

Análisis automatizado por GC/MS con Headspace estático y dinámico para determinar compuestos saporíferos abundantes y a niveles de trazas en bebidas alcohólicas con sedimentos

Resumen

El método de preferencia para obtener un perfil cromatográfico de bebidas alcohólicas es la inyección directa, pero, cuando destilados y licores contengan cantidades apreciables de material no-volátil, resulta ser imprescindible alguna forma de pre-tratamiento para evitar una contaminación del puerto de inyección y de la columna. Esta consideración es válida en particular para los productos añejados en barriles de madera durante tiempos extendidos, y, especialmente, para aquellos productos que contienen azúcar añadido. En el puerto de inyección calefactable el azúcar se disgrega, y sus componentes volátiles pueden complicar el cromatograma.

En este trabajo se describe el análisis por GC, con una extracción por Headspace estático y dinámico, para establecer un perfil de los componentes abundantes y de componentes contenidos al nivel de trazas en estas bebidas. Para determinar los componentes abundantes se utiliza el Headspace estático, con un revestimiento (o liner) del puerto de inyección relleno con Tenax. Los componentes trazas se extraen en dos pasos.

En la tecnología de Headspace dinámico los compuestos absorbidos en el primer revestimiento se transfieren a un segundo, también relleno con Tenax, para posteriormente transferirlos al mismo puerto de inyección. En este caso, los componentes abundantes sobrecargan el cromatograma, pero muchos compuestos adicionales aparecen ahora al nivel de trazas. Para ambas técnicas, la única preparación de la muestra necesaria es su dilución en el vial del Headspace. Las secuencias automatizadas del modo estático y dinámico se realizan con el mismo automuestreador. El inyector PTV se opera en el modo de ventilación del solvente y se lo usa en ambos casos para obtener los niveles de detección más bajos. La aplicación de este acercamiento combina-

do constituye un protocolo de rutina analítica efectivo para esta clase muy particular de productos, y evita al mismo tiempo una contaminación por el extracto seco.

Introducción

Las bebidas alcohólicas destiladas comerciales son composiciones complejas de compuestos saporíferos en una mezcla predominante de etanol y agua [1, 2]. Estos compuestos provienen de un proceso de producción que combina una extracción de materia prima, fermentación, destilación, y, en muchos casos, un añejado en barriles de roble. Con excepción de algunos compuestos de baja volatilidad, originarias de la fragmentación de la lignina de la madera del proceso de añejado, la mayoría de los compuestos saporíferos en destilados etílicos son amenos al análisis por cromatografía de gases.

La composición de la matriz de destilados es relativamente pura y por eso es factible una inyección directa sin una preparación ardua de la muestra. Los compuestos abundantes, con concentraciones de varios mg/L, pueden ser cuantificados por una simple inyección con divisor de flujo o split, y con una detección de ionización por llama [3, 4]. Los compuestos adicionales con concentraciones de pocos mg/L (ésteres y ácidos de gran peso molecular) también pueden ser evaluados mediante una inyección directa de 5 a 10 μ L, utilizando un inyector vaporizador con temperatura programada PTV (Programable Temperature Vaporizer), con una doble función: eliminar solventes y enriquecer el analito en el revestimiento. Se pueden inyectar unos 50 a 100 μ L para obtener límites de detección inferiores. En este caso se debe evitar una sobrecarga del revestimiento del puerto de inyección y una pérdida de la muestra junto con la purga del divisor. La inyección debe realizarse con una velocidad programada, y las recuperaciones dependen de interacciones complejas entre varios parámetros de la muestra y del instrumento [5]. Sin embargo, hay muchas bebidas alcohólicas comerciales, que pueden contener cantidades, hasta sustanciales, de material no-volátil, y para los cuales la técnica de inyección directa no es apta. Destilados y licores de frutas pueden contener grandes cantidades de azúcar añadido. Brandies y whiskies añejados etc., pueden contener mayores cantidades de polifenoles provenientes del añejado en barriles de maderas. Sin el intercambio frecuente del revesti-

miento, el material no-volátil se acumulará y contaminará ambos, el sistema de inyección y la columna. El azúcar añadido en estos productos degrada en el puerto de inyección calentado, causando artefactos que complican el cromatograma.

Existen técnicas adicionales que pueden evitar los efectos indeseados causados por el material no-volátil. Como por ejemplo la micro-extracción en fase sólida (SPME = Solid Phase Micro Extrac-

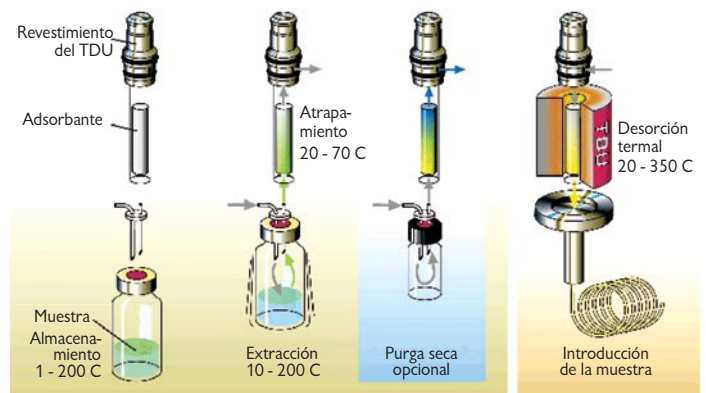


Figura 2: Vista esquemática del proceso DHS

tion), extracción por sorción con barras magnéticas (SBSE = Stir Bar Sorptive Extraction), extracción de espacio de cabeza por sorción (HSSE = Headspace Sorptive Extraction), muestreo en espacio de cabeza estático (HSS = Headspace Sampling), y dinámico (DHS = Dynamic Headspace Sampling).

Todas estas técnicas se han descrito en aplicaciones bien documentadas en la literatura científica [6 - 11]. Para la SPME existe una selección de materiales sorbentes pero solamente se puede acomodar un volumen limitado del material sorbente. SBSE y HSSE pueden utilizar volúmenes de material sorbente mucho mayores, pero el material es casi siempre el polidimetilsiloxano, apolar. Las aplicaciones de Headspace podrían tener la ventaja que los resultados pueden reflejar mejor las propiedades reales sensoriales del producto analizado. El Headspace estático con una trampa adsorbente intermedia ha sido aplicado a bebidas destiladas, que contienen extractos secos para el análisis del alcohol mayoritario y los ésteres secundarios [7]. El Headspace automatizado, con trampas adsorbentes intercambiables, ha sido utilizado para perfilar componentes volátiles en cerveza [12].

En este trabajo nosotros describimos la aplicación secuencial del Headspace estático y dinámico, para perfilar tanto los compuestos abundantes y los de trazas en whiskey añejado. La máxima sensibilidad para cada modo se obtiene, al utilizar un inyector PTV en el modo de solvente, donde el revestimiento también puede funcionar como una



Figura 1: El automuestreador Gerstel MPS 2 con DHS acoplado a un Agilent Technologies 7890 GC.

trampa fría. El uso de una columna capilar corta de 0,15 mm D.I. con una relación de fase de 19, permite el análisis rápido con una separación excelente de ambos, los compuestos abundantes y los de trazas. Todas las operaciones para ambos modos de análisis son aptas para una automatización total, para una operación secuencial y sin necesidad de atención por el personal.

Experimental

Instrumentación: los análisis fueron realizados utilizando un 7890 GC, equipado con un detector selectivo de masas 5975 (Agilent Technologies), una unidad de desorción térmica TDU (Gerstel), un inyector PTV (CIS 4, Gerstel) y un MPS 2 con Headspace y la opción DHS (Gerstel), ver figura 1.

Condiciones analíticas del Headspace estático

Trampa: Tenax TA
MPS: 60 °C temperatura de incubación (10 min)
2,5 mL volumen inyectado

Condiciones analíticas del Headspace dinámico

Trampa: Tenax TA
DHS: 30 °C temperatura de la trampa
60 °C temperatura de incubación (10 min)
50 mL volumen de purga
10 mL/min flujo de purga
10 mL volumen seco
5 mL/min flujo seco
TDU: purga del solvente
20 °C (1 min); 720 °C/min;
110 °C (1 min); 720 °C/min;
300 °C (3 min)

Condiciones analíticas

PTV: Tenax TA liner,
purga del solvente (60 mL/min) at 0 kPa
splitless (2 min)
20 °C (0,2 min); 10 °C/s; 300 °C (5 min)
Columna: 25 m CP-SIL 5CB (Varian)
di = 0,15 mm df = 2,0 µm
Gas: He, flujo constante = 0,5 mL/min
Horno: 40 °C (10 min); 10 °C/min;
300 °C (6 min)
MSD: Barrico: 28 - 350 amu

Muestras acuosas y aquellas con un alto contenido de agua frecuentemente son problemáticas para la técnica de Headspace. La presencia de vapor de agua en el Headspace propiamente dicho puede causar una precisión pobre. Purgar el inyector PTV y utilizar un revestimiento relleno con Tenax, reduce significativamente la cantidad de agua transferida a la columna analítica.

El sistema de Headspace dinámico de Gerstel (DHS) es un accesorio para el muestreador multi-uso MPS (MultiPurpose Sampler), el cual permite purgar dinámicamente el Headspace sobre la muestra. Los analitos contenidos en el Headspace purgados, quedan atrapados en dos lechos del sorbente de 2 cm en los tubos de vidrios compactos. Un purgamiento en seco opcional permite la reducción del contenido de agua. El tubo de termodesorción se introduce en la unidad de desorción térmica (TDU), siendo desorbido térmicamente. Los analitos son absorbidos en el puerto de inyección pre-refrigerado CIS 4, donde son crio-enfocados, para mejorar la forma de la señal, antes de su introducción en la columna. Aplicando la purga del solvente en el TDU antes de transferir los analitos al CIS, equivale a un paso adicional de ventilación muy ventajoso para por ejemplo alcoholes amílicos. La figura 2 muestra esquemáticamente el proceso de atrapamiento y de desorción.

Tabla 1: Identificación de los compuestos.

No.	Compuesto	No.	Compuesto
1	Propanol	23	Ácido etil ester heptanoico
2	acetato etílico	24	Nonanal
3	Isobutanol	25	Alcohol β-fenyl etílico
4	3-Metil butanal	26	Ácido octanoico
5	2-Metil butanal	27	Ácid ethyl ester octanoico
6	1-Butanol	28	Decanal
7	1,1-Dietoxi metano	29	Acetato β-fenil etílico
8	Ácido etil ester propiónico	30	Ácido etil ester nonanoico
9	Acetato n-propil	31	Ácido decanoico
10	3-Metil-1-butanol	32	Etil trans-4 decenoato
11	2-Metil-1-butanol	33	Ácido etil ester decanoico
12	Ácido ethyl ester Isobutírico	34	Ácido 3-metil- butil ester octanoico
13	Acetato Isobutílico	35	1-Etil propil octanoato
14	Ácido ethyl ester butírico	36	Ácido caprico isobutil ester
15	Ácido 2&3-metil-etil ester butírico	37	Ácido dodecanoico
16	Acetato dietil isobutiraldehido	38	Ácido etil ester decanoico
17	Acetato isoamil	39	Ácido 3-metil-butil ester pentadecanoico
18	Acetato 2-Metil-1-butil	40	Ácido 2-metil-butil ester pentadecanoico
19	Acetal butiraldehido dietil	41	Ácido etil ester tetradecanoico
20	Acetal acetaldehido etil amil	42	Etil-9-hexadecenoato
21	Ácido hexanoico ethyl ester	43	Ácido etil ester hexadecanoico
22	Acetato hexílico		



Detecte lo indetectable

Enriquecimiento de los analitos y sensibilidad extraordinaria para su GC/MS y LC/MS

- Extracción en fase sólida
- SPE Dispersiva (DPX)
- Headspace dinámico (DHS)
- SBSE (Twister) y SPME
- Desorción y multidesorción térmica
- GC/MS 1D/2D con crio-focalización

Pregúntenos como puede ayudarle la tecnología GERSTEL



GERSTEL

www.gerstel.com/es

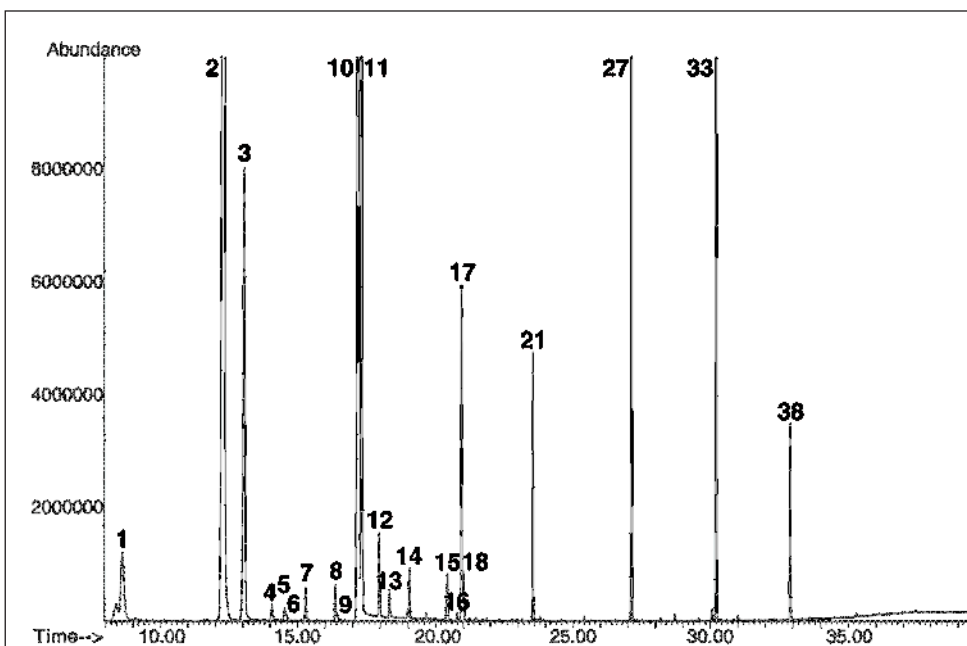


Figura 3: Cromatograma de un whiskey añejado con Headspace estático. Para la identificación de los compuestos vea tabla 1.

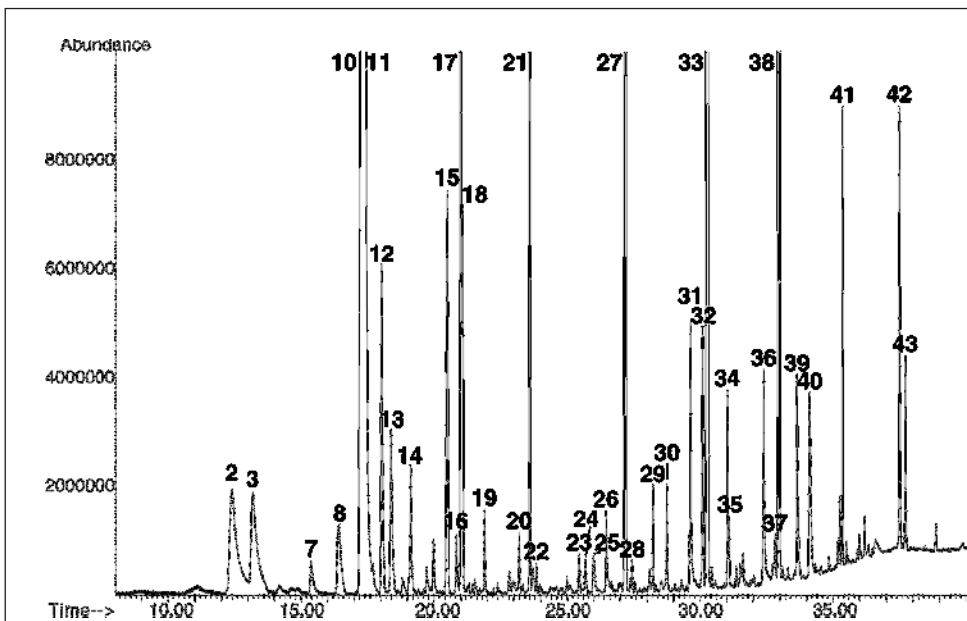


Figura 4: Cromatograma de un whiskey añejado con Headspace dinámico. Para la identificación de los compuestos vea tabla 1.

Preparación de la muestra: No se ha realizado ninguna preparación de las muestras fuera la de transferir las muestras en viales vacíos de 10 mL con tapa roscada para Headspace.

Resultados y discusión

La figura 3 muestra un típico cromatograma obtenido según el acercamiento con Headspace. Los alcoholes amílicos o alcoholes mayores superiores juntos con acetato etílico y los principales ésteres de ácidos grasos de cadena recta hasta el éster etílico del ácido dodecanico dominan el cromatograma. Cabe notar que en el espacio inicial de la elusión se pueden observar picos claros de impor-

tantes compuestos trazas como aldehídos, ésteres etílicos y acetales. De particular importancia son los ésteres etílicos de corta cadena de ácidos grasos, denominados ésteres frutales debido a sus aromas agradables. Los aldehídos acrimoniosos y sus acetales dulces con varios alcoholes pueden afectar también el aroma percibido.

La figura 4 por el contrario, muestra el cromatograma obtenido cuando la misma muestra se inyecta después de la purificación por el Headspace dinámico. Los analitos, hasta aquellos alcoholes del C5, han sido purgados parcialmente en la unidad TDU, ya que su elusión en el cromatograma podría dar solamente información limitada debido a un

abultamiento cromatográfico, pero ahora aparecen muchos más detalles de compuestos en el espacio residual de la elusión, muchos ésteres interesantes de ambas cadenas, rectas y ramificadas, ésteres mayores son visibles, y aun es posible de perfilar algunos ácidos. Nonanal y decanal han sido reportados anteriormente en cerveza, vino y coñac. Y ambos son utilizados en la industria de sabores y fragancias. Ambos modos de inyección son muy reproducibles y no requieren normalmente el uso de patrones internos.

Conclusiones

La combinación de las técnicas de Headspace estático y dinámico ofrece un acercamiento complementario muy útil para perfilar los componentes mayoritarios y minoritarios en bebidas alcohólicas, especialmente aquellos conteniendo niveles sustanciales de sólidos disueltos. Todas las partes constituyentes de cada análisis son instrumentalmente automatizadas y no se requiere ninguna preparación manual de la muestra.

References

- [1] Aroma of Beer, Wine and Distilled Beverages, L. Nykänen, H. Suomalainen, Eds. Akademie-Verlag. Berlin (1983).
- [2] R. de Rijke, R. ter Heide, in Flavour of Distilled Beverages; J. Piggott Ed.; Ellis Horwood: Chichester (1983) 192.
- [3] K. Mac Namara, J. High Res. Chrom. 7 (1984) 641
- [4] R. Madera, B. Suárez Valles, J. Chrom. Sci. 45 (2007) 428
- [5] J. Staniewski, J. Rijks, J. Chrom. A 623 (1992) 105-113
- [6] A. Zalacain, J. Marín, G.L. Alonso, M.R. Salinas, Talanta 71 (2007)
- [7] K. Schulz, J. Dreßler, E-M. Sohnius, D.W. Lachenmeier, J. Chrom. A 1145 (2007) 204-209.
- [8] J.C.R. Demyttenaere, J.L. Sánchez Martínez, M.J. Téllez Valdés, R. Verhé, P. Sandra, Proceedings of the 25th ISCC, Riva del Garda, Italy, (2002).
- [9] P. Salvadeo, R. Boggia, F. Evangelisti, P. Zunin, Food Chem., 105 (2007) 1228
- [10] B. Tienpont, F. David, C. Bicchi, P. Sandra, J. Microcol. Sep. 12(11) 577-584 (2002)
- [11] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, P. Sandra, J. Chrom. A 1071 (2005) 111-118.
- [12] J.R. Stuff, J.A. Whitecavage, A. Hoffmann, Gerstel Application Note AN/2008/4

Kevin Mac Namara¹, Frank McGuigan¹ y Andreas Hoffmann²

¹ Irish Distillers-Pernod Ricard, Midleton Distillery, Midleton, Cork, Ireland

² Gerstel GmbH & Co. KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, D-45473 Mülheim an der Ruhr, Germany

Gerstel, Alemania

Anote el 410-311