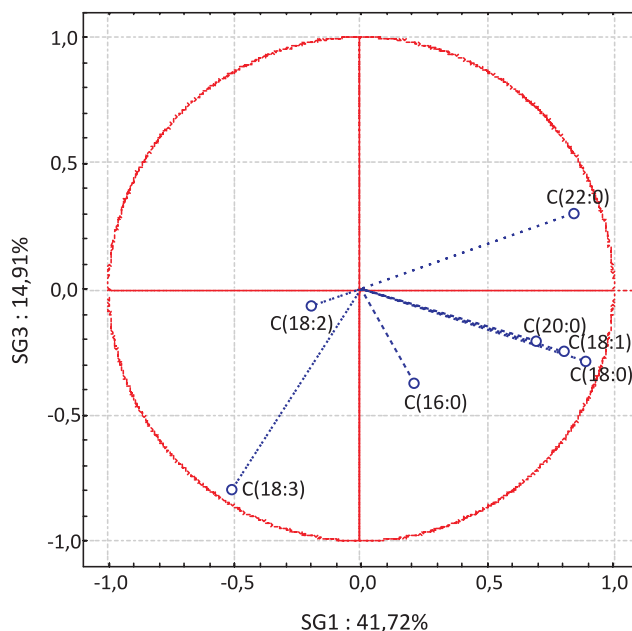
Analiza wariancji wykazała, że kawa Robusta odznaczała się istotnie wyższą zawartością wszystkich oznaczonych kwasów tłuszczowych od badanych kaw Arabica. Ogólnie wyższa zawartość kwasów tłuszczowych w kawie Robusta znalazła odzwierciedlenie w wynikach analizy składowych głównych. Uzyskany efekt grupowania kaw palonych (z uwzględnieniem kawy Robusta) w układzie dwóch pierwszych składowych głównych objaśniających ogółem 84,37% zmienności całkowitej zilustrowano na Wykresie 6. Pierwsza składowa główna miała ujemne współczynniki korelacji ze wszystkimi kwasami tłuszczowymi (Wyk. 5) i odróżniła kawę Robusta od kaw Arabica. Martín i wsp. [2] stwierdzili, że próbki kawy arabskiej odznaczały się wyższą zawartością kwasu linolenowego od próbek Robusty, zaś próbki kawy koszykowej charakteryzowała wyższa zawartość kwasu oleinowego. W omawianym badaniu nie stwierdzono podobnej zależności, co mogło być spowodowane różnicami w parametrach technologicznych procesu palenia oraz w metodyce ekstrakcji tłuszczu (autorzy wspomnianej publikacji wykorzystali metodę Soxhleta). Ponadto, autorzy artykułu nie podają bliższych informacji o pochodzeniu geograficznym badanych przez siebie próbek.

3.2. Analiza zawartości steroli

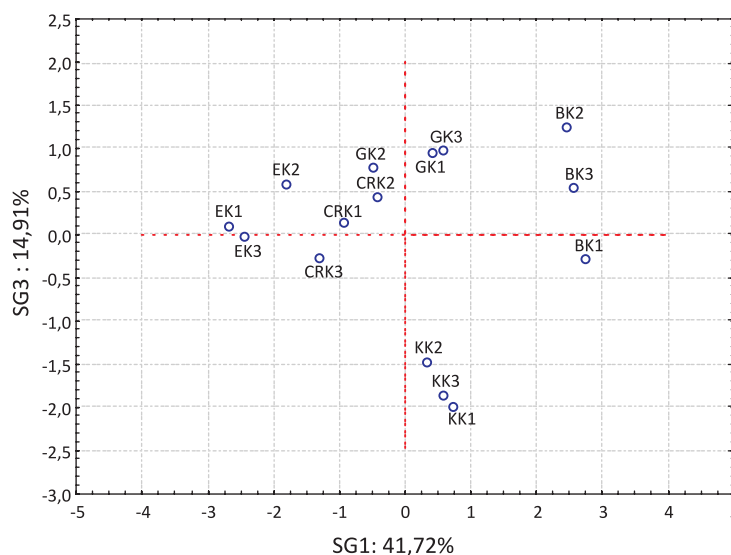
W próbkach badanych kaw zidentyfikowano 3 sterole: kampesterol, stigmasterol i β -sitosterol. Wyniki analizy zawartości steroli zestawiono w Tabeli 2.

Dominującym sterolem badanych kaw był β -sitosterol. W najmniejszych ilościach (średnio kilkanaście %) występował kampesterol. Wymienione trzy związki są głównymi desmetylosterolami kaw [3]. Speer i Kölling-Speer [4] wykryli 14 różnych steroli we frakcji tłuszczowej kaw Arabica i Robusta. Obok β -sitosterolu, stigmasterolu i kampesterolu autorzy zidentyfikowali m.in. sitostanol, Δ^5 -awenasterol i Δ^7 -awenasterol. Stwierdzone różnice jakościowe w składzie steroli między uzyskanymi wynikami a danymi literaturowymi mogą wynikać z różnic w zastosowanej metodyce oznaczania steroli. Przykładowo, Carrera i wsp. [5] ekstrahowali tłuszcz metodą Soxhleta, zaś do wykrycia i identyfikacji związków lotnych wykorzystywali detektor płomieniowo-jonizacyjny.

W celu zilustrowania zależności między oznaczonymi sterolami i sprawdzenia możliwości grupowania kaw



Wykres 3. Współczynniki korelacji kwasów tłuszczowych z pierwszą i trzecią SG – kawy z końcowego etapu palenia



Wykres 4. Analiza składu kwasów tłuszczowych. Wartości pierwszej i trzeciej SG dla kaw z końcowego etapu palenia

Tabela 2. Procentowy udział steroli w badanych kawach

Kraj	Udział steroli [%]		
	Kampesterol	Stigmasterol	β -sitosterol
B	11,9	27,4	44,3
E	23,1	44,3	58,8
G	16,4	33,6	56,7
CR	13,7	28,2	45,7
K	16,2	27,4	52,2
R	18,2	34,3	55,4

ze względu na pochodzenie geograficzne w oparciu o analizę steroli dane poddano analizie metodą składowych głównych.

Pierwsza składowa główna wyjaśniała 88,79% zmienności całkowitej. Była silnie ujemnie skorelowana ze wszystkimi sterolami (Wyk. 7). Przyjmowała dodatnie wartości dla kaw brazylijskich i kostarykańskich, bliskie zeru dla kaw gwatemalskich i kolumbijskich oraz ujemne wartości dla kaw etiopskich (Wyk. 8). Pierwsza składowa główna odróżniła kawy etiopskie i gwatemalskie od pozostałych, co spowodowane było różnicą w ogólnej zawartości steroli między kawami. Kawy etiopskie odznaczały się istotnie wyższą zawartością wszystkich steroli od pozostałych kaw (Tab. 2). Kawy gwatemalskie charakteryzowała istotnie wyższa zawartość stigmasterolu (Tab. 2) oraz wysoka zawartość kampesterolu w porównaniu z kawami Kostaryki, Brazylii i Kolumbii.

Druga składowa główna, objaśniająca 8,70% zmienności całkowitej, oddzieliła próbki kaw gwatemalskich i kolumbijskich od pozostałych badanych kaw (Wyk. 8). Prawdopodobnie główną przyczyną rozdziału były różnice w zawartości kampesterolu – analiza wariancji (Tab. 2) wykazała, że kawy brazylijskie charakteryzowały się istotnie niższą zawartością tego sterolu od kaw kostarykańskich, gwatemalskich i kolumbijskich, zaś druga składowa główna wykazywała słabą dodatnią korelację (współczynnik korelacji równy 0,372) z zawartością tego sterolu (Wyk. 7).

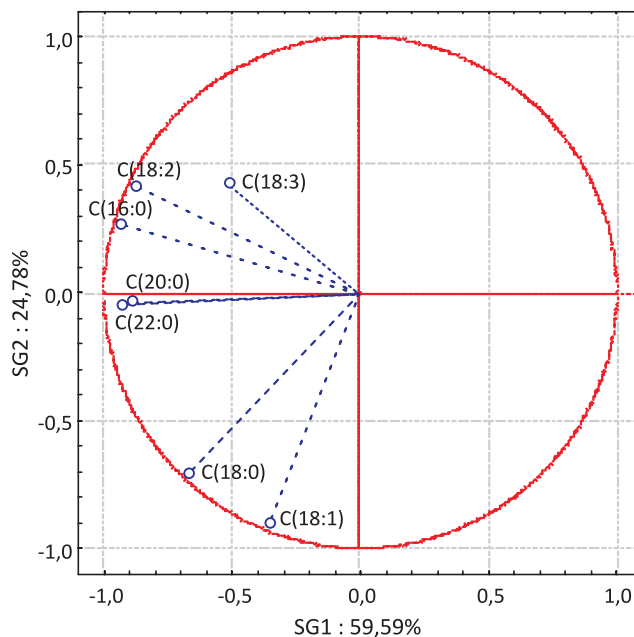
Porównanie zawartości β -sitosterolu, stigmasterolu i kampesterolu wykazało, że kawy etiopskie charakteryzowały się najwyższą średnią zawartością steroli spośród badanych kaw. Również kawy gwatemalskie charakteryzowały się wyższą zawartością steroli od kaw z Kolumbii, Brazylii i Kostaryki.

Kawy z końcowego etapu palenia – porównanie Arabiki i Robusty

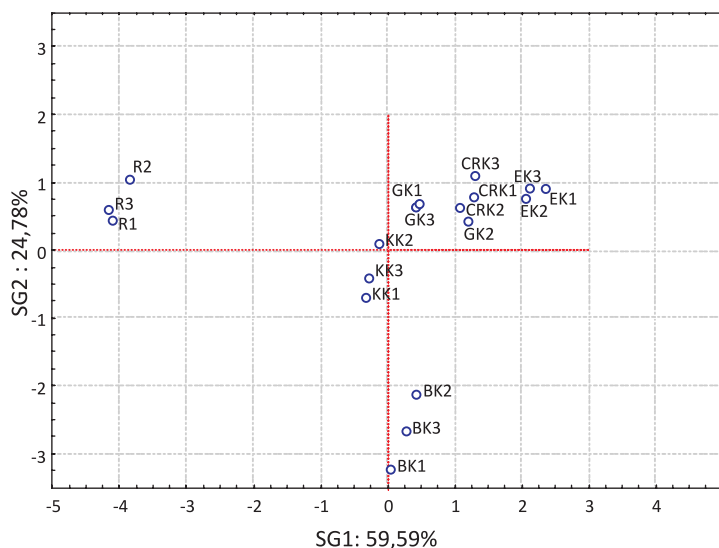
Po włączeniu do analizy kawy Robusta (Wyk. 10) zauważono, że próbki tej kawy utworzyły pod względem wartości pierwszej i drugiej składowej głównej jedną grupę z kawami gwatemalskimi. Było to prawdopodobnie spowodowane podobnym składem ilościowym oznaczonych steroli (Tab. 2).

Uzyskane wyniki różnią się od danych literaturowych. Carrera i wsp. [5] wykazali, że pomiar zawartości steroli może być podstawą do rozróżniania między kawami arabskimi i koszykowymi. Do podobnych wniosków doszli Speer i Kölling-Speer [4].

Przyczyną stwierdzonych różnic między wynikami doświadczenia a danymi literaturowymi mogły być



Wykres 5. Współczynniki korelacji kwasów tłuszczowych z pierwszą i drugą SG – porównanie Arabiki i Robusty



Wykres 6. Analiza składu kwasów tłuszczowych. Wartości pierwszej i drugiej SG – porównanie Arabiki i Robusty

znowu różnice w metodyce skutkujące odmienną ilością zidentyfikowanych steroli. Wg Carrera i wsp. [5] za rozróżnienie między Arabiką i Robustą odpowiedzialne są sitostanol i $\Delta 5$ -awenasterol, zaś wg Speera i Kölling-Speer [4] – $\Delta 5$ -awenasterol i 24-metylencholesterol.

3.3. Analiza związków lotnych kaw palonych

W wyniku analizy składu frakcji lotnej kaw z końcowego etapu palenia (palonych), rozdzielono i zidentyfikowano ogółem 56 związków lotnych. Kawy etiopskie i gwatemalskie zawierały najwięcej

Tabela 3. Lotne pirazyny, furany i ketony zidentyfikowane w próbkach kaw upalonych

Nazwa związku	Kawa z końcowego etapu palenia					
	KK	CRK	EK	GK	BK	R
<u>pirazyny</u>						
pirazyna					+	
metylopirazyna	+	+	+	+	+	+
2,5-dimetylopirazyna	+	+	+	+	+	+
2,6-dimetylopirazyna	+	+	+	+	+	+
etylopirazyna	+	+	+	+	+	+
2-etylo-5-metylopirazyna	+	+	+	+	+	+
2-etylo-6-metylopirazyna	+	+	+	+	+	+
trimetylopirazyna	+	+	+	+	+	+
3-etylo-2,5-dimetylopirazyna	+	+	+	+	+	+
2-acetylo-3-metylopirazyna	+			+	+	+
2,3-dimetylopirazyna		+		+	+	+
<u>furany</u>						
furfural	+			+		+
5-metylofurfural	+	+	+	+	+	+
5-metylo-1H-pirol-2-karboksyaldehyd	+					
2-metylofuran		+	+	+	+	
2,5-dimetylofuran						+
3,4-dimetylo-2,5-furanodion					+	
1-(2-furanylo)-etanon					+	
2-furanometanol	+	+		+	+	+
octan furfurylu	+	+	+	+	+	+
mrówczan furfurylu	+	+	+	+	+	+
propionian furfurylu		+	+	+	+	+
<u>ketony</u>						
3-hydroksy-2-butanon	+		+	+	+	
1-hydroksy-2-propanon	+	+	+	+	+	+
1-acetoloksy-2-butanon	+	+	+	+	+	+
3-metylo-1,2-cyklopentadion	+	+	+	+		
1-acetoloksy-2-propanon	+	+	+	+		
3,3-dimetylo-2-butanon	+	+	+	+		
1-(2-furylo)-2-propanon	+	+	+	+	+	
2,3-pentanedion		+	+	+	+	+
2,3-dimetylo-2-cyklopenten-1-on		+				
4-etylocykloheksanon		+				
3-metylo-2-butanon			+	+		
4-metylo-1-pentyn-1-on			+			
2-propanon				+	+	

KK – kawa kolumbijska, CRK – kawa kostarykańska, EK – kawa etiopska, GK – kawa gwatemalska, BK – kawa brazylijska, R – kawa robusta;

„+” – związek zidentyfikowano

– po 39 składników fazy nadpowierzchniowej. Kawy kolumbijskie, kostarykańskie i brazylijskie zawierały kolejno 30, 34 i 37 związków lotnych. Frakcja lotna kawy Robusta zawierała – 29 składników. Różnice jakościowe składu fazy nadpowierzchniowej kaw przedstawiono w Tabelach 3 i 4.

We frakcji lotnej kaw upalonych zidentyfikowano 12 pirazyn (Tab. 3). W fazie nadpowierzchniowej kawy

brazylijskiej stwierdzono obecność pirazyny, związku znajdującego w kawach palonych [3].

Podczas palenia faza nadpowierzchniowa kawy wzbogaciła się o związki furanowe (Tab. 3). We frakcji lotnej większości próbek zidentyfikowano 2-metylofuran i propionian furfurylu. Wymienionym związkom przypisuje się nuty zapachowe „eterową, mdlącą” oraz „owocową, zieloną, świeżą” [3].

W efekcie procesu palenia znacznie wzrosła liczba ketonów zidentyfikowanych we frakcji lotnej (Tab. 3). W kawach z Kolumbii, Kostaryki, Etiopii i Gwatemali wykryto 3-metylo-1,2-cyklopentadion. W pojedynczych próbkach wykryto 3-hydroksy-2-butanon, 2-propanon czy 3-metylo-2-butanon. 3-hydroksy-2-butanon wykrywano w kawach zielonych, jednak może on powstawać z glukozy w wyniku ogrzewania [3]. W kawach palonych we frakcji lotnej kaw z Kostaryki, Etiopii, Gwatemali i Brazylii stwierdzono obecność 1-(2-furanylometylo)-1H-pirolu, związku o „przyjemnym, zielonym, podobnym do grzybowego” zapachu [3]. We fazie nadpowierzchniowej kaw upalonych zidentyfikowano również niewielkie ilości estrów, kwasów tłuszczowych, aldehydów i alkoholi (Tab. 4) identyfikowanych we frakcji lotnej palonych ziaren kawowych [3].

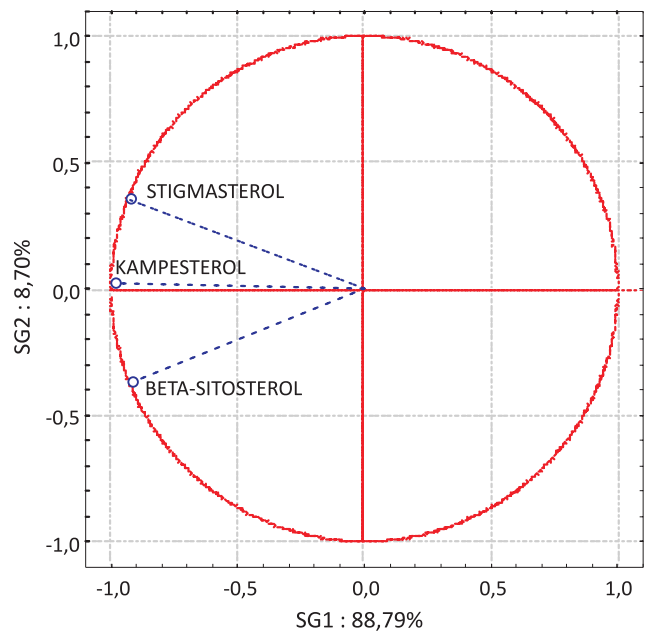
W próbkach Robusty zidentyfikowano limonen, związek występujący we frakcji lotnej zielonych ziaren kawowych [3].

Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi przedstawionymi w części przeglądowej pracy. Podobne związki lotne identyfikowano w kawach palonych [6] i aromacie kawowym [7].

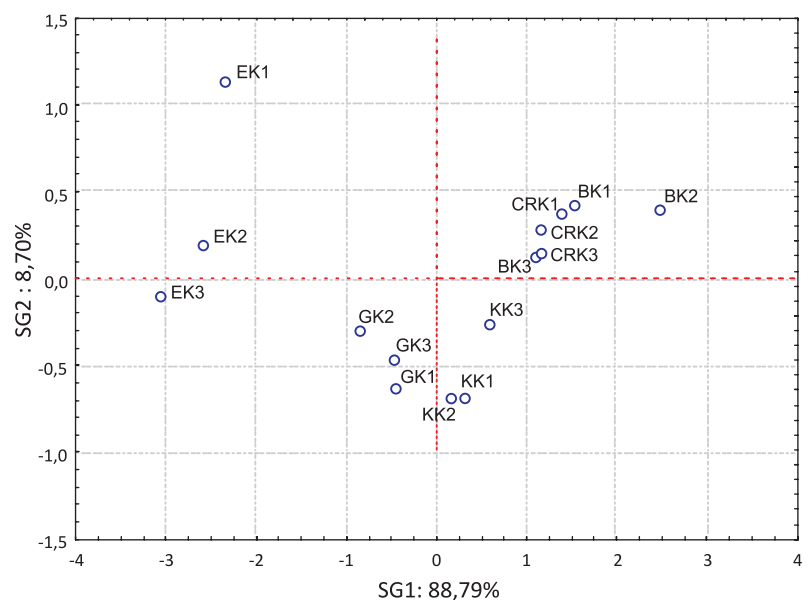
Profil kawy kolumbijskiej z końcowego etapu palenia charakteryzował się wysoką zawartością 2-furanometanolu (średnia względna powierzchnia pików ok. 60). W mniejszych ilościach wydawały się być obecne furfural (powierzchnia względna pików ok. 25), 5-metylofurfural, kwas octowy i octan furfurylu.

W fazie nadpowierzchniowej kawy kostarykańskiej najwyższą średnią względną powierzchnię pików (ok. 65) stwierdzono dla 2-furanometanolu. Drugim związkiem dominującym był 2,6-dimetylo-4H-piran-4-on (średnia względna powierzchnia pików ok. 35). Ważne wydawały się również: 1-acetoloksy-2-propanon, octan furfurylu, 5-metylofurfural, kwas octowy i metylopirazyna. W kawie etiopskiej najwyższe średnie względne powierzchnie pików miały 2-furanometanol (ok. 70) i 1-acetoloksy-2-propanon (ok. 30). W profilu omawianej kawy wyraźnie zaznaczały swoją obecność związki takie jak: octan furfurylu, pirydyna, 5-metylofurfural i kwas octowy.

We frakcji lotnej kawy gwatemalskiej największy udział miały 2-furanometanol (średnia względna powierzchnia pików ok. 40) i 1-acetoloksy-2-propanon (średnia względna powierzchnia pików ok. 25). W większych ilościach występowały także: pirydy-



Wykres 7. Współczynniki korelacji steroli z pierwszą i drugą SG – kawy z końcowego etapu palenia



Wykres 8. Analiza składu kwasów tłuszczowych. Wartości pierwszej i drugiej SG dla kaw z końcowego etapu palenia

na, octan furfurylu, 5-metylofurfural, kwas octowy i metylopirazyna.

Profil związków lotnych kawy brazylijskiej charakteryzował się wysokim udziałem 2-furanometanolu, którego średnia względna powierzchnia pików wynosiła ok. 80, oraz 2,6-dimetylo-4H-piran-4-onu ze średnią względną powierzchnią pików równą ok. 40. We frakcji lotnej tej kawy dość duży udział miały: 5-metylofurfural, octan furfurylu, pirydyna i metylopirazyna.

W przypadku kawy z gatunku robusta, profil związków lotnych był zdominowany przez 2,5-dimetylofuran (średnia względna powierzchnia pików ok. 80). Duży udział w fazie nadpowierzchniowej tej kawy miały

również: 2-furanometanol, 5-metylofurfural, kwas octowy, furfural, octan furfurylu i metylopirazyna. Profile składu frakcji lotnej wszystkich kaw arabskich z końcowego etapu palenia były zdominowane przez 2-furanometanol, 5-metylofurfural, 1-acetoloksy-2-propanon, octan furfurylu, kwas octowy, metylopirazyna, pirydynę i 2,6-dimetylo-4H-piran-4-on. W fazie nadpowierzchniowej kawy Robusta dominował 2,5-dimetylofuran. W celu zilustrowania różnic ilościowych w składzie frakcji lotnej kaw z końcowego etapu palenia przeprowadzono analizę składowych głównych uwzględniając

względne powierzchnie pików związków obecnych w przynajmniej czterech z sześciu badanych kaw. Do opisu różnic w składzie frakcji lotnej kaw arabskich wybrano dwie pierwsze składowe główne objaśniające ogółem 73,93% całkowitej zmienności. Współczynniki korelacji wybranych zmiennych z zatrzymanymi składowymi przedstawiono w Tabeli 5. Wartości dwóch pierwszych składowych głównych obliczone dla próbek kaw zilustrowano na Wykresach 4-6. Pierwsza składowa główna objaśniała 60,45% całkowitej zmienności i przyjmowała ujemne współczynniki korelacji z większością uwzględnionych w analizie

Tabela 4. Lotne alkohole, aldehydy, estry, pirany, kwasy, pirole i związki pirydynowe zidentyfikowane w próbkach kaw upalonych

Nazwa związku	Kawa z końcowego etapu palenia					
	KK	CRK	EK	GK	BK	R
<u>alkohole</u>						
1-oktyn-3-ol	+		+	+		
2,3-butanediol					+	
3-metylo-2-pentanol					+	
<u>aldehydy</u>						
pentanal	+		+			
2-metylobutanal				+	+	
benzoaldehyd						+
<u>estry</u>						
octan metylu			+			
dihydro-2-metylo-3(2H)-furanon	+	+	+	+	+	+
dihydro-2(3H)-furanon	+	+	+	+	+	+
3,5-dimetylo-2(5H)-furanon			+			
<u>pirany</u>						
3-hydrokso-2-metylo-4H-piran-4-on	+			+		
2,6-dimetylo-(4H)-piran-4-on		+			+	
5,6-dihydro-2-metylo-2(H)-piran		+	+			
<u>kwasy</u>						
kwas octowy	+	+	+	+	+	+
kwas propanowy			+			
kwas 3-metylobutanowy	+	+	+	+		+
<u>pirole</u>						
1-(1H-pirol-2-yl)-etanon	+	+	+	+	+	
1-(2-furanylometylo)-1H-pirol		+	+	+	+	
1-metylo-1H-pirol-2-karboksyaldehyd		+	+	+	+	+
<u>związki pirydynowe</u>						
pirydyna			+	+	+	+
N-acetylo-4(H)-pirydyna		+	+	+	+	+
<u>Terpeny</u>						
limonen						+

KK – kawa kolumbijska, CRK – kawa kostarykańska, EK – kawa etiopska, GK – kawa gwatemalska, BK – kawa brazylijska, R – kawa robusta; „+” – związek zidentyfikowano

związków lotnych (Tab. 5). Omawiana składowa rozróżniła palone kawy arabskie z Etiopii i Brazylii, dla których przyjmowała wartości ujemne, od kaw gwatemalskich i kostarykańskich, dla których miała wartości dodatnie. Zaobserwowane grupowanie wynikało z faktu, że kawy brazylijskie i etiopskie odznaczały się wyższymi intensywnościami składników frakcji lotnej.

Druga składowa główna, objaśniająca 13,48% całkowitej zmienności, oddzieliła próbki kaw etiopskich od brazylijskich. Przyczyną grupowania były różnice

w udziale 1-(2-furylo)-2-propanonu i 3-metylo-1,2-cyklopentadionu w fazie nadpowierzchniowej wymienionych kaw. Kawy brazylijskie charakteryzowały się najwyższymi średnimi względnymi powierzchniami piku pierwszego z wymienionych związków, z którym druga składowa była najsilniej dodatnio skorelowana (Tab. 5). Kawy z Etiopii odznaczały się najwyższym udziałem 3-metylo-1,2-cyklopentadionu w profilu związków lotnych. Druga składowa główna przyjmowała silny ujemny współczynnik korelacji z 3-metylo-1,2-cyklopentadionem (Tab. 5).

Tabela 5. Współczynniki korelacji wybranych związków lotnych z pierwszymi składowymi głównymi – kawy z końcowego etapu palenia

Nazwa związku	Współczynnik korelacji			
	Kawy arabskie		Arabica vs Robusta	
	1SG	2SG	1SG	2SG
2-metylofuran	-0,850	0,033	0,979	-0,085
2,3-pentanedion	-0,908	0,292	0,208	-0,564
pirydyna	-0,719	0,139	0,981	-0,109
dihydro-2-metylo-3(2H)-furanon	-0,885	-0,290	0,989	-0,061
metylopirazyna	-0,940	0,126	-0,219	-0,400
3-hydroksy-2-butanon	-0,281	0,042	0,992	-0,055
1-hydroksy-2-propanon	-0,907	-0,327	0,992	0,096
2,5-dimetylopirazyna	-0,952	0,054	0,994	0,076
2,6-dimetylopirazyna	-0,960	0,010	0,992	0,083
etylopirazyna	-0,940	0,191	0,182	0,528
2,3-dimetylopirazyna	-0,006	0,401	0,988	0,094
2-etylo-5-metylopirazyna	-0,850	0,452	0,990	0,081
2-etylo-6-metylopirazyna	-0,877	0,315	0,994	0,074
trimetylopirazyna	-0,956	0,143	0,275	0,394
3-etylo-2,5-dimetylopirazyna	-0,581	0,538	0,977	-0,051
kwasy octowy	-0,710	-0,603	0,996	-0,081
mrówczan furfurylu	-0,978	-0,098	0,990	-0,116
1-acetyloksy-2-butanon	-0,967	-0,058	0,972	-0,203
octan furfurylu	-0,945	-0,142	0,991	-0,028
5-metylofurfural	-0,946	0,191	0,120	0,359
propionian furfurylu	-0,175	0,111	0,988	-0,037
1-metylo-1H-pirol-2-karboksyaldehyd	-0,897	0,179	0,645	-0,622
dihydro-2(3H)-furanon	-0,814	-0,390	0,680	-0,672
2-furanmetanol	-0,903	-0,356	0,947	-0,191
2-acetylo-3-metylopirazyna	-0,849	-0,024	0,963	-0,147
N-acetylo-4(H)-pirydyna	-0,744	-0,579	-0,271	-0,835
1-(2-furanylo-metylo)-1H-pirol	-0,949	0,169	-0,560	-0,746
1-(1H-pirol-2-yl)-etanon	-0,671	-0,358	-0,261	-0,745
1-acetyloksy-2-propanon	-0,805	-0,036	-0,416	-0,445
3-metylo-1,2-cyklopentadion	-0,082	-0,904	-0,345	-0,204
3,3-dimetylo-2-butanon	0,106	-0,634	-0,228	-0,213
1-(2-furylo)-2-propanon	-0,251	0,688	0,306	-0,141
kwasy 3-metylobutanowy	0,105	-0,615	-0,210	-0,835

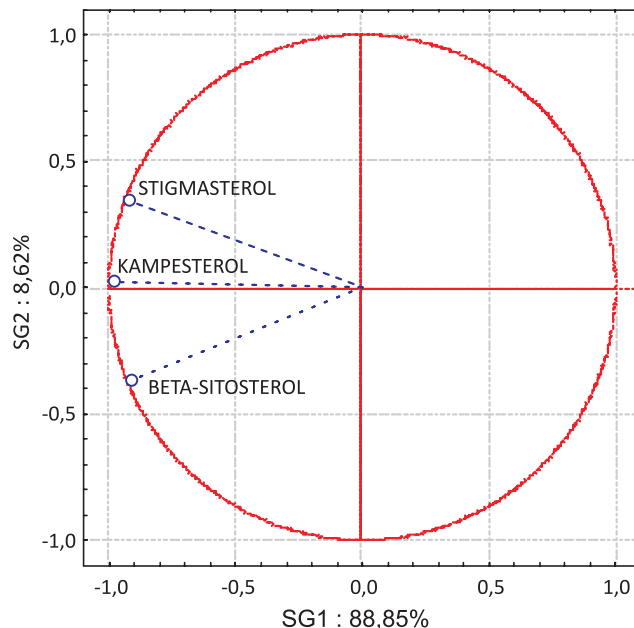
W celu zbadania różnic ilościowych w składzie frakcji lotnej kaw Arabiki i Robusty macierz danych rozszerzono o próbki kawy koszykowej. Analizę składowych głównych przeprowadzono analogicznie jak dla porównania kaw arabskich o różnym pochodzeniu geograficznym. Do opisu doświadczenia wybrano dwie pierwsze składowe główne, które objaśniały ogółem 73,79% całkowitej zmienności. Wyniki analizy przedstawiono w Tabeli 5 (współczynniki korelacji zmiennych wyjściowych z zatrzymanymi składowymi głównymi) oraz zilustrowano na Wykresie 12.

Pierwsza składowa główna, objaśniająca 59,00% całkowitej zmienności, oddzieliła próbki Robusty od Arabiki (Wyk. 12). Profil składu frakcji lotnej kawy Robusta charakteryzował się wyższym udziałem związków takich jak 2,3-pentanedion, mrówczan furfurylu, 1-acetyloksy-2-butanon oraz większości zidentyfikowanych pirazyn, z którymi pierwsza składowa przyjmowała silne dodatnie współczynniki korelacji (Tab. 5).

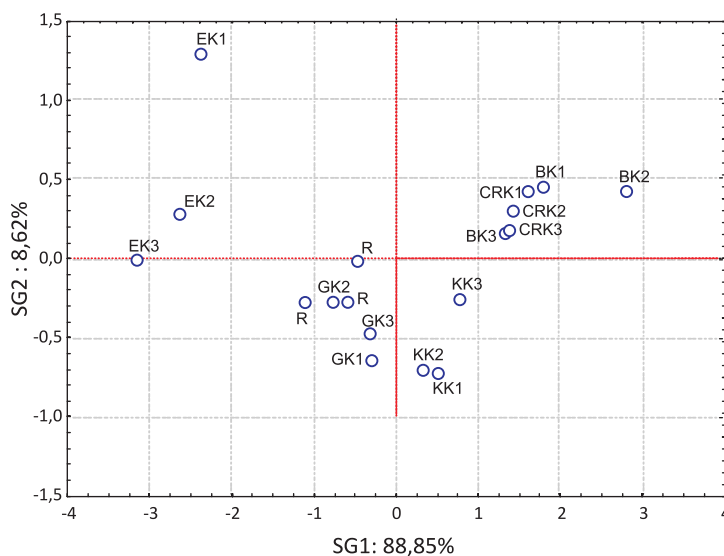
Podobne wyniki uzyskali Zambonin i wsp. [6], którzy wykazali możliwość rozróżniania gatunków kawy (Arabiki i Robusty) w oparciu o analizę składu frakcji lotnej palonego ziarna. Wymienieni autorzy zauważyli, że próbki kawy Robusta charakteryzowały się wyższą zawartością pirazyn w fazie nadpowierzchniowej niż próbki kawy arabskiej.

4. WNIOSKI

1. W oparciu o całkowitą zawartość kwasów tłuszczowych możliwe wydaje się być rozróżnianie między kawą Arabica a Robustą
2. Różnice zawartości β -sitosterolu, stigmasterolu i kampesterolu nie wydają się być wystarczające do rozróżnienia próbek kawy arabskiej pod względem kraju pochodzenia. Widoczna tendencja do grupowania próbek palonego ziarna w zależności od pochodzenia geograficznego sugeruje, że zastosowanie bardziej czułej metody i zebranie szerszego profilu steroli mogłoby się okazać skuteczniejsze w ocenie autentyczności kawy.
3. Uzyskany efekt grupowania próbek ziarna kaw arabskich sugeruje przydatność analizy składu fazy nadpowierzchniowej do rozróżniania kaw o różnym pochodzeniu geograficznym. Za rozróżnianie próbek kawy odpowiadają nie tylko związki powstające w wyniku reakcji ciemnie-



Wykres 9. Współczynniki korelacji steroli z pierwszą i drugą SG – porównanie Arabiki i Robusty.

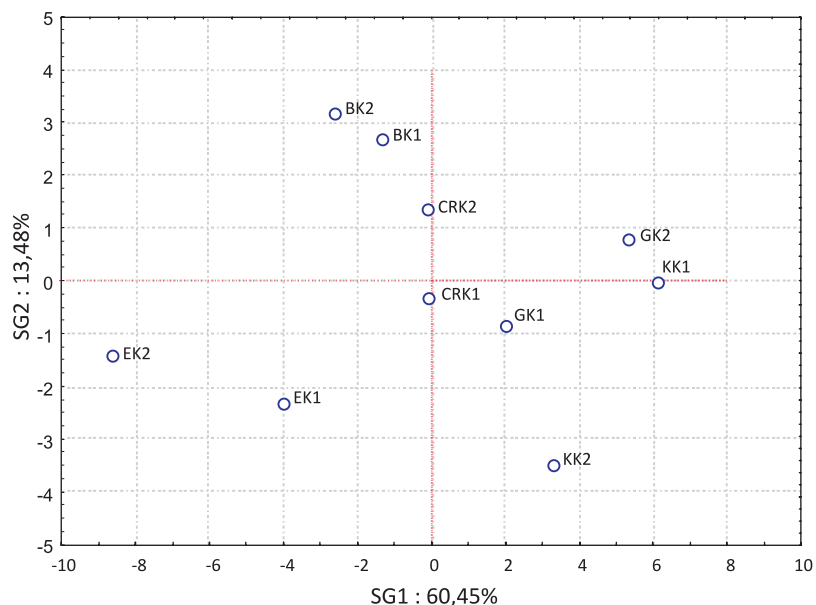


Wykres 10. Analiza składu steroli. Wartości pierwszej i drugiej SG – porównanie Arabiki i Robusty

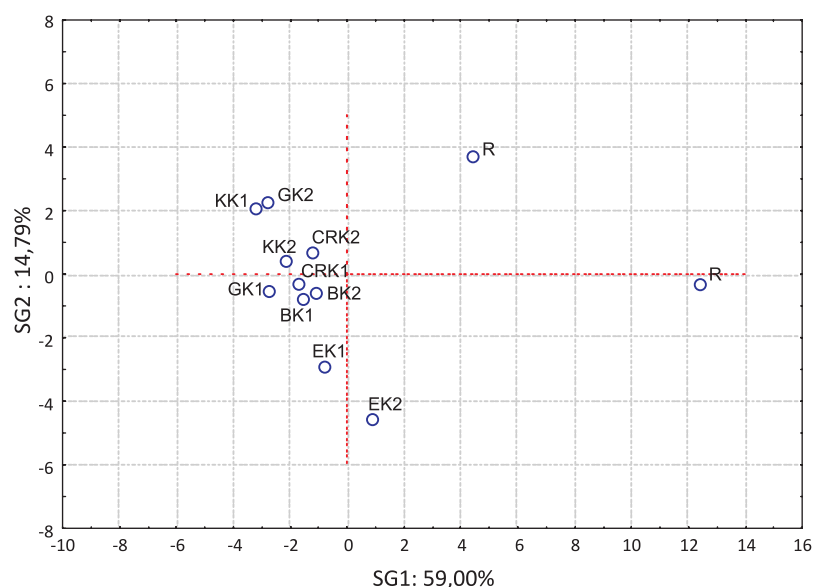
nia nieenzymatycznego i termicznej degradacji składników ziarna. Ważna zdaje się być również ogólna zawartość związków lotnych.

4. Przedstawione wyniki potwierdzają przydatność analizy składu związków lotnych do rozróżniania kaw Arabiki i Robusty. Przypuszczalnie przyczyną różnic jest wyższa zawartość pirazyn w Robuście.

W kolejnej publikacji przedstawione zostanie zastosowanie analizy związków lotnych techniką HS-SPME-GC/MS w analizie autentyczności żywności na przykładzie bioolei roślinnych i serów pleśniowych.



Wykres 11. Analiza składu frakcji lotnej. Wartości pierwszej i drugiej SG – porównanie kaw arabskich z końcowego etapu palenia



Wykres 12. Analiza składu frakcji lotnej. Wartości pierwszej i drugiej SG – porównanie kaw Arabiki i Robusty

LITERATURA

- [1] Clarke R. J., Vitzthum O. G., (2001). Coffee. Recent Developments. World Agriculture Series, 10-59.
- [2] Martín M.J., Pablos F., Gonzalez A.G., Valdenebro M.S., Leon-Camacho M. (2001). Fattyacids profiles as discriminant parameters for Coffea varieties differentiation. Talanta, 54, 291-297.
- [3] Flament I., (2001). Coffee flavor chemistry. Other Wiley Editorial Offices. 37-335.
- [4] Speer K., Kölling-Speer I., (2002). Institute of Food Chemistry, Technical University Dresden, Germany.
- [5] Carrera F., Leon-Camacho M., Pablos F., Gonzalez A.G. (1998). Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. Analytica Chimica Acta, 370, 131-139.
- [6] Zambonin C.G., Balest L., De Benedetto G.E., Palmisano F. (2005). Solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis for the characterization of roasted coffees. Talanta, 66, 261-265.
- [7] Huang L.-F., Wu M.-J., Zhong K.-J., Sun X.-J., Liang Y.-Z., Dai Y.-H., Huang K.-L., Guo F.-Q. (2007). Fingerprint developing of coffee flavor by gas chromatography-mass spectrometry and combined chemometric methods. Analytica Chimica Acta, 588, 216-223.