

APARATURA BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Dobór parametrów ekstrakcji związków lotnych win czerwonych analizowanych techniką SPME-GC-MS

ANGELIKA ZIÓŁKOWSKA, HENRYK H. JELEŃ

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU, INSTYTUT TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI POCHODZENIA ROŚLINNEGO

STRESZCZENIE

Wina posiadają zróżnicowany profil związków lotnych. Zależy on od rodzaju wina, gatunku winogron, procesu fermentacji i leżakowania. Do analizy związków lotnych win stosuje się wiele metod opartych na analizie fazy nadpowierzchniowej. Celem badań był dobór parametrów ekstrakcji związków lotnych win czerwonych analizowanych metodą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej w połączeniu z chromatografią gazową i spektrometrią mas (SPME-GC-MS). Przeanalizowano następujące parametry techniki SPME: rodzaj włókna SPME, czas ekstrakcji, objętość próby i powtarzalność analizy. Wykorzystano pięć włókien: PDMS, Carboxene/PDMS, Carboxene/DVB/PDMS, Polyacrylate, Divinylbenzene/PDMS oraz czasy ekstrakcji w przedziale 2-30 minut. W celu optymalizacji procesu ekstrakcji zastosowano dwie różne objętości próby 5ml i 10ml, a ekstrakcję prowadzono kilka razy z tej samej fiołki. Ustalono następujące parametry analizy związków lotnych techniką SPME-GC-MS: włókno Carboxene/DVB/PDMS 2cm, ekstrakcja 20 minut w trzech powtórzeniach z jednej fiołki, objętość próby – 10ml.

Determination of the extraction conditions for the analysis of volatile compounds in red wines using SPME-GC-MS technique

ABSTRACT

Wines have various profiles of volatile compounds. It depends on the type of wine, grapes, fermentation and ageing processes. Many different methods based on headspace analysis are used for the determination of the volatile compounds in wines. The aim of this research was to determine of the extraction conditions for the analysis of volatile compounds in red wines using SPME-GC-MS method. The following SPME parameters were elaborated to maximize extraction efficiency: SPME fiber choice, extraction time, sample volume and repeatability of the analysis. Five different types of fibers: PDMS, Carboxene/PDMS, Carboxene/DVB/PDMS, Polyacrylate, Divinylbenzene/PDMS and the extraction time in the range of 2-30 minutes were checked. In order to optimize extraction process two different sample volumes 5ml and 10ml and multiple extraction from a single vial were evaluated. The optimal parameters for the SPME-GC-MS method were the following: extraction performed for 20 minutes with Carboxene/DVB/PDMS fiber 2cm length with 3 repetitions performed from the same vial using 10ml of wines for the analysis.

1. WPROWADZENIE

Wino zawiera kilkaset różnych związków lotnych występujących w stężeniu od kilku ng/l do mg/l. Większą część z nich stanowią wyższe alkohole, estry, kwasy, terpeny, związki siarki oraz pirazyny. Związki te pochodzą między innymi z winogron, część z nich powstaje w procesie fermentacji, niektóre tworzą się w czasie dojrzewania wina, a niektóre przechodzą do wina z beczek, w których są przechowywane [1]. Zawartość związków lotnych w winach zależy również od regionu uprawy winogron oraz warunków klimatycznych.

W literaturze można odnaleźć wiele metod służących do izolacji związków lotnych z win. Do najczęściej wykorzystywanych należy zaliczyć: mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME) [2, 3], ekstrakcję do fazy stałej (SPE) [4, 5], ekstrakcję ciecz/ciecz (CZ/CZ) [6], statyczny headspace [7], ekstrakcję sorpcyjną na mieszkadło (SBSE) [8, 9]. Analizę wyizolowanych związków lotnych prowadzi się najczęściej techniką chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią mas (SPME-GC-MS) [10, 11] lub detekcją za pomocą „klasycznych” detektorów np. FID (SPME-GC-FID) [12, 13]. Metody te mogą posłużyć nie tylko do analizy związków lotnych win, ale także do identyfikacji tych alkoholi, ponieważ wina wyprodukowane z różnych odmian winogron lub pochodzące z różnych obszarów geograficznych, posiadają odmienny profil związków lotnych. Spośród wszystkich wymienionych metod, najczęściej stosowaną techniką służącą do ekstrakcji związków lotnych win jest mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej w połączeniu z ich rozdzieleniem i identyfikacją za pomocą GC/MS. Ekstrakcja techniką SPME ma bardzo wiele zalet wśród których można wymienić: wysoką czułość, powtarzalność i selektywność przy niskim koszcie analizy.

Celem badań było dobranie odpowiednich parametrów ekstrakcji związków lotnych win czerwonych analizowanych techniką SPME-GC-MS.

2. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

2.1. Wino do badań

W celu doboru parametrów analizy związków lotnych win za pomocą techniki SPME-GC-MS do badań wykorzystano wino czerwone, wytrawne Blossom Hill Cabernet Sauvignon pochodzące z Kalifornii, rocznik 2009. 10ml wina umieszczano w fiolkach o pojemności 20ml i zamykano kapslem aluminiowym z membraną silikonową/teflonową umożliwiającą pobieranie próbek za pomocą SPME. Do każdej fiołki przed zamknięciem dodawano 10 μ l standardu wewnętrznego 2-heksanolu w etanolu,

o stężeniu dającym w próbce zawartość 50mg/l. Próby podgrzewano przez 5 minut w 50°C po czym prowadzono ekstrakcję. Następnie desorbowano je w porcie nastrojowym chromatografu gazowego przez 5 minut.

2.2. Włókna SPME

Do badań wykorzystano pięć różnych włókien: Polydimethylsiloxane (PDMS), Polyacrylate (PA), Carboxene/Divinylbenzene/Polydimethylsiloxane (C/D/PDMS), Divinylbenzene/Polydimethylsiloxane (D/PDMS), oraz Carboxene/Polydimethylsiloxane (C/PDMS) zakupionych w firmie Supelco. Wszystkie włókna miały długość 1cm poza Carboxene/Divinylbenzene/Polydimethylsiloxane które miało 2 cm. Przed użyciem włókna zostały wykondycjonowane zgodnie z zaleceniami producenta.

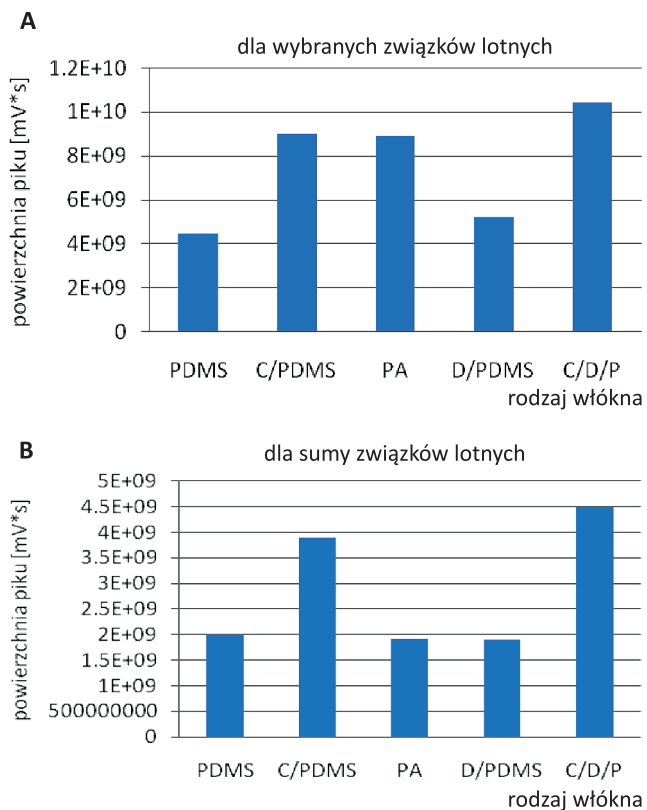
2.3. Aparatura

Do analizy SPME-GC-MS wykorzystano chromatograf gazowy Agilent 7890A połączony ze spektrometrem masowym Agilent 5975C VLMSD. Związki lotne win były rozdzielane na kolumnie Supelcowax-10 (30m x 0,32mm x 0,25 μ m).

3. WYNIKI I DYSKUSJA

3.1. Dobór włókna SPME

Przetestowano pięć różnych włókien SPME. Ekstrakcję w przypadku każdego włókna prowadzono przez 20 minut w 50°C. Na Rysunku 1 przedstawiono ilości związków lotnych zaadsorbowanych na analizowanych włóknach w odniesieniu do wybranych związków lotnych (Rys. 1A) oraz wszystkich związków lotnych łącznie (Rys. 1B). Pośród wybranych związków lotnych znalazły się: octan etylu, maślan etylu, izobutanol, octan izoamylu, heksanol an etylu, alkohol izoamylowy, octan heksylu, 1 hexanol, kaprylan etylu, dekanolan etylu, dekenolan etylu, dodekanolan etylu, alkohol feniloetylowy oraz kwas oktanowy. Porównując zawartości związków lotnych uzyskane dla poszczególnych włókien można stwierdzić, że włókno Carboxene/Divinylbenzene/PDMS zaabsorbowało najwięcej związków lotnych i dało najbardziej powtarzalne wyniki. Włókno to zostało wybrane do analizy związków lotnych win również przez Carrillo [14] oraz Boutou [15]. Ponadto dużo związków zostało zaabsorbowanych na włóknie Carboxene/Polydimethylsiloxane, jednak w tym przypadku uzyskano małą powtarzalność wyników. Najmniejsze powierzchnie pików uzyskano dla włókna Divinylbenzene/Polydimethylsiloxane (D/PDMS). W literaturze do analizy związków lotnych win były wykorzystywane również

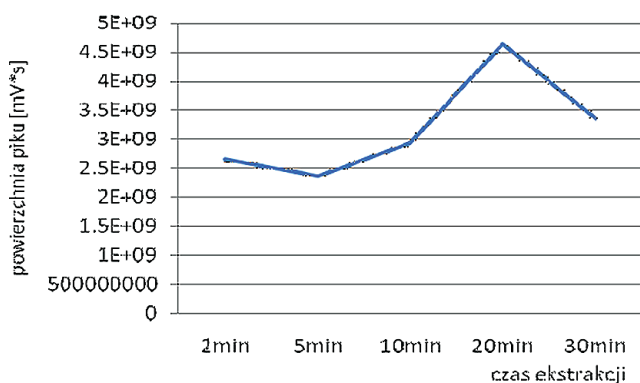


Rysunek 1. Dobór włókna SPME do analizy związków lotnych win A) – dla wybranych związków lotnych; B) – dla sumy związków lotnych

włókna Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB) [3, 12] oraz PDMS [2, 10].

3.2. Dobór czasu ekstrakcji

W celu optymalizacji parametrów analizy związków lotnych techniką SPME zastosowano pięć różnych czasów ekstrakcji z zakresu od 2 minut do 30 minut. Przed rozpoczęciem ekstrakcji próby podgrzano przez 5 minut w 50°C. Wpływ poszczególnych czasów ekstrakcji na ilość związków lotnych zaabsorbowanych na wybranym wcześniej włóknie Carboxene/Divinylbenzene/PDMS przedstawiono na Rysunku 2. Ilość zaabsorbowanych związków wzrastała wraz z

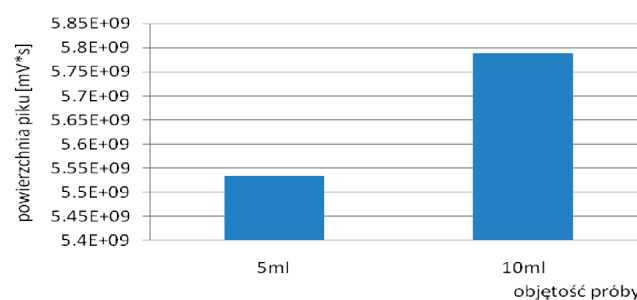


Rysunek 2. Wpływ czasu ekstrakcji na zawartość związków lotnych zaabsorbowanych na włóknie Carboxene/Divinylbenzene/PDMS

wydłużaniem czasu ekstrakcji. Najwięcej związków lotnych zostało zaadsorbowanych na włóknie przy czasie ekstrakcji 20 minut. Podobny czas ekstrakcji do analizy związków lotnych wina stosował Rodriguez-Bencomo [3]. Przy dłuższej ekstrakcji – 30 minutowej, ilość zaadsorbowanych związków była mniejsza co może być spowodowane procesem desorpcji związków lotnych z włókna, które przez dłuższy czas było utrzymywane w temperaturze 50°C. Niektórzy autorzy za optymalny uznali jednak czas ekstrakcji powyżej 40 minut [13, 14].

3.3. Dobór objętości próby

W celu uzyskania jak największej wydajności ekstrakcji, sprawdzono wpływ różnej objętości próby na ilość wyekstrahowanych związków lotnych. Przetestowano dwa warianty: 5ml próby w fiolce o pojemności 20ml oraz 10ml próby również w fiolce o pojemności 20ml. Wyniki przedstawiono na Rysunku 3. W drugim przypadku uzyskano dużo lepszy rezultat, ponieważ

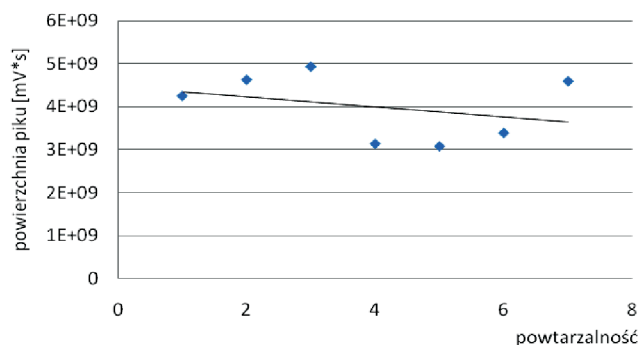


Rysunek 3. Wpływ objętości próby na zawartość związków lotnych zaabsorbowanych na włóknie Carboxene/Divinylbenzene/PDMS

na włóknie zostało zaadsorbowanych ponad dwa razy więcej związków lotnych. Również Carrillo uzyskał największą wydajność ekstrakcji umieszczając 10ml wina w fiolce o pojemności 20ml [14]. W przypadku techniki SPME najlepsze wyniki uzyskuje się wówczas, gdy objętość fazy gazowej jest jak najmniejsza, ponieważ im mniejsza jest ta objętość, a większa objętość fazy ciekłej, tym większe stężenie związków lotnych w fazie gazowej.

3.4. Powtarzalność analiz

Przeanalizowano możliwość prowadzenia kilkukrotnej ekstrakcji z tej samej fiolki, w celu określenia czy ekstrakcja analitu do włókna SPME prowadzi do zmniejszenia zawartości analitu w próbce. Przeprowadzono ekstrakcję w siedmiu powtórzeniach z tej samej fiolki po 20 minut każda. Uzyskane rezultaty przedstawiono na Rysunku 4. Nie stwierdzono znaczących zmian w ilości związków lotnych zaadsorbowanych na włóknie w kolejnych powtórzeniach. Proces kilkukrotnej eks-



Rysunek 4. Wpływ ilości powtórzeń ekstrakcji prowadzonej z tej samej fiołki na zawartość związków lotnych zaabsorbowanych na włóknie Carboxene/Divinylbenzene/PDMS

trakcji z tej samej fiołki nie wpłynął również znacząco na zmniejszenie ilości związków lotnych w próbce. Można zatem prowadzić kilkakrotną ekstrakcję z tej samej fiołki. Ilość związków lotnych zaabsorbowanych na włóknie nieznacznie maleje przy czwartym powtórzeniu, zatem najlepiej prowadzić ekstrakcję w trzech powtórzeniach z tej samej fiołki, a następnie uśrednić otrzymane wyniki. Taką samą liczbę powtórzeń przy analizie związków lotnych win stosował Rodríguez-Bencomo [2, 3]. Kilkukrotna ekstrakcja z jednej fiołki przydatna jest w szybkiej analizie profili związków lotnych techniką SPME-MS, gdzie dąży się do jak najkrótszych czasów ekstrakcji, czas analizy

wynosi zazwyczaj od 2 do 5 minut, a konieczność wykonywania kilku powtórzeń podyktowana jest wymogami analizy danych z wykorzystaniem metod chemometrycznych.

4. PODSUMOWANIE

Celem badań była optymalizacja parametrów analizy związków lotnych win czerwonych metodą SPME-GC-MS. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono następujące parametry techniki SPME: włókno szare 2cm, ekstrakcja 20 minut w trzech powtórzeniach z jednej fiołki, objętość próby – 10ml. Do badań wykorzystano chromatograf gazowy ze spektrometrem masowym.

Dane techniczne

Chromatograf gazowy Agilent 7890A połączony ze spektrometrem masowym Agilent 5975C VLMSD. Kolumna Supelcowax-10 (30m x 0,32mm x 0,25µm). Temperatura inżektora -260°C, początkowa temperatura pieca 40°C (utrzymywana przez 1 minutę), następnie rosła co 10°C aż do 230°C. Wykorzystano hel jako gaz nośny, jego przepływ wynosił 0.8 ml/min. Zakres analizowanych mas wynosił: 33-333 Da. Temperatura źródła jonów wynosiła 230°C. Nastrzyki SPME wykonywane były z wyłączonym dzielnikiem strumienia (splitless).

LITERATURA

- [1] Ebeler S.E., Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor, *Food Rev. Intl.*, 2001, 17, 45-64.
- [2] Rodríguez-Bencomo J.J., Conde J.E., Rodríguez-Delgado M.A., García-Montelongo F., Pérez-Trujillo J.P., Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 2002, 963, 213-223.
- [3] Rodríguez-Bencomo J.J., Conde J.E., Garcia-Montelongo F., Perez-Trujillo J.P., Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 2003, 991, 13-22.
- [4] López 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, *J. Chromatogr. A.*, 2002, 966, 167-177.
- [5] Del Carlo M., Pepe A., Sacchetti G., Compagnone D., Mastrocola D., i.in., Determination of phthalate esters in wine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Food Chem.*, 2008, 111, 771-777.
- [6] Falcao L. D., de Revel G., Perello M.C., Riquier L., Rosier J. P., Ayrton Auzani Uberti A., i.in., Volatile profile characterization of young cabernet-sauvignon wines from a new grape growing region Brazil, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 2008, 42, 133-145.
- [7] Mestres M., Busto O., Guasch J., Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static headspace technique with flame photometric detection, *J. Chromatogr. A.*, 1997, 773, 261-269.
- [8] Hayasaka Y., MacNamara K., Baldock G.A., Taylor R.L., Pollnitz A.P., Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis, *Analyt.Bioanal.Chem*, 2003, 375, 948-955.
- [9] Díez J., Domínguez C., Guillén D. A., Veas R., i.in., Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines, *J. Chromatogr. A.*, 2004, 1025, 263-267.

- [10] Pino J.A., Queris O., Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques, *Food Chem* 2010, 122, 1241-1246.
- [11] Carrillo J.D., Tena M.T., Determination of ethylphenols in wine by in situ derivatisation and headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 2547-2558.
- [12] Meijias R.C., Marin R.N., Moreno M.D.G., Barroso C.G., Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine, *J. Chromatogr. A.*, 2003, 995, 11-20.
- [13] Monje M.C., Privat C., Gastine V., Nepveu F., Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 458, 111-117.
- [14] Carrillo J.D., Garrido-Lopez A., Tena M.T., Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, 2006, 1102, 25-36.
- [15] Boutou S., Chatonnet P., Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine, *J. Chromatogr. A.*, 2007, 1141, 1-9.