

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Zastosowanie chromatografii gazowej i elektroforezy kapilarnej do analizy napojów orzeźwiających

DARIUSZ WIDEŁ, JERZY OSZCZUDŁOWSKI, ZYGFRYD WITKIEWICZ
UNIWERSYTET JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH, INSTYTUT CHEMII

Słowa kluczowe: chromatografia gazowa ze spektrometrią mas, elektroforeza kapilarna, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej, lotne związki organiczne, aniony

STRESZCZENIE

Wykonano analizę wybranych lotnych związków organicznych w czterech napojach orzeźwiających metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Dodatkowo zbadano zawartość wybranych anionów nieorganicznych oraz organicznych we wspomnianych napojach metodą elektroforezy kapilarnej. Lotne związki organiczne wyizolowano z fazy nadpowierzchniowej napojów techniką mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej. We wszystkich próbkach wykryto D-limonen, odpowiedzialny za aromat cytrynowy.

Application of gas chromatography and capillary electrophoresis for refreshing drinks analysis

Key words: gas chromatography-mass spectrometry, capillary electrophoresis, solid phase microextraction, volatile organic compounds, anions

ABSTRACT

Gas chromatography-mass spectrometry method was applied for selected volatile organic compounds analysis of four similar refreshing drinks. The presence of selected inorganic and organic anions in mentioned drinks were additionally determined by capillary electrophoresis method. Solid phase microextraction was applied to isolate volatile organic compounds from drinks head space. D-limonene, responsible of lemon flavour, was determined in all samples.

1. WSTĘP

Analiza chemiczna produktów żywnościowych jest niezbędna do oceny ich wartości odżywczych, jakości i świeżości, a także kontroli pod względem obecności sztucznie wprowadzanych dodatków oraz toksycznych zanieczyszczeń. Zapach i smak w przypadku napojów jest jednym z podstawowych czynników wpływających na akceptację artykułów spożywczych przez konsumenta. Ze względu na ograniczone możliwości rozpoznawania zapachów przez człowieka, pożądana jest chemiczna analiza zarówno jakościowa, jak i ilościowa związków wpływających na aromat. Analiza lotnych składników dotyczy surowców stosowanych do produkcji napojów oraz gotowych produktów i materiałów mających z nimi bezpośredni kontakt.

W analizie napojów stosuje się niezwykle czułe metody instrumentalne: chromatografię gazową (GC) i wysokosprawną chromatografię cieczową, które często sprzężone są ze spektrometrią mas (MS). Metody te w większości przypadków wymagają wcześniejszego przygotowania próbek do analizy. W ostatnim czasie do oznaczania wybranych jonów organicznych i nieorganicznych zaczęto stosować elektroforezę kapilarną (CE) [1]. Proces analityczny można podzielić na kilka etapów: pobranie próbki, przygotowanie jej do analizy, rozdzielenie składników, detekcję i opracowanie wyników. W całym tym cyklu ponad 80% czasu poświęca się na przygotowanie próbek metodami ekstrakcyjnymi, które mają na celu nie tylko wyizolowanie analitów, ale także ich załączenie. Z tego względu wybór odpowiedniej metody przygotowania próbki wpływa bezpośrednio na czas analizy, dokładność i precyzję oznaczeń. Najczęściej wykorzystywanymi metodami przygotowywania próbek są: ekstrakcja ciecz – ciecz rozpuszczalnikami organicznymi lub cieczami w stanie nadkrytycznym oraz ekstrakcja do fazy stałej (SPE) lub mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME) [2]. Na zapach i smak napojów wpływają obecne w nich lotne związki organiczne (LZO). Bardzo skuteczną metodą oznaczania LZO w napojach jest SPME z fazy nadpowierzchniowej opisywana akronimem HS-SPME [3]. Istnieją również techniki oznaczania terpenów, związków też odpowiadających za zapach i smak, w których próbki przygotowuje się połączoną metodą SPE i SPME [4].

Celem tej pracy było oznaczenie oraz porównanie LZO występujących w czterech wybranych napojach typu cola metodą HS-SPME-GC-MS. Dodatkowo oznaczono i porównano wybrane aniony organiczne i nieorganiczne występujące w owych napojach stosując metodę elektroforezy kapilarnej.

2. ANALIZA LZO METODĄ HS-SPME-GC-MS

2.1 Analizowane próbki

Analizie poddano cztery napoje orzeźwiające, których nazwy przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1 Zestawienie badanych napojów

Table 1 Comparison of examined drinks

Nazwa	Producent
Coca-Cola	Coca-Cola Company
Pepsi	Pepsi Co.
Hoop Cola	Hoop Sp. z o.o. (należy do grupy Kofola S.A.)
Cola Original	Hoop Sp. z o.o.

2.2 Przygotowanie próbek i ekstrakcja analitów

Próbki napojów poddawano częściowemu odgazowaniu w łaźni ultradźwiękowej. Następnie próbkę każdego napoju o objętości 8 cm³ umieszczano we fiolkach z ciemnego szkła o objętości 15 cm³, przez co uzyskano objętość 7 cm³ fazy nadpowierzchniowej. Do każdej próbki dodano 0,2 g chlorku sodu spektralnie czystego z firmy POCh, w celu zwiększenia wartości siły jonowej roztworu, a w rezultacie szybszej migracji LZO do fazy nadpowierzchniowej. Fiolki zaopatrzone w zakrętki z silikonowymi uszczelkami, co zapewniło szczelność układu.

LZO izolowano z badanych próbek metodą HS-SPME. Procedura i kolejne etapy metody HS-SPME zostały omówione przez autorów w innej pracy [5].

W celu ustalenia się stanu równowagi stężeń LZO pomiędzy fazą ciekłą i fazą nadpowierzchniową w fiolce, próbki umieszczano na statywie z mieszadłem magnetycznym (500 obrotów/min) na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Wykorzystano włókno mikrostrzykawki SPME pokryte niepolarną fazą stacjonarną – polidimetylosiloksanem o grubości 100 μm, firmy Supelco. Przed rozpoczęciem ekstrakcji włókno poddano kondycjonowaniu w dozowniku chromatografu gazowego, w temperaturze 250°C przez 30 min. Następnie włókno SPME wprowadzano do warstwy nad po-

wierzchnią próbki na 30 minut, w trakcie których następowała sorpcja LZO na włóknie. Czas ekspozycji włókna w fazie nadpowierzchniowej został ustalony na podstawie wcześniejszych testów, poprzez ustalenie zależności czasu ekstrakcji od powierzchni pików chromatograficznych. Ekspozycja włókna dłuższa niż 30 min nie powodowała zwiększenia powierzchni pików, dlatego zdecydowano, że jest to optymalny czas ekstrakcji.

Po upływie 30 minut włókno umieszczano na 1 minutę w dozowniku chromatografu gazowego o temperaturze 250 °C w celu desorpcji analitów. Czas desorpcji dobrano na tej samej podstawie co czas ekspozycji włókna.

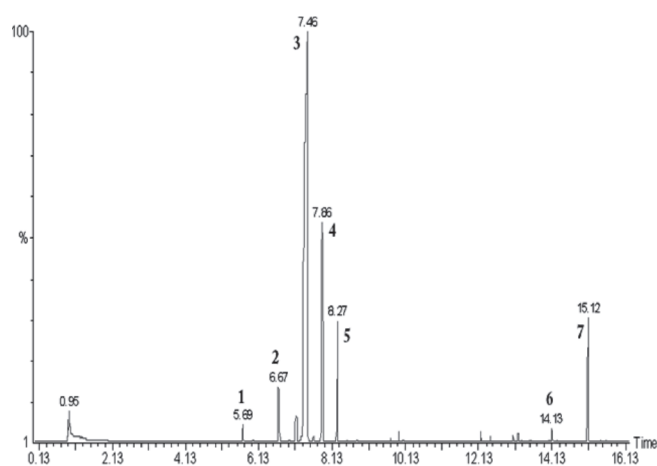
2.3 Przebieg analizy metodą GC-MS

Analizę LZO przeprowadzono w chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas firmy PerkinElmer, model Clarus 600 T. Anality rozdzielono w kolumnie HP-5MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu 0,25 mm. Fazę stacjonarną stanowił 5%-difenyl-95%-dimetylopolisiloksan. Jako gazu nośnego użyto helu o czystości 6.0 i stałej prędkości przepływu 2 ml/min. Termostat GC zaprogramowano następująco: temperatura początkowa wynosiła 40°C i utrzymywana była przez 1 minutę, a następnie rosła do 240°C z szybkością 10°C/min. Końcowa temperatura utrzymywana była jeszcze przez 3 min. Czas analizy wynosił 25 minut.

Parametry spektrometru mas były następujące: widma mas uzyskano w trybie jonizacji elektrobowej, przy potencjale 70 eV i napięciu 350 eV. Temperatura źródła jonów oraz linii przesyłowej z chromatografu do detektora wynosiła 200°C.

2.4 Wyniki i ich dyskusja

Otrzymane widma mas poddane zostały analizie przy użyciu programu Enhanced ChemStation Data Analysis oraz baz danych widm mas NIST.05 (US National Institute of Standards and Technology). Identyfikację uznawano za poprawną, gdy otrzymywano widmo mas o trafności minimum 90%. Na Rysunku 1 przedstawiono przykładowy chromatogram analizowanej próbki, w Tabeli 2 zestawiono zidentyfikowane związki chemiczne. W Tabeli 2 zestawiono 14 oznaczonych związków chemicznych. Na chromatogramie (Rys. 1.) widać 7 z 14 oznaczonych związków. Pozostałe związki chemiczne oznaczono na podstawie chromatogramów kolejnych 3 próbek.



Rysunek 1 Chromatogram składników fazy nadpowierzchniowej napoju Coca-Cola

Figure 1 Chromatogram of head space composition of Coca-Cola

- 1:** (1S,5S)-2,6,6-trimetylobicyklo [3.1.1] hept-2-en; (+)- α -Pinen,
- 2:** 7-metylo-3-metyleno-1,6-oktadien; b-myrcen,
- 3:** 4-metylo-1-(1-metyloetylo)-1,3-cykloheksadien; α -terpinen,
- 4:** 4-izopropenylo-1-metylo-cykloheksen; D-Limonen,
- 5:** 4-metylo-1-(1-metyloetylo)-1,4-cykloheksadien; γ -terpinen,
- 6:** 3,7,7-trimetylobicyklo [4.1.0] hept-2-en; (+)-4-karen,
- 7:** S-1-metylo-4-(5-metylo-1-metyleno-4-heksenyl) cykloheksen.

Większość zidentyfikowanych substancji to terpeny. Terpeny należą do najbardziej rozpowszechnionych związków naturalnych. Są one stosowane w przemyśle perfumeryjnym oraz w produktach żywnościowych ze względu na ich przyjemny zapach. Jednym ze zidentyfikowanych związków jest D-Limonen, który ma silny cytrynowy zapach i stosowany jest w produkcji żywności do maskowania gorzkiego smaku alkaloidów. Z wyników przedstawionych w Tabeli 2 oraz z chromatogramu na Rysunku 1 wynika, że związek ten występuje w największej ilości w każdej próbce. Wykryto również obecność takich związków jak terpine-ny, które występują głównie w postaci mieszaniny przynajmniej dwóch izomerów strukturalnych, najczęściej α i γ . Znalezione je między innymi w olejku kolendrowym i majerankowym [6].

3. ANALIZA WYBRANYCH ANIONÓW METODĄ CE

W drugim etapie pracy wykonano analizę wybranych anionów organicznych oraz nieorganicznych w próbkach napojów przedstawionych w Tabeli 1, metodą CE. Istotą tej metody jest rozdzie-

Tabela 2 Zestawienie zidentyfikowanych związków chemicznych w badanych próbkach
Table 2 Comparison of identified chemical compounds in examined samples

Lp.	Nazwa związku chemicznego	Coca-Cola	Pepsi	Hoop Cola	Cola Original
1.	(1S,5S)-2,6,6-trimetylobicyklo [3.1.1] hept-2-en; (+)- α -Pinen	+	-	-	-
2.	7-metylo-3-metyleno-1,6-oktadien; b-myrcen,	+	-	-	+
3.	4-metylo-1-(1-metyloetylo)-1,3-cykloheksadien; α -terpinen	+	+	-	-
4.	4-izopropenylo-1-metylo-cykloheksen; D-Limonen	+	+	+	+
5.	4-metylo-1-(1-metyloetylo)-1,4-cykloheksadien; γ -terpinen	+	+	+	+
6.	3,7,7-trimetylobicyklo [4.1.0] hept-2-en; (+)-4-karen	+	+	-	-
7.	5-1-metylo-4-(5-metylo-1-metyleno-4-heksenyl) cykloheksen	+	+	+	+
8.	2,4,6-tris(1,1-dimetyloetylo) fenol	-	+	+	+
9.	1-metylo-2-(1-metyloetylo) benzen	-	+	+	+
10.	1-metylo-4-(1-metyloetylideno)-1- cykloheksen; α - terpinolen	-	+	+	+
11.	1-metylo-4-izopropyl-1-cykloheksen-4-ol	-	+	-	-
12.	2-(4-metylo-3-cykloheksen)-2-propanol	-	+	+	+
13.	1-izopropyl-4-metylo-7-oksabicyklo[2,2,1] heptan	-	-	+	-
14.	2,6-dimetylo-6-(4-metylo-3-pentenyl) bicyklo [3,10,1] hept-2-en	-	-	-	+

lanie analitów migrujących w kapilarze w stronę detektora pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego [7].

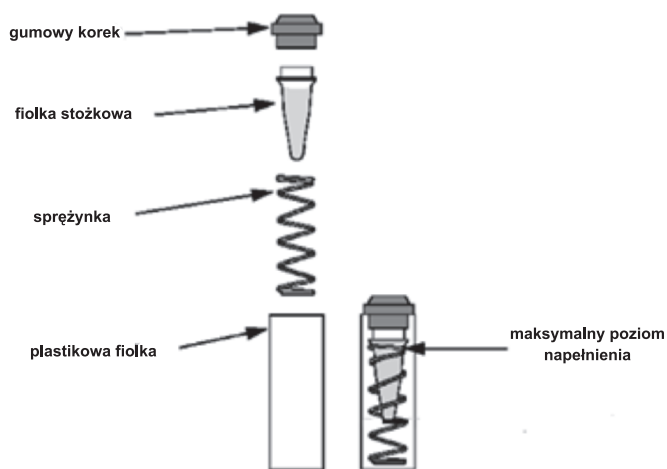
3.1 Przygotowanie odczynników i próbek

Do analizy anionów użyto zestawu odczynników zakupionego w firmie Beckman Coulter. Zestaw zawierał między innymi bufor boranowy do rozdzielania analitów, 0,1 M NaOH jako kondycjoner, wodę redestylowaną do płukania kapilary oraz wzorcowe roztwory wodne anionów.

3.2 Przygotowanie roztworów wzorcowych i próbek do analizy

Pierwszym krokiem było przygotowanie roztworów roboczych anionów poprzez odpowiednie rozcieńczenie wzorcowych roztworów wodnych anionów wodą redestylowaną w celu wyznaczenia krzywych kalibracyjnych. Stężenia roztworów roboczych anionów oraz ich skład przedstawiono w Tabelach 3 i 4.

Próbki napojów poddawano odgazowaniu w łaźni ultradźwiękowej, około 25 min. Następnie umieszczano po 200 μ l każdej próbki w specjalnym naczynku przedstawionym na Rysunku 2. Roztwory robocze umieszczano w identycznych naczynkach również po 200 μ l.



Rysunek 2 Schemat układu, w którym umieszczano fiolkę z próbką [8]

Figure 2 Sample vial setup

3.3 Aparatura i przebieg analizy

Analizy wykonano w aparaturze do elektroforezy kapilarnej firmy Beckman MDQ wyposażonej w detektor UV (absorbancja mierzona była przy długości fali $\lambda = 230$ nm). Schemat aparatury przedstawiono na Rysunku 3. Do analiz wykorzystano kapilarę ze stopionej krzemionki o średnicy 75 μ m i całkowitej długości 60,2 cm. Parametry analizy elektroforetycznej były następujące: napięcie prądu podczas rozdzielania wynosiło

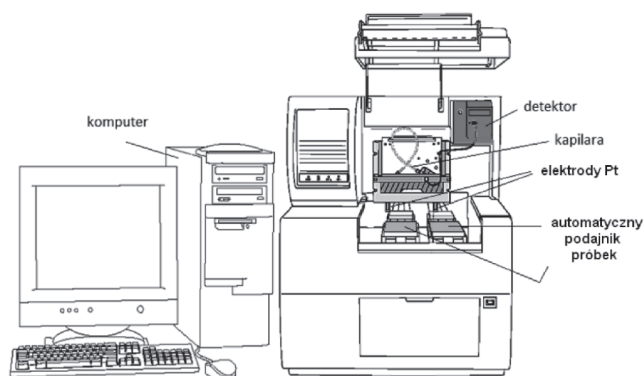
30 kV, temperatura kapilary: 25°C, temperatura przechowywania próbki: 25°C, temperatura kapilary: 25°C.

Tabela 3 Skład roztworu roboczego anionów nieorganicznych
Table 3 Composition of inorganic anions working solution

Nazwa anionu	Poziom 1 [ppm]	Poziom 2 [ppm]	Poziom 3 [ppm]	Poziom 4 [ppm]
Chlorkowy	4	8	16	20
Azydkowy	2	4	8	10
Siarczanowy (VI)	4	8	16	20
Azotanowy (V)	4	8	16	20
Fluorkowy	2	4	8	10
Fosforanowy (V)	10	20	40	50

Tabela 4 Skład roztworu roboczego anionów organicznych
Table 4 Composition of inorganic anions working solution

Nazwa anionu	Poziom 1 [ppm]	Poziom 2 [ppm]	Poziom 3 [ppm]	Poziom 4 [ppm]
Mrówczanowy	4	8	16	20
Bursztynianowy	4	8	16	20
Octanowy	4	8	16	20
Propionianowy	4	8	16	20
Butanowy	4	8	16	20
Walerianianowy	4	8 </td <td>16</td> <td>20</td>	16	20
Kaproanianowy	4	8	16	20
Oktaanowy	4	8	16	20



Rysunek 3 Schemat aparatury do elektroforezy kapilarnej [8]

Figure 3 Capillary electrophoresis apparatus schema

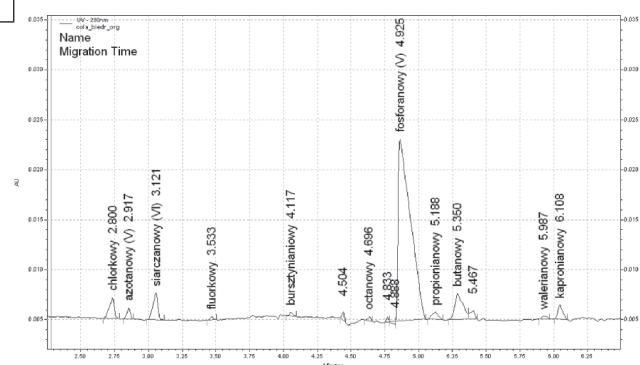
Fiolki polietylenowe o objętości 1,5 cm³ wypełniano odpowiednimi odczynnikami do analizy i umieszczano na tackach w automatycznym podajniku. Czas analizy wynosił 12 min. wg schematu:

1. Płukanie wodą redestylowaną przez 0,5 min pod ciśnieniem 20 psi.
2. Płukanie buforem do rozdzielania przez 0,5 min pod ciśnieniem 20 psi.
3. Dozowanie próbki przez 8 s pod ciśnieniem 0,5 psi.
4. Dodatkowe dozowanie wody (postiniekcja) przez 10 s pod ciśnieniem 0,1 psi.
5. Rozdzielanie analitów w próbce pod napięciem 30 kV, t = 10 min.
6. Płukanie kondycjonerem (0,1 M Na OH) przez 0,5 min pod ciśnieniem 20 psi.
7. Płukanie wodą redestylowaną przez 0,5 min pod ciśnieniem 20 psi.

3.4 Wyniki i ich dyskusja

Analizę ilościową wybranych anionów wykonano metodą wzorca zewnętrznego. Użyte krzywe kalibracyjne, dla każdego anionu osobno, wykazują współczynnik regresji liniowej w zakresie od 0,985 do 0,998. Wyniki analizy ilościowej anionów zestawiono w Tabeli 5.

Granica wykrywalności LOD=1 ppm i została obliczona zgodnie z zasadą: LOD=3 razy poziom sygnału do szumu. Granica oznaczalności LOQ=3 razy LOD. Na Rysunku 4 przedstawiono przykładowy elektroforegram anionów nieorganicznych.



Rysunek 4 Elektroforegram anionów w jednej z próbek; największy pik pochodzi od anionu fosforanowego (V)

Figure 4 Anions electropherogram of selected sample, the biggest peak comes from phosphate (V) anion

W próbkach badanych napojów oznaczono 11 anionów. Obecność niektórych z nich świadczy o obecności kwasów organicznych lub ich estrów. W największej ilości zidentyfikowano anion fosforanowy (V). Kwas fosforowy dodawany jest do napojów jako regulator kwasowości. Stężenie tego kwasu w badanych próbkach było bardzo

Tabela 5 Wyniki analizy ilościowej wybranych anionów w próbkach napojów orzeźwiających
Table 5 Quantitative analysis result of selected anions in refreshing drinks samples

Lp.	Nazwa anionu	Stężenie [ppm]			
		Coca-Cola	Pepsi	Hoop cola	Cola Original
1.	chlorkowy	22,1	117,1	3,0	23,0
2.	azotanowy (V)	<1,0	<1,0	<1,0	15,2
3.	siarczanowy (VI)	14,9	22,9	5,7	38,5
4.	fluorkowy	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
5.	fosforanowy (V)	530,3	520,0	526,4	555,7
6.	bursztynianiowy	<1,0	3,7	3,8	3,4
7.	propionianowy	4,5	7,7	30,2	7,6
8.	octanowy	10,9	3,5	5,5	3,2
9.	butanowy	5,9	<1,0	<1,0	7,6
10.	walerianowy	3,4	<1,0	3,1	3,0
11.	kapronianowy	14,9	13,3	14,3	15,5

podobne. Na elektroforegramie widoczne są również piki, które nie zostały zidentyfikowane z powodu braku odpowiednich wzorców.

4. PODSUMOWANIE

Metodą HS-SPME-GC-MS wykryto i zidentyfikowane 14 LZO, a metodą CE 11 wybranych anionów organicznych i nieorganicznych w czterech napojach orzeźwiających. Zidentyfikowane związki są odpowiedzialne za smak i zapach tych napojów. W największej ilości jest w nich obecny D-limonen, dodawany ze względu na silny zapach cytry-

nowy, oraz kwas fosforowy stosowany jako regulator kwasowości. Zastosowanie przedstawionych metod pozwala na kompleksową analizę wybranych napojów. Przedstawione metody można z powodzeniem stosować do analizy innych napojów, np. piwa lub wina.

Źródło finansowania:

Projekt pn. „Stypendia naukowe dla doktorantów kierunków istotnych dla rozwoju regionu” współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.

LITERATURA

- [1] Sadecka J., Polonsky J., Electrophoretic methods in the analysis of beverages, *J. Chromatogr. A*, 880, 2000, 243-279.
- [2] Andujar-Ortiz I., Moreno-Arribas M.V., Martín-Alvarez P.J., Pozo-Bayon M.A., Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography–mass spectrometry analysis of wine volatile compounds, *J. Chromatogr. A*, 1216, 2009, 7351-7357.
- [3] Pohjanheimo T.A., Sandel M.A., Headspace volatiles contributing to flavour and consumer liking of wellness beverages, *Food Chem.*, 115, 2009, 843-851.
- [4] Dziadas M., Jeleń H.H., Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach, *Anal. Chim. Acta*, 677, 2010, 43-49.
- [5] Wideł D., Oszczudłowski J., Witkiewicz Z., Zastosowanie mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej do wyznaczenia stałej Henry’ego, *ABiD*, 1/2010, 75-81.
- [6] Vera R.R., Chane-Ming J., Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island, *Food Chem.*, 66, 1999, 143-145.
- [7] Witkiewicz Z., Kałużna-Czaplińska J., *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*, WNT, Warszawa, 2011.
- [8] *Anion Analysis User’s Guide*, Beckman Coulter, Inc., 2008.