

Anita SKRZYPCZAK, Marian KAMIŃSKI*

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk,
e-mail: mknkj@chem.pg.gda.pl*

Nowa metoda rozdzielania składników oraz oznaczania kumaryny w napojach alkoholowych i w maceratach z turówki wonnej (*hierochloe odorata*) z wykorzystaniem RP-HPLC i przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie

New method of separation of components and the determination of the coumarin in alcoholic beverages and a sweet grass (*hierochloe odorata*) macerates using RP-HPLC and reverse flow of an eluent in the column (backflush)

Streszczenie: Kumaryna (1,2-benzopiron) jest naturalną substancją występującą w roślinach stosowanych jako dodatki smakowe i aromatyczne do napojów alkoholowych. W wyniku pojawienia się doniesień o toksyczności kumaryny, ograniczono wykorzystanie ekstraktów roślinnych zawierających ją jako dodatek do żywności i napojów. Ustalono, że maksymalny poziom zawartości kumaryny, bezpieczny dla ludzi w żywności i napojach bezalkoholowych, wynosi 2 mg/kg, a w napojach alkoholowych wynosi 10 mg/kg. Biorąc pod uwagę powyższe, niezwykle ważne jest dysponowanie szybką i selektywną metodą oznaczania zawartości kumaryny zarówno w napojach alkoholowych, jak i w maceratach turówki wonnej, stosowanych do produkcji smakowych napojów alkoholowych. Praca prezentuje wyniki badań nad warunkami rozdzielania i oznaczania kumaryny w napojach alkoholowych i maceratach z turówki wonnej wykorzystywanych do produkcji wódek ziołowych. Warunki analityczne dobrano w ten sposób, by zapewnić optymalną selektywność rozdzielania w jak najkrótszym czasie. W tym celu zastosowano odwrócony układ faz RP-HPLC oraz detektor UV-DAD.

Słowa kluczowe: kumaryna, 1,2-benzopiron, *Hierochloe odorata*, odwrócony układ faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej RP-HPLC, przepływ zwrotny eluentu w kolumnie

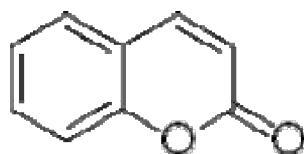
Abstract: The Coumarin (1,2 benzopyrone) is a natural substance occurring in plants which is used as a flavor and an aroma of alcoholic beverages. As a result of reports concerning toxicity of the coumarin, the use of the plants extracts, which were food and beverages additives is reduced. It was established that the maximum content of coumarin, safe for human use in food and soft drinks is 2 mg/kg, in alcoholic drinks is 10 mg/kg. Given the above, it is very important to possess a rapid and selective method for the determination of coumarin in the flavoured alcoholic beverages, as well as macerates of *Hierochloe odorata* used to produce the alcoholic beverages. This paper presents results of research on the conditions of separation and determination of coumarin in alcoholic beverages and macerates of the sweet grass used for the production of herbal vodka. Analytical conditions were defined to ensure optimum selectivity of separation in the shortest possible time. For this purpose, the reversed phase RP-HPLC and UV-DAD detector, were used.

Key words: coumarin, 1,2-benzopyrone, *Hierochloe odorata*, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography RP-HPLC, reverse flow of an eluent in the column (backflush)

1. Wprowadzenie (Introduction)

Kumaryna (1,2-benzopiron) o wzorze strukturalnym przedstawionym na rys. 1, posiada szczególne właściwości aromatyczne. Dawniej była powszechnie stosowana do aromatyzowania napojów, jednak po stwierdzeniu jej toksyczności ograniczono to zastosowanie [1, 2]. Ustalono, że maksymalny poziom zawartości kumaryny, bezpieczny dla ludzi w żywności i napojach bezalkoholowych, wynosi 2 mg/kg, a w napojach alkoholowych wynosi 10 mg/kg [3, 4].

Stwierdzono, że kumaryna po przekroczeniu określonej dawki działa depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) oraz uszkadza narządy mięsiste przede wszystkim wątrobę. U ludzi poważne objawy zatrucia (ból i zawroty głowy, nudności i wymioty) występują po zażyciu 3-4 g kumaryny, jednak już wielogodzinne wdychanie zapachu świeżego siana lub zbyt duże dawki napojów zawierających kumarynę mogą wywołać ból głowy i oszołomienie [1, 2].



Rys. 1. Wzór strukturalny kumaryny
Fig. 1. Structural formula of coumarin

Wczesne metody analizy zawartości kumaryny w żywności oraz w innych produktach najczęściej opierały się na technice chromatografii bibułowej (PC) [5] oraz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC) w normalnym układzie faz [6-11].

Obecnie najczęściej stosowaną techniką do oznaczenia jakościowego i ilościowego kumaryny jest chromatografia gazowa [15, 16, 20-22], wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) w odwróconym układzie faz z detektorem spektrofotometrycznym z matrycą fotodiodową (UV-VIS typu DAD) lub ze spektrometrem mas (MS) [1, 10-20].

W badaniach zawartości kumaryny z zastosowaniem chromatografii gazowej wykorzystuje się detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) [21] lub spektrometr mas (MS) [20, 22]. Najczęściej stosuje się kolumny kapilarne [20-22], a w zależności od stosowanego detektora stosuje się jako gaz nośny: azot [21] bądź hel [20, 22].

W metodach analizy kumaryny z zastosowaniem chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) najczęściej wykorzystywana jest faza stacjonarna modyfikowana łańcuchami oktadecylowymi (ODS), a jako składniki eluentu wykorzystuje się wodny roztwór octanu amonu oraz wodne mieszaniny metanolu bądź acetonitrylu z dodatkiem kwasu octowego bądź mrówkowego [1, 10-20].

W literaturze opisano wiele metod oznaczania kumaryny w żywności oraz innych produktach. Jednakże metody te, w odniesieniu do metodyki przedstawionej w niniejszej pracy, charakteryzują się wykorzystaniem droższej aparatury (HPLC-MS, GC-MS) bądź długim - ponad 30 minutowym czasem analizy (GC-MS, GC-FID), a w przypadku analizy maceratów wymagają wstępnego etapu przygotowania próbki (HPLC-MS, HPLC-DAD, GC-MS, GC-FID).

2. Część doświadczalna (Experimental)

Próbki (Samples)

Próbki napojów alkoholowych zawierających ekstrakt *Hierochloe odorata* jak również macerat turówki wonnej (alk. 52% obj.) otrzymano od dwóch polskich producentów smakowych napojów alkoholowych.

Odczynniki i materiały (Reagents and materials)

Kumaryna o czystości $\geq 99\%$ (do HPLC) (Sigma-Aldrich®, Niemcy), metanol do HPLC (Merck, Niemcy), woda dejonizowana otrzymana z urządzenia Milli Q produkcji Millipore (USA), kwas octowy cz.d.a. (Chempur, Polska).

Aparatura (Apparatus)

Chromatograf cieczowy LaChrom (Merck-Hitachi), wyposażony w czterokanałowy system elucji, pompę L-7100, degazer, zawór dozujący Rheodyne Rh-7125 z pętlą dozującą 20 μl , kolumnę chromatograficzną, detektor spektrofotometryczny UV-VIS-DAD 7450, oprogramowanie HSM oraz dodatkowo w sześcioprogramowy dwupołożeniowy zawór Rheodyne Rh-7000, w celu wykonywania przepływu zwrotnego eluentu przez kolumnę.

Parametry metody (Method parametres)

Próbki napojów spirytusowych analizowane były w formie pierwotnej (bez rozcieńczania). Próbkę maceratu trawy żubrowej została rozcieńczona w stosunku 1:3 za pomocą 52% etanolu, w celu zapewnienia liniowości odpowiedzi detektora.

W badaniach zastosowano kolumnę LiChrospher® 100, RP18e, 5 μm , 250 x 4 mm (Merck, Niemcy), temperatura kolumny 25°C.

Rozdzielanie składników maceratu roślinnego *Hierochloe odorata* oraz smakowych napojów alkoholowych prowadzono w warunkach elucji izokratycznej, gdzie eluent stanowiła mieszanina metanolu z wodą w stosunku 1:1 z dodatkiem kwasu octowego (pH 3,3). Przepływ wynosił 1 ml/min, objętość dozowania wynosiła 20 μl . Po zakończeniu elucji kumary-

ny z próbek maceratu przełączono kolumnę do trybu elucji wstecznej, w celu elucji wszystkich składników silnie oddziałujących z fazą stacjonarną. Długość fali, przy której prowadzono monitorowanie: 278 nm.

Analizę jakościową oparto o porównanie widm w zakresie 210 do 600 nm, w tym na określeniu długości fali maksimum widma pików z rozdzielania próbki napoju spirytusowego i próbki maceratu trawy żubrowej z widmem wzorca kumaryny, a także o porównanie czasu retencji lub współczynników retencji (k) odpowiedniego pików na chromatogramach próbek z wartością czasu retencji (współczynników retencji) substancji wzorcowej.

Analizę ilościową dokonano metodą krzywej kalibracyjnej, w oparciu o sygnał detektora UV- VIS typu DAD. Wykonano dwie krzywe kalibracyjne, jedną dla próbki napoju spirytusowego (krzywa 4-punktowa) oraz drugą dla próbki maceratu trawy żubrowej (krzywa 4-punktowa). W celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej dla próbek napoju spirytusowego przygotowano roztwory wzorcowe kumaryny w zakresie stężeń od 3,45 do 14,85 [mg kumaryny/dm³, 40% etanolu]. W celu wykreślenia krzywej kalibracyjnej zawartości kumaryny dla maceratu trawy żubrowej przygotowano roztwory wzorcowe w zakresie stężeń od 198 do 660 [mg kumaryny/dm³, 52% etanolu].

Za granicę wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ) kumaryny, przyjęto zawartość w mg/dm³ odpowiadającą pikowi, odpowiednio o wysokości 3 krotności oraz 10-cio krotności poziomu szumów detektora.

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

Warunki elucji opisane wcześniej pozwoliły na szybkie i selektywne rozdzielanie kumaryny od innych składników zawartych w smakowym napoju spirytusowym bądź w maceracie z trawy żubrowej.

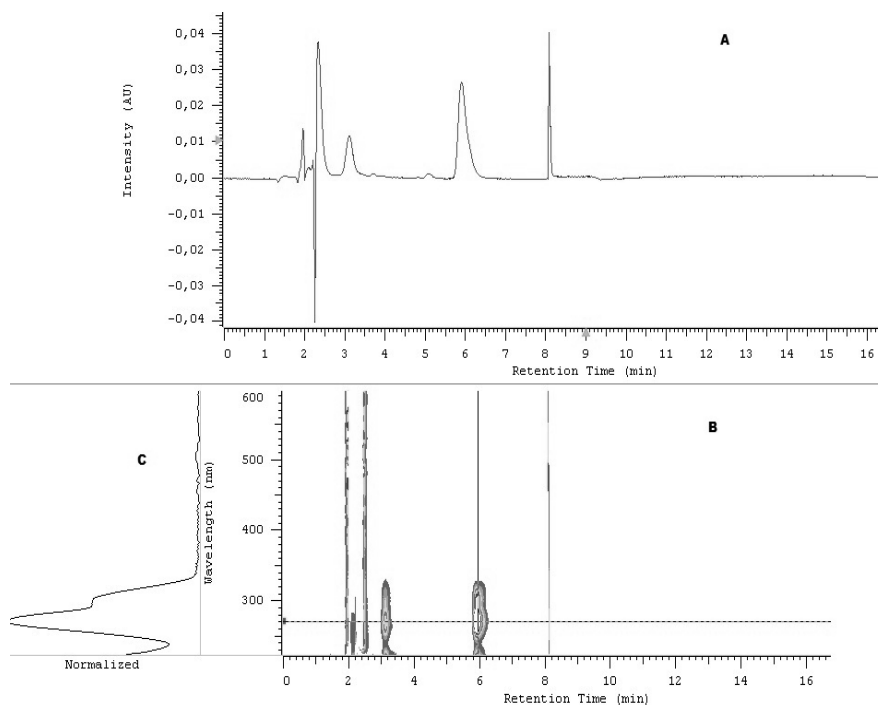
Czas retencji kumaryny w napoju spirytusowym wyniósł 5,85 min. ($k = 1,95$), a w maceracie trawy żubrowej wyniósł 5,88 ($k = 1,97$). Całkowity czas analizy napoju spirytusowego nie przekroczył 8-iu minut. Całkowity czas analizy maceratu *Hierochloe odorata* wraz z przepływem zwrotnym eluentu przez kolumnę i elucją w ten sposób składników o wysokiej retencji, nie przekroczył 25 minut.

Granica wykrywalności kumaryny dla opracowanej metody wynosi 0,2 mg/L, a granica oznaczalności wyniosła 0,6 mg/L.

Równanie krzywej kalibracyjnej dla kumaryny zawartej w napoju alkoholowym wynosiło $y = 47158x + 9211,4$, a współczynnik korelacji wyniósł 0,999. Równanie krzywej kalibracyjnej dla kumaryny zawartej w maceracie wynosiło $y = 45516x + 10^6$, a współczynnik korelacji wyniósł 0,998. Wartości pola powierzchni dla substancji wzorcowej oraz kumaryny w badanej próbce są wartościami średnimi dla co najmniej dwóch rezultatów nieróżniących się o więcej niż 5% względnych.

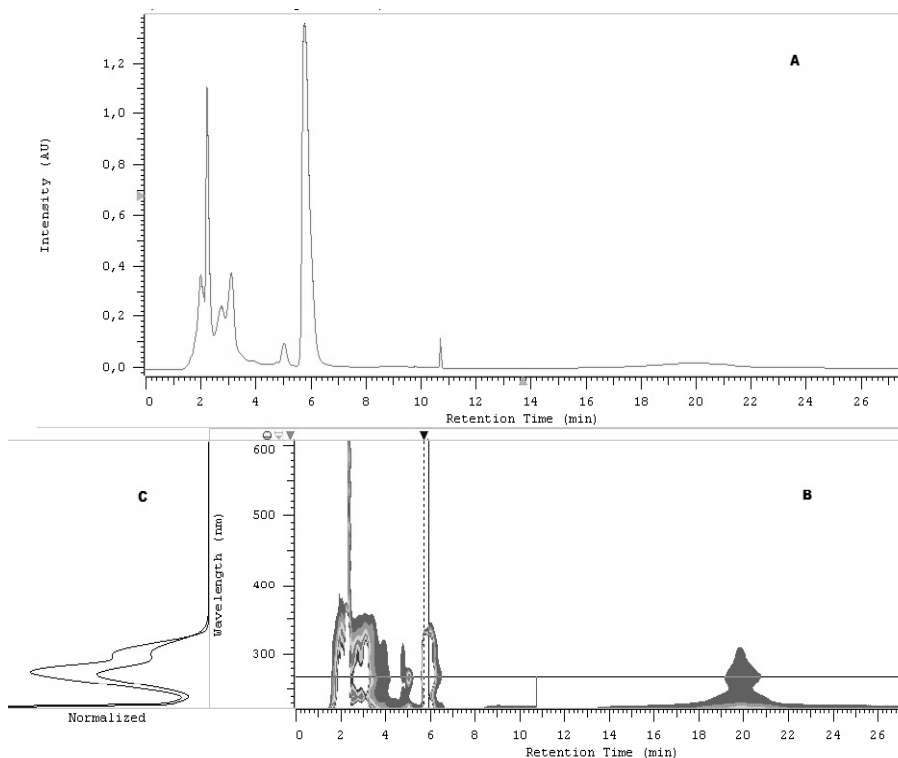
Tabela 1. Porównanie danych statystycznych metody oznaczania kumaryny w napoju alkoholowym oraz w maceracie *Hierochloe odorata*
Table 1. Comparison of statistical data of determination of coumarin in the alcoholic beverage and the macerate of *Hierochloe odorata*

	Oznaczenie kumaryny w napoju alkoholowym	Oznaczenie kumaryny w maceracie <i>Hierochloe odorata</i>
Współczynnik korelacji R^2	0,999	0,998
Względne odchylenie standardowe (% RSD dla n=5)	0,3	0,9
Granica oznaczalności LOQ [mg/L]		0,6
Granica wykrywalności LOD [mg/L]		0,2



Rys. 2. Chromatogram rozdzielania składników próbki smakowego napoju alkoholowego, uzyskany za pomocą detektora UV-DAD. Kolumna: LiChrospher® 100, RP18e, 5 μm , 250 x 4 mm. Temperatura kolumny: 25°C. Przepływ: 1 ml/min. Eluent: MeOH-H₂O 1:1 v/v, z dodatkiem CH₃COOH (pH=3,3). Typ elucji: izokratyczna. Detektor: UV-DAD. Objętość dozowana: 20 μl . **A** – chromatogram przy długości fali - 278 nm, **B** – chromatogram w odwzorowaniu poziomicowym w zakresie od 210 nm do 600 nm. **C** – Widmo kumaryny uzyskane za pomocą detektora UV-DAD

Fig. 2. Chromatogram of separation process of alcoholic beverage sample components produced by the UV-DAD detector. Column: LiChrospher® 100, RP18e, 5 μm , 250 x 4 mm. Column temperature: 25°C. Flow: 1 ml/min. Eluent: MeOH-H₂O 1:1 v/v, with addition of CH₃COOH (pH=3,3). Type of elution: isocratic. Detector: UV-DAD. Sample injection volume: 20 μl . **A** – chromatogram at a wavelength of - 278 nm, **B** – chromatogram in the leveling mapping in a range from 210 nm to 600 nm. **C** – Spectrum of coumarin produced by the UV-DAD detector



Rys. 3. Chromatogram rozdzielania składników próbki maceratu z turówki wonnej, uzyskany za pomocą detektora UV-DAD. Kolumna: LiChrospher® 100, RP18e, 5 μ m, 250 x 4 mm. Temperatura kolumny: 25°C. Przepływ: 0,8 ml/min. Eluent: MeOH-H₂O 1:1 v/v, z dodatkiem CH₃COOH (pH=3,3). Typ elucji: izokratyczna. Detektor: UV-DAD. Objętość dozowana: 20 μ l. **A** – chromatogram przy długości fali- 278 nm, **B** – chromatogram w odwzorowaniu poziomicowym w zakresie od 210 nm do 600 nm. **C** – Widmo kumaryny uzyskane za pomocą detektora UV-DAD

Fig. 3. Chromatogram of separation process of the sweet grass macerate sample components produced by the UV-DAD detector. Column: LiChrospher® 100, RP18e, 5 μ m, 250 x 4 mm. Column temperature: 25°C. Flow: 0.8 ml/min. Eluent: MeOH-H₂O 1:1 v/v, with addition of CH₃COOH (pH=3,3). Type of elution: isocratic. Detector: UV-DAD. Sample injection volume: 20 μ l. **A** – chromatogram at a wavelength of - 278 nm, **B** – chromatogram in the leveling mapping in a range from 210 nm to 600 nm. **C** – Spectrum of coumarin produced by the UV-DAD detector

W tabeli 1 przedstawiono dane statystyczne opracowanej metody. Uzyskana powtarzalność wartości czasu retencji, współczynnika korelacji oraz względnego odchylenia standardowego %RSD (obliczonego dla 5 kolejnych dozowań próbki roztworu wzorcowego substancji badanej) zarówno dla kumaryny oznaczanej w smakowym napoju alkoholowym jak i maceracie *Hierochloe odorata*, świadczy o zadawalającej powtarzalności opracowanej metody.

Na rys. 2 i 3 przedstawiono odpowiednio przykłady chromatogramów dla próbki napoju spirytusowego oraz maceratu trawy żubrowej.

Istotną zaletą metodyki zastosowanej w niniejszej pracy jest wykorzystanie przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie. Co szczególnie dla próbek maceratu z turówki wonnej zapewnia bardzo dobrą powtarzalność parametrów retencji i umożliwia nie stosowanie kolumn ochronnych, jak również wstępnego przygotowania próbki z zastosowaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE *ang. Solid Phase Extraction*).

4. Wnioski (Conclusions)

Opisana w literaturze technika oznaczania kumaryny w żywności [15] z zastosowaniem HPLC-MS/MS charakteryzuje się ok. 10 krotnie niższą granicą wykrywalności i oznaczalności od metodyki opisanej w niniejszej pracy. Należy jednakże wziąć pod uwagę, iż koszty aparatury są wielokrotnie wyższe w przypadku HPLC-MS/MS niż w przypadku HPLC-DAD. Ponadto, autorzy publikacji [15] porównali i stwierdzili, że współczynnik zmienności (względne odchylenie standardowe) dla techniki HPLC-MS/MS jest większy niż dla techniki HPLC-DAD, co powoduje, że powtarzalność oznaczania kumaryny z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas jest znacząco mniejsza.

Biorąc pod uwagę, iż w badanych próbkach smakowych napojów alkoholowych stężenie kumaryny nigdy nie było niższe niż 4 mg/L, można stwierdzić, że przedstawiona w niniejszym artykule metoda jest w pełni przydatna do kontroli zawartości kumaryny w napojach alkoholowych, a także w maceratach trawy żubrowej.

Zastosowanie przepływu zwrotnego podczas analiz maceratu z turówki wonnej pozwoliło na ominięcie etapu wstępnego oczyszczania próbki np. techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE), co pozwoliło na skrócenie całkowitego etapu badania próbki, a także zapewnia całkowite usunięcie z kolumny związków silnie oddziałujących z fazą stacjonarną, co zapewnia powtarzalność wyników oznaczania i długi „czas życia” kolumny.

Opracowana metodyka powinna być także przydatna do badania zawartości kumaryny w żywności, po zastosowaniu odpowiedniej metody ekstrakcji/ługowania opisanej w literaturze np. w pracy [1].

5. Podziękowania (Acknowledgments)

Praca realizowana dzięki wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu promotorskiego Nr N N405 3757 37.

Praca współfinansowana przez Unie Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Projekt systemowy Województwa Pomorskiego pn. "InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów, II edycja.

Podziękowania Pani dr Bogumile Makuch za przekazane informacje będące pomocą w redagowaniu niniejszej pracy.

Literatura
(Literature)

1. C. Sproll, Winfried Ruge, Claudia Andlauer, Rolf Godelmann, Dirk W. Lachenmeier., *HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods*, Food Chem., **109**(2008)462.
2. B.G. Lake, *Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment*, Food Chem. Toxicol., **37**(1999)423.
3. Codex alimentarius (1985). *General requirements for natural flavourings* (CAC/GL 29.1987), www.codexalimentarius.net.
4. European Parliament and Council (2006). *Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods*. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/additives/com2006_427_en.pdf.
5. C.V. van Sumere, G. Wolf, H. Teuchy, J. Kint, *A new thin-layer method for phenolic substances and coumarins*, J. Chromatogr., **20**(1965)48.
6. M. Runkel, M. Tegtmeier, W. Legrum, *Metabolic and analytical interactions of grapefruit juice and 1,2-benzopyrone (coumarin) in man*, Eur. J. Clin. Pharmacol., **50**(1996)225.
7. J. Sherma, S.L. Schafer, K. Morris, *Determination of coumarin in vanilla flavorings by quantitative high performance thin layer chromatography*, J. Liq. Chromatogr., **10**(1987)3585.
8. W. Cisowski, E. Pałka-Gudyka, M. Krauze-Baranowska, Z. Królicki *Preparative TLC of coumarins with gradient elution*, J. Planar Chromatogr., **4**(1991)471.
9. M.J. Cikaló, S.K. Poole, C.F. Poole. *A thin layer chromatographic method for establishing the botanical origin of the cinnamons of commerce*, J. Planar Chromatogr., **5**(1992)135.
10. R.M.S. Celeghini, J.H.Y. Vilegas, F.M. Lanças, *Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of Mikania glomerata spreng ("guaco") leaves*, J. Braz. Chem. Soc., **12**(6)(2001)706.
11. D.P. Bogan, G.J. Keating, H. Reinartz, C.F. Duffy, M.R. Smyth, R. O'Kennedy, *Analysis of coumarins*. In R.O'Kennedy & R.D. Thorens (Eds.), *Coumarins. biology applications and mode of action* (pp. 267–302). Chichers, UK: John Wiley & Sons.
12. K. Sagara, T. Oshima; T. Yoshida, *Determination of Cinnamomi Cortex by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr., **409**(1987)365.
13. A.W. Archer, *Determination of cinnamaldehyde, coumarin and cinnamyl alcohol in cinnamon and cassia by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, **447**(1988)272.
14. A. Bettero, C.A. Benassi, *Determination of coumarin and 6-methylcoumarin in cosmetics by high-performance liquid chromatography*, J. Pharm. Biom. Anal., **1**(2)(1983)229.

15. M. Raters, R. Matissek, *Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*, Eur. Food Res. Technol., **227**(2008)637.
16. L.S. de Jager, G.A. Perfetti, G.W. Diachenko, *Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies*, J. Chromatogr. A, **1145**(1)(2007)83.
17. F. Grundschober, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, **204**(1997)399.
18. Z.D. He, C.F. Qiao, Q.B. Han, C.L. Cheng, H.X. Xu, R.W. Jiang, *Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of cassia bark (cortex cinnamomi) by high-pressure liquid chromatography*, J. Agric. Food Chem., **53**(7)(2005)2424.
19. M.H. Huang, S.J. Sheu, *Determination of Cinnamomi constituents by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*, J. High Resolut. Chromatogr., **23**(9)(2000)561.
20. Z. Yang, T. Kinoshita, A. Tanida, H. Sayama, A. Morita, N. Watanabe, *Analysis of coumarin and its glycosidically bound precursor in Japanese green tea having sweet-herbaceous odour*, Food Chem., **114**(2009)289.
21. A.A. Rahim, B. Saad, H. Osman, N.H. Hashim, S. Yahya, K. Md Talib *Simultaneous determination of diethylene glycol, diethylene glycol monoethyl ether, coumarin and caffeine in food items by gas chromatography*, Food Chem., **126**(3)(2011)1412.
22. S.B. Stanfill, A.M. Calafat, C.R. Brown, G.M. Polzin, J.M. Chiang, C.H. Watson, D.L. Ashley, *Concentrations of nine alkenylbenzenes, coumarin, piperonal and pulegone in Indian bidi cigarette tobacco*, Food Chem. Toxicol., **41**(2003)303.