

IZVORNI ZNANSTVENI RAD

## Određivanje hlapivih spojeva i metanola u vinu modificiranom metodom plinske kromatografije

Renata Bukovčan, Tatjana Varga, Veronika Kubanović, Ljiljana Gašparec-Skočić

*Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zavod za vinogradarstvo, vinarstvo i voćarstvo, Jandrićeva 42, Zagreb, Hrvatska (renata.bukovcan@hcphs.hr)*

### Sažetak

Cilj rada bio je modificirati službenu metodu (EC 2870/2000) u svrhu određivanja metanola i hlapivih spojeva vina. Točnost metode ispitana je usporedbom dobivenih rezultata s referentnim vrijednostima iz programa ispitivanja osposobljenosti laboratorija. Udio metanola bio je 41-151 mg L<sup>-1</sup>, acetaldehida 16-176 mg L<sup>-1</sup>, etilacetata 4-78 mg L<sup>-1</sup>, propan-1-ola 14-33 mg L<sup>-1</sup>, 2-metilpropan-1-ola 7-223 mg L<sup>-1</sup>, 2-metilbutan-1-ola 5-97 mg L<sup>-1</sup> i 3-metilbutan-1-ola 21-408 mg L<sup>-1</sup>. Koeficijenti korelacije bili su 0.938-0.999, a prosječna iskorištenja između 91 % i 103 %. Modifikacija metode u smislu jednostavne pripreme uzorka destilacijom doprinosi razvoju analitičkih postupaka u kontroli kvalitete vina.

Ključne riječi: plinska kromatografija, metanol, hlapivi spojevi, vino

### Uvod

Proizvodnja jakih alkoholnih i alkoholnih pića, piva i vina predstavlja značajni dio prehrambene industrije, u kojoj je sigurnost hrane jedna od najvažnijih značajki. Kemijska analiza složenih uzoraka kao što su alkoholna pića postaje sve značajnija u smislu postizanja odgovarajuće kvalitete proizvodnje, osiguranja ujednačene kvalitete proizvoda i onemogućavanja patvorenja (Lvova i sur., 2006). Kontrola kvalitete jakih alkoholnih i alkoholnih pića te vina, važna je zbog njihova utjecaja na zdravlje potrošača, posebice zbog toksičnog djelovanja metanola koji, ovisno o konzumiranoj količini, uzrokuje glavobolju, sljepilo, pa čak i smrt (Gnekow i Ough, 1976). Kemijski spojevi koji tvore aromu vina su najvećim dijelom alkoholi, esteri, kiseline, aldehidi i ketoni. U vinu se mogu naći u širokom rasponu koncentracija, od stotinu mg L<sup>-1</sup> pa do ng L<sup>-1</sup> (Rapp i Mandery, 1986). Mnogi od ovih spojeva svojim prisustvom u prosječnim koncentracijama pozitivno doprinose aromi vina, ali kada je njihov udio povišen, svojim prodornim mirisima djeluju negativno (Diaz i sur., 2003). Kvantitativna analiza ovih spojeva metodom plinske kromatografije često uključuje dugotrajnu, složenu i skupu pripremu uzorka (Gomez-Miguez i sur., 2007) kako bi se izbjeglo onečišćenje kromatografske kolone. Službena metoda Europske komisije za analizu jakih alkoholnih i alkoholnih pića je metoda plinske kromatografije (EC 2870/2000) koja je prihvaćena i u Republici Hrvatskoj (NN 138/2005), pogodna je za određivanje metanola, acetala, etilacetata, acetaldehida i viših alkohola (propan-1-ol, butan-1-ol, butan-2-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol) direktnim injektiranjem uzorka uz dodatak unutarnjeg standarda. Jaka alkoholna pića koja se ovom metodom mogu analizirati uključuju whisky, brandy, rum, rakija od grožđa, voćna rakija i lozovača. Cilj ovoga rada bio je primijeniti ovu metodu za određivanje koncentracije metanola, te hlapivih spojeva koji su glavni nusproizvodi alkoholne fermentacije u vinu i to uz jednostavnu, brzu i jeftinu pripremu uzorka. Metoda je modificirana, tako da se uzorak vina destilira, a destilat analizira uz dodatak unutarnjeg standarda. Kako je prilikom destilacije moguć gubitak hlapivih spojeva bilo je potrebno utvrditi točnost dobivenih rezultata. Točnost metode ispitana je usporedbom dobivenih rezultata s referentnim vrijednostima dobivenih iz međulaboratorijske usporedbe (MLU)

kroz dulje vremensko razdoblje. Sudjelovanje u MLU omogućuje laboratoriju objektivnu procjenu mjernih mogućnosti i pouzdanosti dobivenih rezultata (Thompson i sur., 2006). To je naročito važno kod razvoja novih ili modifikaciji postojećih metoda. Zato je u ovom istraživanju upravo sudjelovanje u MLU omogućilo objektivni uvid u mjerne mogućnosti metode plinske kromatografije koja je izmjenjena u odnosu na izvornu metodu.

### Materijal i metode

Kemikalije: Etanol, ( $\geq 99.9\%$ , CAS 64-17-5, Merck), metanol ( $\geq 99.5\%$ , CAS 67-56-1, Fluka), propan-1-ol ( $\geq 99.5\%$ , CAS 71-23-8, Fluka), 2-metilpropan-1-ol ( $\geq 99.5\%$ , CAS 78-33-1, Fluka), pentan-3-ol ( $> 98\%$ , CAS 584-02-1, Merck), 2-metilbutan-1-ol ( $\geq 98.5\%$ , CAS 137-32-6, Fluka), 3-metilbutan-1-ol ( $\geq 98.5\%$ , CAS 123-51-3, Fluka), etil acetat ( $\geq 99.5\%$ , CAS 141-78-6, Fluka), acetaldehid ( $\geq 99.5\%$ , CAS 75-07-0, Fluka).

Aparatura: plinski kromatograf (CP-3380, Varian) sa plameno ionizacijskim detektorom.

Uvjeti analize: Kromatografska kolona: CP-WAX 57 CB 50 m  $\times$  0.32 mm. Talk plina nosioca: za helij 65 kPa. Temperatura kolone: 10 min na 35 °C, sa 35°C do 110 °C brzinom od 5 °C/min., sa 110°C do 190 °C brzinom od 30 °C/min., te 2 min. na 190 °C. Temperatura injektora: 260 °C. Temperatura detektora: 300 °C. Volumen injektiranog uzorka: 1  $\mu$ L, split 55:1.

Uzorci: 7 uzoraka vina (od toga 2 suha crna vina, 2 suha bijela, 1 bijelo likersko, 1 bijelo slatko i 1 crno aromatizirano vino) iz MLU koju organizira institucija BIPEA (Francuska) koja je za tu djelatnost akreditirana prema ISO-43-1. Na temelju rezultata MLU dobivene su referentne vrijednosti koncentracija ispitivanih spojeva.

Priprema uzorka: 100 mL uzorka vina se destilira, destilatu se odredi gustoća. U 9 mL destilata doda se 1 mL unutarnjeg standarda pentan-3-ola, te se provede analiza na plinskom kromatografu. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu, dobiveni su rezultati u mg  $\text{kg}^{-1}$ , te preračunati u mg  $\text{L}^{-1}$  množenjem s gustoćom destilata vina.

Obrada podataka: Dobiveni rezultati proslijeđeni su odgovornoj instituciji (BIPEA), gdje su nakon obrade svih prispjelih rezultata izračunate referentne vrijednosti za svaki spoj u skladu s normom ISO 13528. Zatim je izračunato iskorištenje (referentna vrijednost = 100 %, a dobivena vrijednost =  $x\%$ ) za svaki ispitivani uzorak i spoj, te prosječna iskorištenja i koeficijenti korelacije ( $r$ ) za svaki spoj. Provedeno je i testiranje značajnosti koeficijenata korelacije izračunom  $t$ -vrijednosti na razini značajnosti manjoj od 1 % ( $p < 0.01$ ).

### Rezultati i rasprava

Rasponi masenih koncentracija metanola, etilacetata, acetaldehida, propan-1-ola, 2-metilpropan-1-ola, 2-metilbutan-1-ola i 3-metilbutan-1-ola prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1. Rasponi masenih koncentracija (mg  $\text{L}^{-1}$ ) acetaldehida, etilacetata, metanola, propan-1-ola, 2-metilpropan-1-ola, 2-metilbutan-1-ola i 3-metilbutan-1-ola u ispitivanim uzorcima.**

ispitivani spoj	minimum (mg $\text{L}^{-1}$ )	maksimum (mg $\text{L}^{-1}$ )
acetaldehid	16	176
etilacetat	4	78
metanol	41	151
propan-1-ol	14	33
2-metilpropan-1-ol	7	223
2-metilbutan-1-ola	5	97
3-metilbutan-1-ola	21	408

**Tablica 2. Udjeli (mg L<sup>-1</sup>) acetaldehida, etilacetata, metanola, propan-1-ola, 2-metilpropan-1-ola, 2-metilbutan-1-ola i 3-metilbutan-1-ola sa mjernim nesigurnostima, koeficijentima korelacije (r), iskorištenjima i prosječnim iskorištenjem metode.**

uzorak	1	2	3	4	5	6	7
<b>acetaldehid</b>							
referentna vrijednost	69	76	104	29	17	24	31
dobivena vrijednost	68	72	176	27	16	16	32
mjerna nesigurnost*	7	8	19	3	2	2	4
iskorištenje (%)	99	95	169	93	94	67	103
prosječno iskorištenje (%)	<b>103</b>			koeficijent korelacije (r)			<b>0.938</b>
<b>etilacetat</b>							
referentna vrijednost	58	15	20	60	67	52	24
dobivena vrijednost	78	4	17	61	62	52	25
mjerna nesigurnost*	9	0	2	7	7	6	3
iskorištenje (%)	134	27	85	102	93	100	104
prosječno iskorištenje (%)	<b>92</b>			koeficijent korelacije (r)			<b>0.949</b>
<b>metanol</b>							
referentna vrijednost	61	129	113	40	144	60	100
dobivena vrijednost	52	113	114	41	151	64	103
mjerna nesigurnost*	4	8	8	3	11	4	7
iskorištenje (%)	85	88	101	103	105	107	103
prosječno iskorištenje (%)	<b>99</b>			koeficijent korelacije (r)			<b>0.979</b>
<b>propan-1-ol</b>							
referentna vrijednost	22	18	34	20	21	29	33
dobivena vrijednost	18	14	33	19	18	27	33
mjerna nesigurnost*	1	1	2	1	1	1	2
iskorištenje (%)	80	81	98	99	84	95	101
prosječno iskorištenje (%)	<b>91</b>			koeficijent korelacije (r)			<b>0.983</b>
<b>2-metilpropan-1-ol</b>							
referentna vrijednost	33	48	231	33	67	21	8
dobivena vrijednost	29	47	223	27	59	20	7
mjerna nesigurnost*	1	2	11	1	3	1	0
iskorištenje (%)	89	98	96	83	88	92	90
prosječno iskorištenje (%)	<b>91</b>			koeficijent korelacije (r)			<b>0.999</b>
<b>2-metilbutan-1-ol</b>							
referentna vrijednost	28	55	101	21	67	22	6
dobivena vrijednost	24	49	97	20	65	23	5
mjerna nesigurnost*	1	3	6	1	4	1	0
iskorištenje (%)	85	90	96	97	96	101	91
prosječno iskorištenje (%)	<b>94</b>			koeficijent korelacije (r)			<b>0.999</b>
<b>3-metilbutan-1-ol</b>							
referentna vrijednost	132	216	424	89	238	146	21
dobivena vrijednost	119	194	408	86	226	139	21
mjerna nesigurnost*	6	10	20	4	11	7	1
iskorištenje (%)	90	90	96	97	95	96	100
prosječno iskorištenje (%)	<b>95</b>			koeficijent korelacije (r)			<b>0.999</b>

\*Iskazana mjerna nesigurnost temelji se na standardnoj nesigurnosti pomnoženoj faktorom pokrivanja  $k=2$ , koji za normalnu razdiobu daje razinu povjernja od približno 95%.

Udio metanola u analiziranim uzorcima kretao se od 41 do 151 mg L<sup>-1</sup>, acetaldehida od 16 do 176 mg L<sup>-1</sup>, etilacetata od 4 do 78 mg L<sup>-1</sup>, propan-1-ola od 14 do 33 mg L<sup>-1</sup>, 2-metilpropan-1-ola od 7 do 223 mg L<sup>-1</sup>, 2-metilbutan-1-ola od 5 do 97 mg L<sup>-1</sup> i 3-metilbutan-1-ola od 21 do 408 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati udjela analiziranih spojeva u svakom

uzorku (od 1 do 7) prikazani su u Tablici 2. Gdje se pored referentnih vrijednosti nalaze dobivene vrijednosti masenih koncentracija uz pripadajuću mjernu nesigurnost, iskorištenja za svaki spoj i uzorak, te prosječna iskorištenja metode i koeficijenti korelacije za svaki spoj. Dobivene korelacije značajne na razini manjoj od 1 % ( $p < 0.01$ ). Acetaldehid je glavni aldehid koji nastaje u vinu tijekom proizvodnog procesa, a njegova koncentracija direktno je ovisna o prisutnom sumpornom dioksidu sa kojim reagira. Reagira također i sa alkoholom, pa nastaju acetali. Samo acetaldehid u slobodnom obliku ima utjecaja na aromu vina, u niskim koncentracijama doprinosi voćnom notom, a u visokim ( $>200 \text{ mg L}^{-1}$ ) nepovoljno karakterizira vino (Gil i sur., 2006). Udio acetaldehida u analiziranim uzorcima određen je s iskorištenjem od 67 % do 169 % (103 % u prosjeku) s vrlo visokim koeficijentom korelacije od 0.938. Esteri u vinu potječu iz dva procesa: enzimatska esterifikacija za vrijeme alkoholne fermentacije i kemijska esterifikacija tijekom dugotrajnog odležavanja vina (Ribéreau-Gayon i sur. 2006). Najdominantniji ester u vinu je etilacetat. Navedeni spoj doprinosi kompleksnosti arome vina u niskim koncentracijama, dok u koncentracijama iznad  $150 \text{ mg L}^{-1}$  može uzrokovati neugodan miris (Malouchos i sur., 2002). U ispitivanim uzorcima udio etilacetata određen je s prosječnim iskorištenjem od 92 % u odnosu na referentnu vrijednost i koeficijentom korelacije 0.949. Kontrola udjela metanola može biti jedna od kritičnih točaka pri uvođenju HACCP (*hazard analyses critical control point*) sustava u vinarijama s obzirom na zdravstvenu ispravnost vina (Kourtis i Arvanitoyannis, 2001). U ovome je istraživanju metanol određen uz prosječno iskorištenje od 99 % i koeficijent korelacije 0.979. Udjeli viših alkohola u vinu usko su povezani sa metabolizmom kvasaca (Romano i sur., 2003), a njihova koncentracija može značajno varirati ovisno o soju (Calleyon i sur., 2009). 3-metilbutan-1-ol je viši alkohol koji je u vinu najzastupljeniji (Ribéreau-Gayon i sur. 2006), a u ovome je radu njegov udio određen uz prosječno iskorištenje od 95 % i koeficijent korelacije 0.999. Kod određivanja propan-1-ola i 2-metilpropan-1-ola postignuta su iskorištenja od 91 %, a kod 2-metilbutan-1-ola 94 %. Koeficijent korelacije za propan-1-ol bio je 0.983, a za 2-metilpropan-1-ol i 2-metilbutan-1-ol 0.999. Primjetna je povezanost između hlapivosti samoga spoja i koeficijentata korelacije, gdje je taj koeficijent to niži što je spoj hlapiviji, dakle najslabiji za acetaldehid (0.938) koji je najhlapiviji od ispitivanih spojeva, a najviši za više alkohole (0.999) koji su manje hlapivi. Takav je odnos bio i očekivan s obzirom na način pripreme uzorka.

## Zaključak

Modificirana metoda pokazala je visoku točnost izraženu putem prosječnog iskorištenja i koeficijentata korelacije ( $r$ ) između dobivenih rezultata i referentnih vrijednosti za svaki spoj. Koeficijenti korelacije su za sve spojeve bili visoki: između 0.938 za acetaldehid i 0.999 za više alkohole, dok je prosječno iskorištenje metode bilo između 91 % za propan-1-ol i 2-metilpropan-1-ol, te 103 % za acetaldehid. Može se zaključiti da destilacija uzorka vina kao modifikacija izvorne metode u smislu jednostavne, brze i jeftine pripreme uzorka predstavlja doprinos razvoju novih analitičkih postupaka u kontroli kvalitete vina.

## Literatura

- Cabaroglu, T. (2004). Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. *Food Control*. 16, 177-181.
- Calleyon, R.M., Clavijo, A., Ortigueira, P., Troncoso, A.M., Paneque, P., Morales, M.L. (2009). Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. (Article in press.) *Analytica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.aca.2009.09.040.

- Diaz, C. Conde, J.E., Méndez J.J., Pérez Trujillo, J.P. (2003) Volatile compounds of bottled wines with Denomination of Origin from the Canary Islands (Spain).
- Gil, M., Cabellos, J.M., Arroyo, T., Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin „Vinos de Madrid“ (Spain). *Analytica Chimica Acta*. 563, 145-153.
- Gnekow B., Ough, C.S. (1976). Methanol in wines and musts: source and amounts. *American Journal of Enology and Viticulture*. 27 (1):1-6.
- Gómez-Míguez, M.J., Cacho, J.F., Ferreira, V., Vicario, I.M., Heredia, F.J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food chemistry*. 100, 1464-1473.
- ISO. (1997) Proficiency testing by interlaboratory comparison; Part 1: Development and operation proficiency testing schemes; Part 2: Selection and use of external proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies. ISO/IEC Guide 43.
- Kourtis, L., Arvanitoyannis, I.S. (2001). Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) system to the alcoholic beverages industry. *Food Reviews international*, 17 (1):1-44.
- Lvova L., Paolesse R., Di Natale C., D'Amicob A. (2006). Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based Electronic tongue. *Sensors and Actuators B* (118):439-447.
- Narodne novine (2005). Pravilnik o analitičkim metodama za jaka alkoholna i alkoholna pića. NN 138/2005.
- Rapp, A., Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*. 42, 873-883.
- Riberéau-Gayon, P., Glories, Z., Maujean, a. Dubourdieu, D. (2006) *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, 2 (2), 51-64. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Romano, P., Fiore, C., Parragio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 169-180.
- Thompson, M., Ellison, S.L., Wood, R. (2006) The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 78 (1) 145-196.

## Determination of volatile substances and methanol in wine by modified gas chromatography method

### Abstract

The aim of this study was to modify official method (EC 2870/2000) for determination of methanol and volatile compounds in wine. The accuracy of method was tested by comparison of results with the reference values obtained from laboratory proficiency testing. Methanol level was 41-151 mg L<sup>-1</sup>, acetaldehyde 16-176 mg L<sup>-1</sup>, ethyl acetate 4-78 mg L<sup>-1</sup>, propan-1-ol 14-33 mg L<sup>-1</sup>, 2-methylpropan-1-ol 7-223 mg L<sup>-1</sup>, 2-methylbutan-1-ol 5-97 mg L<sup>-1</sup> and 3-methylbutan-1-ol 21-408 mg L<sup>-1</sup>. Correlation coefficients were 0.938-0.999 and average recoveries were from 91 % to 103 %. Method modification regarding sample preparation by destillation is a contribution to development of analytical procedures in wine quality control.

Key words: gas chromatography, methanol, volatile substances, wine