

APARATURA BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej w analizie lotnych związków zapachowych ogórka

MICHAŁ GOŚLIŃSKI, MARIUSZ DZIADAS, RENATA ZAWIRSKA-WOJTASIAK

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU, INSTYTUT TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI POCHODZENIA ROŚLINNEGO

STRESZCZENIE

Ekstrakcja do fazy stałej SPE jest techniką stosowaną powszechnie do selektywnej izolacji analitów z ciekłych matryc. Może być wykorzystana do przygotowania próbek analizowanych metodami chromatografii gazowej. W niniejszej pracy przedstawiono zastosowanie techniki SPE w analizie lotnych związków zapachowych ogórka. Zidentyfikowano główne związki lotne, a następnie porównano ich zawartość pomiędzy poszczególnymi próbkami owoców ogórka transgenicznego. Otrzymane wyniki były porównywalne z wcześniejszymi wynikami badań własnych uzyskanymi za pomocą innych technik analitycznych. Ekstrakcja SPE może stanowić alternatywę lub uzupełnienie dla dotychczasowych oznaczeń substancji zapachowych.

Application of the solid phase extraction for the evaluating the volatile aroma compounds of cucumber

ABSTRACT

Solid phase extraction (SPE) is a common technique applied to selective isolation of compounds from liquid matrix. It can be use in sample preparation for gas chromatography. The aim of this study was the application of SPE technique for evaluating the aroma of cucumber. The main volatiles were determined and then the comparison of their concentration between different cucumber samples was done. The results were comparable with those obtained previously by other analytical methods. The SPE technique could be an alternative or complement tool in the analysis of volatiles.

1. WSTĘP

Tradycyjną metodą oznaczania lotnych związków zapachowych jest analiza z fazy nadpowierzchniowej (HS). W literaturze coraz częściej znajduje się przykłady zastosowania innych technik izolacji związków lotnych. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) pozwala na selektywną izolację wybranych analitów, w tym również związków lotnych [1].

Przygotowanie próby do analizy chromatograficznej poprzez ekstrakcję do fazy stałej SPE (ang. *Solid Phase Extraction*) jest techniką stosowaną od lat 70-tych. Polega ona na szybkiej i selektywnej izolacji analitu z badanej matrycy. Może być stosowana do usuwania zanieczyszczeń z matrycy i analitu, zagęszczania analitu na złożu, przemieszczania analitu z jednej matrycy do innej, o przeciwnej polarności, ekstrakcji analitu z jego późniejszą derywatyzacją. Technikę SPE zastosowano z powodzeniem w analizie związków lotnych moszczy i win gronowych [2, 3], a także jako metodę porównawczą do innych technik wyodrębniających związki lotne z napojów alkoholowych [4]. Wyjątkowo skutecznym adsorbentem w analizie związków niepolarnych zawieszonych w polarnej matrycy jest kopolimer styrenu i divinylbenzenu znany jako żywica XAD (SDVB) oraz żel krzemionkowy z fazą oktadecylową C18 [2]. Oba adsorbenty należą do typu odwróconej fazy i ze względu na mechanizm retencji analitu są odpowiednie do wyodrębniania niepolarnych, średnio niepolarnych oraz słabo polarnych związków z polarnych matryc.

W niniejszej pracy przedstawiono zastosowanie techniki SPE w analizie lotnych związków zapachowych ogórka. Metodyka doświadczenia została opracowana w oparciu o prace analityczne dotyczące wyodrębniania monoterpenu z win gronowych [2, 5].

2. MATERIAŁ I METODY

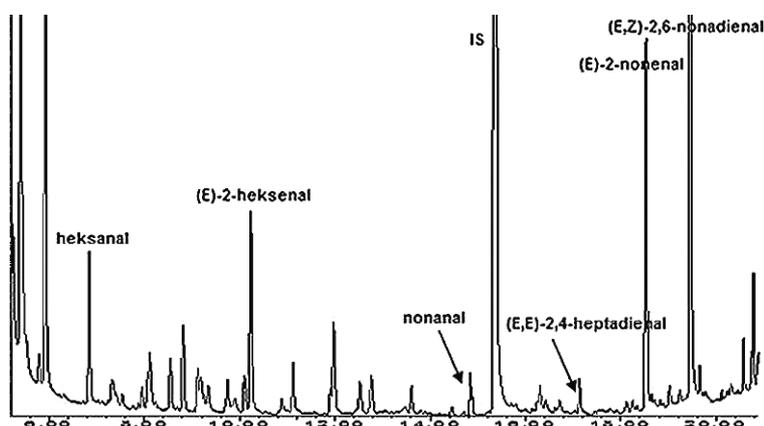
Badaniom poddano 5 serii ogórków – próbę kontrolną (B) odmiany *Borszczagowski* oraz 4 linie transgeniczne o zróżnicowanej ekspresji genu taumatyny II. Owoce ogórków otrzymano z doświadczalnej uprawy szklarniowej Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW w Warszawie.

Do 60 g rozdrobnionego ogórka dodawano 120 ml wody destylowanej, a następnie homogenizowano przez 5 minut za pomocą miksera. Homogenizat przesączało przez bibułę filtracyjną i otrzymano ok. 150 ml klarownego soku z ogórka. Całość dzielono na 6 równych części rozlewając do zlewek

o pojemności 50 ml, celem wykonania pomiaru w 6 powtórzeniach. Do każdej próby dodawano 5 μ l standardu wewnętrznego (15 mg 2-oktanolu w 1 ml metanolu) i mieszano przez 3 minuty na mieszadle magnetycznym. Tak przygotowany sok poddawano ekstrakcji związków lotnych. Ekstrakcję prowadzono w 12-portowej stacji SPE na kolumnkach ze złożem 500 mg C-18 RP (*Biotage, Szwecja*). Złoże aktywowano 20 ml metanolu i 20 ml wody destylowanej. Ekstrakcję prowadzono w regulowanym przepływie nie większym niż 3 ml/min. Po przepuszczeniu całej porcji soku stację pozostawiano włączoną do momentu osuszenia złoża, a następnie na każdą kolumnkę wprowadzano po 25 ml mieszaniny n-pentan: dichlorometan (2:1 v/v). Eluaty zbierano do osobnych naczynek o pojemności 30 ml i zatężono pod strumieniem azotu do objętości ok. 500 μ l. Otrzymany ekstrakt poddawano analizie metodą GC/MS na chromatografie gazowym Agilent Technologies 7890A sprzężonym z kwadrupolowym spektrometrem mas 5975C tej samej firmy. Analizę prowadzono w oparciu o jonizację elektronami (EI=70eV) w zakresie mas: 40-400 amu. Rozdział chromatograficzny przebiegał w temperaturze programowanej od 40°C do 220°C ze wzrostem 5°C/min. Stosowano gaz nośny hel o przepływie 0,8 ml/min. Temperatura portu nastrzykowego wynosiła 240°C. Nastrzykiwano 1 μ l próby w systemie splitless.

3. WYNIKI

Zastosowanie techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE) pozwoliło na izolację głównych lotnych związków zapachowych ogórka, którymi są (E,Z)-2,6-nonadienol i (E)-2-nonenal [6]. Ponadto oznaczono także inne związki zapachowe, identyfikowane we wcześniejszych badaniach własnych za pomocą innych



Rysunek 1. Przykładowy chromatogram rozdziału związków lotnych aromatu ogórka wyekstrahowanych za pomocą techniki SPE

technik analitycznych: destylacji i mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) [7]. Są to: heksanal, (E)-2-heksenal, nonanal i (E,E)-2,4-heptadienal. Identyfikacji jakościowej tych związków dokonano na podstawie porównania widm masowych w bibliotece NIST. Na Rysunku 1 przedstawiono przykładowy chromatogram rozdziału związków lotnych wyekstrahowanych z owoców ogórka za pomocą techniki SPE.

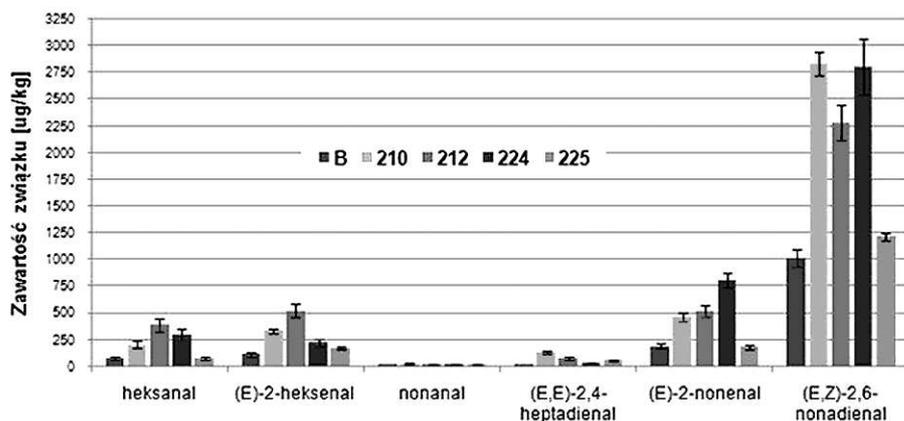
W dalszej części badań przystąpiono do porównania zawartości głównych związków zapachowych pomiędzy poszczególnymi próbkami owoców ogórka transgenicznego. Obliczeń dokonano w oparciu o dodatek 5 μ l standardu wewnętrznego (IS) o znanym stężeniu (15 mg 2-oktanolu w 1 ml metanolu). Otrzymane rezultaty przedstawiono graficznie na Rysunku 2.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników zweryfikowano za pomocą analizy wariancji (test-F) na poziomie istotności $\alpha=0,05$. Na jej podstawie stwierdzono, że zawartość związków lotnych w badanych próbkach ogórka była różna.

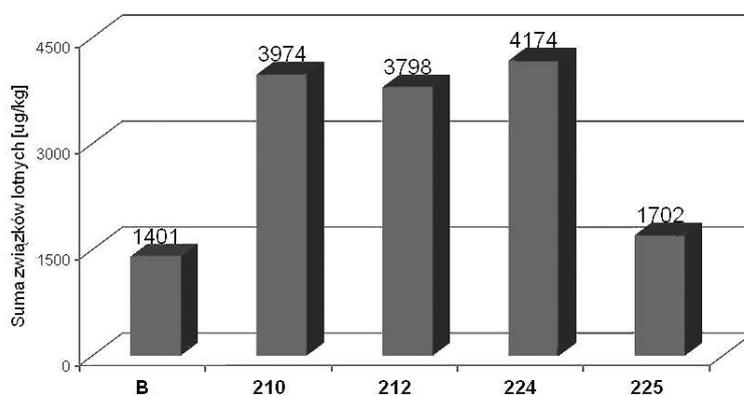
Owoce transgeniczne charakteryzowały się większą zawartością analizowanych substancji zapachowych, w szczególności głównego związku (E,Z)-2,6-nonadienu. Największą jego ilość, tj. ok. 2800 μ g/kg ogórka oznaczano w liniach 210 i 224, podczas gdy w próbce kontrolnej zawartość tego związku oscylowała w granicach 1000 μ g/kg ogórka. W mniejszych ilościach w badanych próbkach owoców występowały kolejno: (E)-2-nonenal, heksanal i (E)-2-heksenal. Podobne wyniki otrzymano dla prób ogórka transgenicznego analizowanych innymi metodami w latach wcześniejszych [8].

Z uwagi na fakt, że dla zapachu istotny jest nie tylko główny związek, ale także suma wszystkich lotnych składników, dokonano również porównania sumy związków lotnych w badanych próbkach owoców ogórka. Wyniki przedstawiono graficznie w postaci histogramu na Rysunku 3.

W celu statystycznej oceny otrzymanego wyniku przeprowadzono test Tukeya na poziomie istotności $\alpha=0,05$. Na jego podstawie stwierdzono, że serie B i 225 były istotnie różne od pozostałych, natomiast suma związków lotnych dla serii 210, 212 i 224 była podobna.



Rysunek 2. Zawartość głównych związków aromatu ogórka w próbkach po ekstrakcji SPE



Rysunek 3. Porównanie sumy związków lotnych dla poszczególnych prób owoców ogórka

4. DYSKUSJA

Zastosowanie techniki SPE pozwoliło na izolację głównych związków zapachowych ogórka. W otrzymanych próbkach zidentyfikowano charakterystyczne dla ogórka związki lotne, znane z literatury i wcześniejszych badań własnych [6, 7].

Ocena porównawcza zawartości związków lotnych w wybranych liniach transgenicznego ogórka wykazała, że niemodyfikowana próbka kontrolna B różni się istotnie statystycznie od prób modyfikowanych genetycznie. Owoce, w których nastąpiła ekspresja genu taumatyny II odznaczały się również większym stężeniem poszczególnych odorantów, szczególnie kluczowego dla zapachu ogórka (E,Z)-2,6-nonadienu. Otrzymane wyniki były zbliżone z wynikami dla takich samych prób owoców ogórka transgenicznego pochodzących ze zbiorów z lat wcześniejszych, wykonanych za pomocą metody SPME [8].

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) jest techniką stosunkowo szybką i prostą do przeprowadzenia. Może stanowić alternatywę lub uzupełnienie dla dotychczas stosowanych oznaczeń aromatu, na przykład czasochłonnej tradycyjnej destylacji. Należy jednak zwrócić uwagę, że istotnym ograniczeniem SPE jest możliwość jej aplikacji jedynie do ciekłych próbek [1]. Z tego faktu wynika bardzo duża popularność ekstrakcji SPE w analizie związków lotnych win i innych napojów alkoholowych [9, 10].

W celu oznaczenia zawartości związków lotnych w produktach stałych należy wcześniej przeprowadzić

ekstrakcje ciała stałe – ciecz. W niniejszej pracy badano substancje zapachowe owoców ogórka, które są surowcem składającym się w ponad 80% z wody, dlatego stosunkowo łatwo można było przeprowadzić oznaczenia próbek otrzymanego z nich soku. Uzyskano podobne wyniki jak w metodzie mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME), w której stosowano homogenizowane próby owoców ogórka [7, 8]. Wydaje się jednak, że technika SPE, jakkolwiek konkurencyjna do tradycyjnej destylacji, w odniesieniu do metody SPME jest co najwyżej porównywalna.

LITERATURA

- [1] Castro R., Natera R., Durán E. García-Barroso C.: Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *European Food Research and Technology* (2008) 228(1):1-18.
- [2] Pineiro Z., Palma M., Barroso C.G.: Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* (2004) 513:209-214.
- [3] Vilanova M., Martýnez C.: First study of determination of aromatic compounds of red wine from *Vitis vinifera* cv. *Castanal* grown in Galicia (NW Spain). *European Food Research and Technology* (2007) 224:431-436.
- [4] Pineiro Z., Natera R., Castro R., Palma M., Puertas B., Barroso C.G.: Characterisation of volatile fraction of monovarietal wines: Influence of winemaking practices. *Analytica Chimica Acta* (2006) 563:165-172.
- [5] Mateo J.J., Gentilini N., Huerta T., Jimenez M., Di Stefano R.: Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *Journal of Chromatography A* (1997) 778:219-224.
- [6] Schieberle P., Ofner S., Grosch W.: Evaluation of potent odorants on cucumber (*Cucumis sativus*) and muskmelons (*Cucumis melo*) by aroma extract dilution analysis. *Journal of Food Science* (1990) 55:193-195.
- [7] Gośliński M., Zawirska-Wojtasiak R., Gajc-Wolska J.: Optymalizacja parametrów techniki SPME do oceny aromatu owoców linii transgenicznych ogórka ekspresujących gen taumatyny II. *Żywność Nauka Technologia Jakość* (2007) 5(54):142-152.
- [8] Zawirska-Wojtasiak R., Gośliński M., Szwacka M., Gajc-Wolska J., Mildner-Szkudlarz S.: Aroma evaluation of transgenic, thaumatin II-producing cucumber fruits. *Journal of Food Science* (2009) 74(3) C204-C210.
- [9] Lopez R., Aznar M., Cacho J., Ferreira V.: Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* (2002) 966:167-177.
- [10] Guerrero, E.D., Chinnici, F., Natali, N., Marín, R.N., Riponi C.: Solid-phase extraction method for determination of volatile compounds in traditional balsamic vinegar. *Journal of Separation Science* (2008) 31(16-17):3030-3036.