

Derywatyżacja *in situ* w połączeniu z techniką DLLME-oznaczanie amin biogennych w winach owocowych

Justyna Płotka-Wasyłka¹, Ewa Kłodzińska², Jacek Namieśnik¹

¹Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Analitycznej,
G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Polska

²Instytut Sportu - Państwowy Instytut Badawczy
01-982 Warszawa, Polska
ul. Trylogii 2/16

Aminy biogenne (AB) występujące w organizmie ludzkim na niskich poziomach zawartości są istotne dla wielu funkcji fizjologicznych, odgrywając istotną rolę jako hormony czy też neuroprzekazniki. Jednakże, ze względu na ich aktywność biologiczną, dostarczenie dużej ilości AB wraz z pożywieniem, może mieć toksyczny wpływ na organizm człowieka. W produktach spożywczych, których technologia wytwarzania oparta jest na fermentacji, występują różne drobnoustroje, z których część zdolna jest do wytwarzania związków z grupy AB. Do tej kategorii żywności należą napoje fermentowane, tj.: piwo, cydr, wino owocowe, kefir czy inne napoje regionalne. Napoje fermentowane, w których stężenie etanolu bądź kwasu octowego jest stosunkowo duże, np. wina czy piwa, cieszą się dużym zainteresowaniem jako materiał badawczy wśród naukowców na całym świecie, ponieważ zarówno alkohol jak i aldehyd octowy hamują działanie enzymu MAO oraz DAO (mono- i di-aminooksydazy), które uczestniczą w procesie rozkładania amin biogennych. Ponadto, zawartość poszczególnych amin biogennych obecnych w danych ilościach w winie destruktywnie wpływa na walory smakowe i sensoryczne tego trunku.

Pomimo tego, że bardzo trudne bądź nawet niemożliwe jest wytworzenie wina pozbawionego amin biogennych, to jednak wymagania konsumentów odnośnie zdrowej i o wysokiej jakości żywności doprowadziły do badań nad AB, biorąc pod uwagę ich znaczenie dla zdrowia i życia ludzkiego. Pomimo faktu, że brak jest regulacji europejskich na temat dopuszczalnych zawartości amin biogennych w winach, to jednak monitoring oraz analiza wina w celu oznaczenia zawartości AB jest wymagana przez wielu importerów w UE. Jest to powód dla którego opracowano odpowiednie zalecenia dotyczące dopuszczalnych, maksymalnych stężeń poszczególnych amin biogennych w winie (dopuszczalne stężenie

histaminy: 2 mg/L w Niemczech, 6 mg/L w Belgii, 8 mg/L we Francji). Ponadto, w 2011 r. eksperci z Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina (OIV) opracowali przewodnik, w którym zawarte są informacje na temat prawidłowego prowadzenia procesów realizowanych w winnicach i piwniczkach winnych, aby zminimalizować zawartość amin biogennych w winie.

Na szeroką skalę prowadzi się produkcję wina w warunkach domowych, które następnie jest dopuszczane do obrotu jako np. produkt regionalny. Pomimo tego, że istnieją przepisy prawne regulujące taką produkcję, to często nie zawierają one informacji o dopuszczalnych stężeniach amin biogennych (np. w Polsce Ustawa z dnia 22 stycznia 2004 o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina). Dlatego w celu ochrony zdrowia i życia ludzkiego, tak ważne jest kontrolowanie nie tylko win przemysłowych, ale również win wytwarzanych domowym sposobem, zarówno tych dopuszczonych do obrotu jak i tych wytworzonych na własny użytek. W związku z tym, opracowanie nowych metodyk analitycznych, które w sposób szybki, tani i bezpieczny dla środowiska zapewniły możliwość uzyskiwania miarodajnych informacji o obecności i poziomach zawartości poszczególnych amin biogennych w winie ma zasadnicze znaczenie.

Opracowano wiele procedur w celu oznaczania związków z grupy AB w próbkach napojów winiarskich. W większości z nich wykorzystuje się technikę chromatografii cieczowej (LC), chromatografii gazowej (GC), chromatografii cienkowarstwowej (TLC) lub elektroforezę kapilarną (CE) na etapie detekcji, identyfikacji i ilościowego oznaczenia. Jednakże często opracowane metodyki nie spełniają pokładanych w nich oczekiwań, przede wszystkim ze względu na dużą czaso- i pracochłonność, konieczność stosowania dużych ilości rozpuszczalników organicznych oraz, zazwyczaj, wieloetapowych procesów izolacji i wzbogacania analitów przed etapem oznaczeń końcowych.

Oznaczenie AB w próbkach wina charakteryzujących się złożonym i zmiennym składem matrycy jest bardzo trudne, ponieważ zwykle są one obecne na niskich poziomach zawartości (od $\mu\text{g/L}$ do mg/L). Ponadto, w badanych próbkach win występują również inne związki o bardzo podobnych właściwościach, na zbliżonych, a niekiedy nawet wyższych poziomach zawartości, co bardzo utrudnia i często uniemożliwia wykrycie, identyfikację i ilościowe oznaczenie amin biogennych. Do tego należy dodać fakt, że wiele związków z grupy amin biogennych nie wykazuje takich właściwości, aby możliwe było ich oznaczenie przy użyciu powyżej wspomnianych technik sprzężonych z danym typem detekcji. Dlatego koniecznym staje się przeprowadzenie analitów w odpowiednie pochodne o pożądanym

właściwościach umożliwiającym ich oznaczenie, czyli przeprowadzenie, tzw. procesu derywatywacji, czyli inaczej procesu konwersji chemicznej analitów.

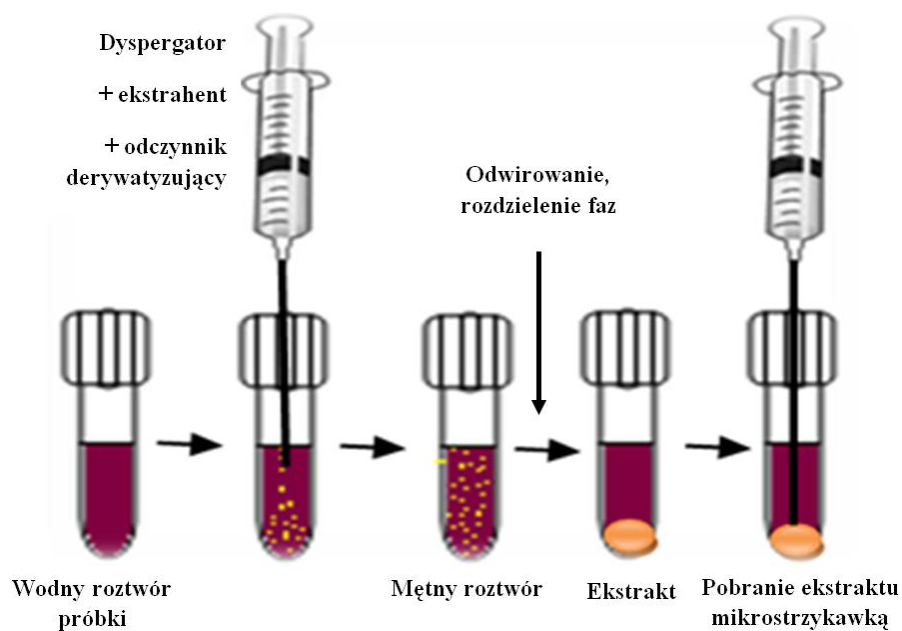
W literaturze można znaleźć potwierdzenie dla tezy, że miniaturyzacja oraz automatyzacja to kluczowe elementy, które powinny być brane pod uwagę przy optymalizacji tych procedur analitycznych, w których występuje etap derywatywacji analitów, jeśli mają być one zaliczone do grupy tzw. zielonych metodyk analitycznych. Rezultatem zastosowania takiego podejścia jest zmniejszenie ilości zużytych odczynników i tym samym, zmniejszenie ilości wytworzonych odpadów. Jedną z technik mikroekstrakcji, która spełnia powyższe wymogi jest dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (DLLME). Ta technika opracowana w 2006 roku składa się z dwóch etapów:

- Wprowadzenia odpowiedniej mieszaniny rozpuszczalników ekstrahującego i dyspergującego do próbki wody (względnie wodnego roztworu próbki) zawierającej anality. Na tym etapie rozpuszczalnik ekstrahujący ulega dyspersji w wodnej próbce do postaci drobnych kropelek, w których anality ulegają wzbogaceniu. Dzięki dużej powierzchni kontaktu pomiędzy rozpuszczalnikiem ekstrahującym a próbką wodną, bardzo szybko ustala się stan równowagi, a wydajność ekstrakcji jest praktycznie niezależna od czasu. Jest to główna zaleta tej techniki.
- Odwirowania mętnego roztworu. Po odwirowaniu anality znajdujące się w dolnej fazie (sedymentacyjnej) można oznaczyć stosując odpowiednie techniki instrumentalne.

Technika DLLME charakteryzuje się szeregiem zalet, a informacje na ten temat są zestawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Zalety i wady techniki DLLME	
Zalety	Wady
<ul style="list-style-type: none"> • szybkość i łatwość stosowania • minimalne objętości zużywanych rozpuszczalników organicznych • wydajność ekstrakcji niezależna od czasu • zastosowanie wzorców wewnętrznych znacznie poprawia powtarzalność • możliwość współprowadzenia procesu derywatywacji 	<ul style="list-style-type: none"> • limitowana możliwość wyboru rozpuszczalnika ekstrahującego • stosowanie mikrolitrowych objętości lotnych rozpuszczalników organicznych przy wyższych temperaturach otoczenia • w przypadku niektórych próbek, wydobycie organicznej kropli spod warstwy osadu na granicy faz

Jedną z zalet techniki DLLME jest możliwość współprowadzenia procesu derywatywacji *in situ*. Rozwiązanie takie niesie za sobą wiele korzyści, m.in.: skraca czas całej procedury analitycznej, zmniejszenie ilości zużytych odczynników i tym samym, zmniejszenie ilości wytworzonych odpadów, mniejsza ilość etapów procedury analitycznej i w konsekwencji zmniejszenie ryzyka straty analitów. Na Rysunku 1. schematycznie przedstawiono etapy przeprowadzenia procesu derywatywacji z jednoczesną ekstrakcją analitów.



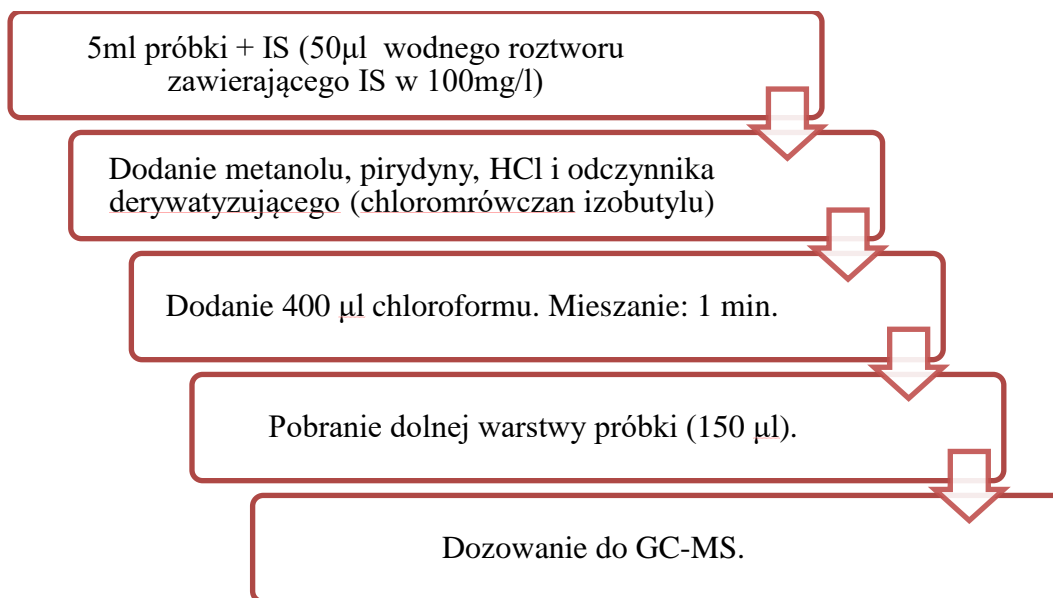
Rysunek 1. Schemat procesu derywatywacji z jednoczesną ekstrakcją analitów z wykorzystaniem techniki DLLME

Oznaczenie wybranych amin biogennych z wykorzystaniem procedury DLLME-GC-MS

Celem prowadzonych badań było opracowanie nowej procedury analitycznej, która umożliwi równoczesne oznaczanie wybranych amin biogennych w próbkach wina produkcji domowej. Zakres pracy obejmował następujące zagadnienia:

- Derywatywacja *in situ* amin biogennych w połączeniu z dyspersyjną mikroekstrakcją w układzie ciecz-ciecz (DLLME); można z całym przekonaniem stwierdzić, że jest to zielona technika przygotowania próbek do analizy;
- Walidacja opracowanej procedury badawczej;
- Oznaczanie wybranych amin biogennych w próbkach win różnego pochodzenia z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS).

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano 17 próbek win sporządzonych w warunkach domowych, przygotowywanych do własnej konsumpcji, które były przechowywane w temperaturze 21°C i chronione przed dostępem światła słonecznego. Procedura analityczna wykorzystana podczas analizy próbek została przedstawiona w sposób schematyczny na Rysunku 2.



Rysunek 2. Schemat opracowana procedury oznaczania amin biogennych w próbkach wina

Optymalizacja procesu derywatywacji i ekstrakcji obejmowała wybór rozpuszczalników: dyspergującego i ekstrahującego oraz odczynnika derywatyzującego. Proces optymalizacji obejmował także dobranie odpowiedniej objętości odczynników oraz ustalenie czasu przeprowadzania derywatywacji. Podczas wyboru rozpuszczalnika ekstrahującego pod uwagę były brane następujące parametry:

- wybór rozpuszczalnika, który nie miesza się z wodą,
- dobór rozpuszczalnika o gęstości większej lub mniejszej od gęstości wody,
- kompatybilności z odczynnikami derywatyzującym.

Na podstawie tych kryteriów badano:

- izooktan (gęstość: 0,83 g/ml),
- toluen (gęstość: 0,87 g/ml),
- chloroform (gęstość: 1,48 g/ml).

W celu wyboru rozpuszczalnika dyspergującego głównymi kryteriami branymi pod uwagę były: mieszalność z rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym oraz mieszalność z roztworem próbek.

Na podstawie tych wymogów wybrano dwa rozpuszczalniki:

- acetonitryl (MeCN),
- metanol (MeOH).

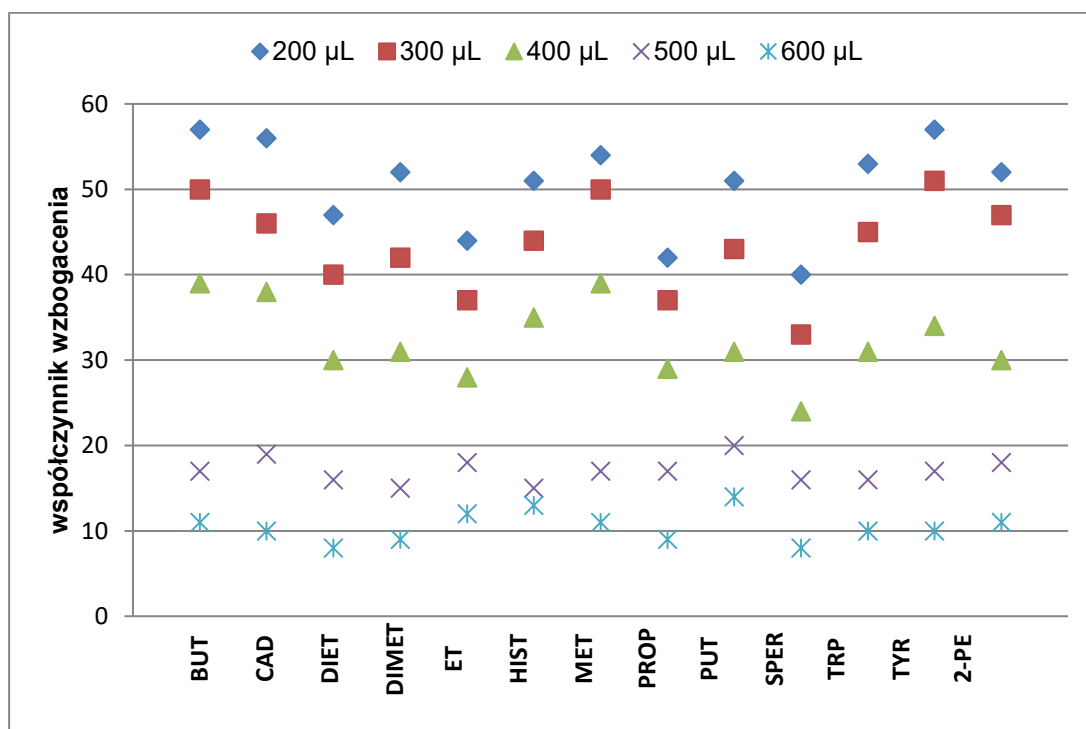
Na etapie wyboru odczynnika derywatyzującego zdecydowano się na alkilowe pochodne chloromrówczanu (chloromrówczan izobutyłu - IBCF oraz chloromrówczan propylu - PCF). Oprócz faktu, że stanowią one bardzo dobry materiał do przeprowadzenia amin biogennych w ich pochodne, które będą oznaczane z wykorzystaniem techniki GC-MS, to posiadają wiele innych zalet, tj: niewielkie koszty, łagodne warunki oraz krótki czas przeprowadzania procesu derywatywacji.

Wyniki uzyskane w trakcie analizy próbek ekstraktów znacząco różniły się dla różnych rozpuszczalników i odczynników derywatyzujących. Większość związków nie została skutecznie wyekstrahowana przez izooktan i toluen, podczas gdy wyniki uzyskane dla chloroformu jako rozpuszczalnika ekstrahującego wskazują na duży stopień ekstrakcji wszystkich pochodnych (zarówno dla pochodnych IBCF jak i pochodnych PCF), w przypadku zastosowania metanolu jako rozpuszczalnika dyspergującego. Biorąc pod uwagę odczynniki derywatyzujące, to zarówno IBCF jak i PCF pozwoliły na uzyskanie bardzo dobrych wyników dla wszystkich analitów, jednakże powierzchnia pików chromatograficznych odpowiadających pochodnym IBCF była większa, dlatego ten odczynnik był brany pod uwagę podczas dalszych badań.

W celu optymalizacji ilości rozpuszczalnika ekstrahującego, badano wpływ różnych objętości chloroformu na wydajność procesu ekstrakcji, przy zastosowaniu stałej ilości rozpuszczalnika dyspergującego (metanolu), mieszaniny pirydyny i HCl oraz IBCF. Najlepsze rozdzielanie chromatograficzne uzyskano przy zastosowaniu 400 μ l chloroformu i ta wartość była stosowana w dalszych badaniach. Informacje na temat uzyskanych stopni wzbogacenia dla danych analitów przy zastosowaniu różnych objętości rozpuszczalnika ekstrahującego przedstawiono na Rysunku 3.

W celu oceny wpływu objętości rozpuszczalnika dyspersyjnego na wydajność procesu ekstrakcji analitów z próbek wina, przeprowadzono badania z zastosowaniem różnych objętości metanolu, zaś tych samych ilości chloroformu, IBCF i mieszaniny pirydyny z HCl. Analizując otrzymane wyniki można stwierdzić, że wraz ze wzrostem ilości MeOH wydajność ekstrakcji wzrasta (dla ilości od 155 μ l do 215 μ l), a następnie nieznacznie spada

(dla 215 μl , 245 μl , 280 μl) dla wszystkich pochodnych. W oparciu o wyniki eksperymentalne wybrano optymalną objętość rozpuszczalnika dyspersyjnego - 215 μl metanolu.



Rysunek 3. Wartości liczbowe współczynnika wzbogacenia uzyskane w wyniku zastosowania różnych ilości rozpuszczalnika ekstrahującego-chloroformu ($n=3$; $RSD < 3.3\%$)

W celu optymalizacji procesu derywatywacji wykonano szereg prób z wykorzystaniem różnych objętości reagenta. Reakcje prowadzono przez różny okres czasu w temperaturze pokojowej. Ocenę skuteczności procesu derywatywacji w różnych warunkach reakcji dokonano porównując wartości liczbowe względnego współczynnika odpowiedzi (RRF). Ze względu na fakt, że wzorzec wewnątrz (IS) jest obojętny w stosunku do pochodnych analitów, im wyższa wartość liczbowego współczynnika RRF, tym większa wydajność procesu. Ta zależność pozwoliła na ocenę wydajności procesu derywatywacji.

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na stwierdzenie, że najbardziej korzystnym odczynnikiem derywatyżującym jest IBCF, ponieważ wykazuje wyższe wartości liczbowe współczynnika RRF dla każdej pochodnej analitu. Ponadto, wyniki wskazują, że optymalne warunki prowadzenia procesu derywatywacji z użyciem IBCF są następujące:

- objętość odczynnikowa: 90 μl ,
- czas reakcji: 15 min.

Dlatego też, dalsze badania prowadzono w takich warunkach procesu derywatywacji.

W celu identyfikacji analitów dokonano analizy próbek roztworów wzorcowych zawierających poszczególne anality. Identyfikacji dokonano na podstawie czasu retencji oraz wykorzystując selektywność detektora MS pracującego w trybie SIM.

Wyznaczono podstawowe parametry walidacyjne opracowanej procedury analitycznej. Uzyskane wyniki wskazywały na dobrą liniowość dla wszystkich oznaczanych związków, a wartości współczynnika korelacji liniowej wynosiły od 0,9961 do 0,9992. LOD mieści się w przedziale od 1,1 do 4,1 µg/l, a LOQ waha się od 3,3 do 11,7 µg/l. Opracowana procedura charakteryzuje się również dużym odzyskiem analitów (77 – 105 %). Wybrane parametry metrologiczne opracowanej procedury DLLME-GC-MS do oznaczenia amin biogennych w próbkach wina i wina owocowego porównano z parametrami metrologicznymi już istniejących procedur stosowanych w praktyce analitycznej (Tabela 2).

Tabela 2. Informacje na temat wybranych metodyk oznaczania amin biogennych w próbkach wina						
Anality	Technika przygotowania próbki do analizy	Proces derywatywacji Tak/Nie	LOD/LOQ	Odzysk [%]	Technika separacyjna	Rodzaj detekcji
BUT, CAD, DET, DMET, ET, MET, HIS, PROP, PUT, SPR, TRYP, TYR, 2-PE	DLLME	TAK	LOD: 1.1-4.1 µg/L LOQ: 3.3-12.3 µg/L	77-105	GC (kolumna: ZB-5MS, 0.25 µm)	MS
TRYP, HIS, CAD, 2-PE, HEX, TYR, SPR	UA-DLLME	TAK	LOD: 1.–7.8 ng/mL LOQ: 3.5–26.1 ng/mL	91.2–108.3	HPLC (kolumna: Hypersil C18)	FLD
PUT, CAD, 2-PE, SPR, SPRE, HIS, TYR	Dodanie PVP	TAK	LOD: 0.09-0.30 mg/L LOQ: 0.30-1.00 mg/L	>78	HPLC (kolumna: C ₁₈ YMC-Pack ODS-A)	UV
HIS, TYR, 2-PE, SER, TRYP, OCT, DOP, CAD, PUT, AGM, SPR, SPRE	Ekstrakcja rozpuszczalnikiem	TAK	LOD: 0.05-0.2 mg/L LOQ: 0.1-0.3 mg/L	93.56-103.28	UHPLC (kolumna: Acquity UPLC BEH C18)	FLD

PROP, DMET, DET, MET, TRYP, CAD, SPR, 2-PE, TYR, PUT, HIS, BUT, HEX, IPENT, IBUT, SPRE, AGM	Rozcieńczenie	TAK	LOD: 0.023-83 µg/dm ³ LOQ: 0.075-270 µg/dm ³	-	HPLC (kolumna: Gemini C- 18)	MS/MS
MET, DMET, ET, DET, PROP, IPROP, BUT, IBUT, AM, IAM, 2-MBUT, HEX, PYR, PIP, MOR, PUT, CAD, 2-PE, HIS, TYR	DLLME	TAK	LOD: 1.8-36.8 µg/L	85-111	GC (kolumna: HP-5MS, 0.25 µm)	MS
HIS, TYR, PUT, CAD, SPR, SPRE, TRYP, 2-PE	Filtracja, dodanie PVP	NIE	LOD: 1-2 µg/L LOQ: 3-8 µg/L	90-113	CE	MS/MS
HIS, TYR, PUT, CAD, SPRE, TRYP, 2-PE	Filtracja	TAK	LOD: 0.06 - 0.11 µg/L	93-104	MECK	LIF
HIS, TRYP, TYR, 2-PE	-	NIE	-	-	MECK	UV
2-PE, SPR, SPRE, CAD, PUT	Homogenizacja, filtracja, rozcieńczenie próbki	TAK	LOD: 0.4 – 12 nM	-	MECK	LIF

Podsumowanie

Pomimo braku oficjalnych dokumentów wprowadzających obowiązkowość oznaczania AB w wyrobach winiarskich, istnieje szereg wymagań importerskich w UE, które wyznaczają limity stężeń poszczególnych AB w winie. Można przypuszczać, że tylko kwestią czasu jest wprowadzenie oficjalnych rozporządzeń, wprowadzających obowiązkowy monitoring ich zawartości w winie, w tym w wyrobach produkowanych w domu i wprowadzanych do obrotu, zwłaszcza w kontekście rozwoju produkcji wyrobów regionalnych. W związku z tym, opracowanie nowych metodyk analitycznych, które w sposób szybki, tani i bezpieczny dla środowiska umożliwiłyby jakościowe i ilościowe oznaczanie poszczególnych AB w winie ma

zasadnicze znaczenie. Bez wątpliwości procedura analityczna oparta na derywatywacji in situ w połączeniu z techniką DLLME oraz GC-MS na etapie oznaczeń końcowych sprawdza się w oznaczaniu AB w wyrobach winiarskich. Rozwiązanie takie niesie za sobą wiele korzyści, m.in.:

- skrócenie czasu całej procedury analitycznej,
- zmniejszenie ilości zużytych odczynników i tym samym, zmniejszenie ilości wytworzonych odpadów,
- zmniejszenie ilość etapów procedury analitycznej i w konsekwencji
- zmniejszenie ryzyka straty analitów.