

OZNACZANIE WYBRANYCH ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH W WINACH POLSKIEGO POCHODZENIA

IDENTIFICATION OF SELECTED BIOACTIVE
COMPOUNDS IN WINES OF POLISH ORIGIN

**Magdalena Fabjanowicz^{1,*}, Justyna Płotka-
Wasyłka^{1,2}**

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

² *BioTechMed, Centrum Badawcze, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233, Gdańsk*

**e-mail: magfabja@pg.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Oznaczanie polifenoli i kwasów organicznych

1.1. Analityczny proces hierarchiczny

1.2. Wspomagana ultradźwiękami ekstrakcja próbek ciekłych za pomocą rozpuszczalnika przez membrany porowate z GC-MS (UAPM-LS-GC-MS)

2. Oznaczanie amin biogennych

3. Ocena profilu metabolomicznego win pochodzących z chłodnego klimatu

4. Ocena wzajemnych zależności pomiędzy fizyko-chemicznymi parametrami wina


Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane


Dr inż. Magdalena Fabjanowicz (ur. 1992) ukończyła Politechnikę Gdańską z tytułem doktora nauk chemicznych w 2023 roku. W trakcie studiów doktoranckich ukończyła również studia magisterskie na kierunku zarządzanie międzynarodowe. Jej zainteresowania badawcze obejmują rozwijanie zielonych metod analitycznych z zastosowaniem technik mikroekstrakcji oraz analizę wina. Rozwija się także w wielu innych obszarach, takich jak zrównoważone zarządzanie. Brała udział w projekcie Erasmus+ o akronimie TOO4TO (<https://too4to.eu/>), gdzie pełniła dwie role: badacza i nauczyciela. Obecnie zgłębia temat dobrostanu osobistego, zawodowego i planetarnego jako członkini zespołu w projekcie Erasmus+ o akronimie SWEPPP (<https://www.wellbeing4sustainability.eu/>), w którym również działa jako badaczka. Od 10.2024 zatrudniona na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym na stanowisku postdoc. Magdalena jest współautorką 16 publikacji i 2 rozdziałów w książkach. W wolnym czasie uwielbia kolarstwo górskie (była członkinią CST 7r MTB Team; 7r Politechnika Gdańska team kolarstwa górskiego), podróże oraz kontakt z naturą.



 <https://orcid.org/0000-0003-2040-9287>

Dr hab. inż. Justyna Płotka-Wasyłka, prof. uczelni (ur. 1986) ukończyła Politechnikę Gdańską, uzyskując w 2014 roku tytuł doktora nauk chemicznych. Następnie rozpoczęła pracę w Katedrze Chemii Analitycznej PG. W 2019 roku otrzymała tytuł profesora PG. W 2018 roku została powołana na członka Rady Młodych Naukowców przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W tym samym roku dołączyła również do zespołu redakcyjnego *Microchemical Journal*. Jej zainteresowania badawcze obejmują ocenę jakości wina i identyfikację jego pochodzenia z różnych regionów Polski, a także aspekty zrównoważonego rozwoju w chemii, zwłaszcza chemii analitycznej. Swoje badania prowadzi zgodnie z zasadami zielonej chemii analitycznej. Opracowała narzędzia do oceny "zieloności" protokołów analitycznych, znane jako GAPI oraz ComplexGAPI. Ponadto była zaangażowana w stworzenie nowego wskaźnika do oceny użyteczności metod analitycznych, nazwanego BAGI. Prowadziła wiele projektów badawczych i jest autorką ponad 100 publikacji, w tym artykułów recenzowanych, rozdziałów w książkach oraz podręczników. Prywatnie uwielbia: bieganie, taniec, fotografię i wyprawy górskie. Mama trójki dzieci.



 <https://orcid.org/0000-0002-1304-8623>

ABSTRACT

Each wine has a unique chemical composition that is influenced by the grape variety, the geology and climate of the vine's growth (*terroir*), and the winemaking process. Despite the fact that several scientific reports have been published about the characteristic of wines from The Old and The New World Countries, data on the specific characteristics of wines from the cool climate regions is still lacking.

The objective of this study was to develop analytical methods for evaluating the quality of domestically produced wines in terms of the concentration of specific bioactive compounds, such as:

- organic acids and polyphenols determined in one course of analytical procedure, using solvent extraction of liquid samples through an ultrasound-assisted porous membrane (UASE-PMLS) in conjunction with gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) at the stage of final determinations;
- biogenic amines using two analytical procedures (a) capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry (CE-MS) and (b) salting-out liquid-liquid microextraction technique coupled with GC-MS (SALLME-GC-MS).

Furthermore, micro- and macroelements were determined. All the data gathered were used to ascertain the correlations between wines' various physicochemical properties by multivariate statistical analysis.

The research work was conducted in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry, and the developed methods were assessed for their green nature using the Analytical EcoScale and the GAPI Index.

Keywords: wine, polyphenols, organic acids, biogenic amines, GC-MS

Słowa kluczowe: wino, polifenole, kwasy organiczne, aminy biogenne, GC-MS

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

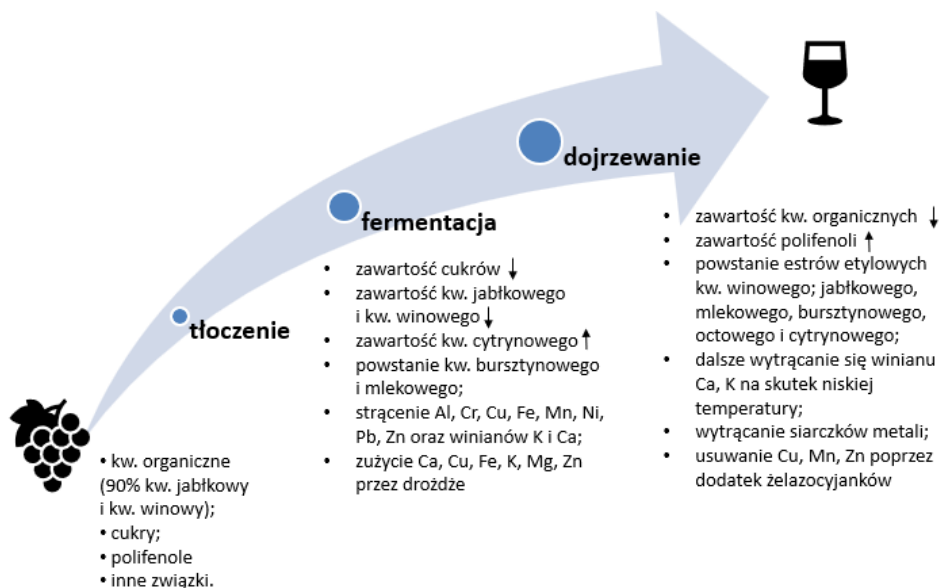
2-PE	– 2-feniloetyloamina
ACN	– acetonitryl
AHP	– analityczny process hierarchiczny
BA	– aminy biogenne
BUT	– butyloamina
BSTFA	– N,o-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid
CAD	– kadaweryna
CE-MS	– elektroforeza kapilarna ze spektrometrią mas
CV	– współczynnik zmienności
DCM	– dichlorometan
DIET	– dietyloamina
DIMET	– dimetyloamina
ET	– etyloamina
EtOAc	– octan etylu
GAPI	– zielony index procedur analitycznych (<i>ang. Green Analytical Procedure Index</i>)
GC-MS	– chromatografia gazowa ze spektrometrią mas
HEX	– heksyloamina
HIS	– histamina
ICP-MS	– spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzą indukcyjnie
IPA	– izopentyloamina
LOD	– granica wykrywalności
LOQ	– granica oznaczalności
PROP	– propyloamina
PUT	– putrescyna
RSD	– względne odchylenie standardowe
TMCS	– trimetylochlorosilan
TRYP	– tryptamina
TYR	– tyramina

WPROWADZENIE

Polska w świecie winiarskim jest uznawana jako kraj o chłodnym klimacie. Jednak, mimo to winogrodnictwo w Polsce cieszy się bardzo dużym zainteresowaniem i bardzo mocno się rozwija. Tylko na przestrzeni ostatnich pięciu lat, liczba winnic w Polsce wzrosła o dodatkowe 50. Natomiast powierzchnia jaką zajmują wzrosła o ok 200 ha. Największa liczba winnic znajduje się na południu Polski, ale coraz więcej winnic pojawia się również w północnej części naszego kraju [1]. Rozwój winogrodnictwa w Polsce jest możliwy ze względu na zmieniający się klimat jak również dzięki wprowadzeniu nowych hybrydowych odmian winorośli, które dużo lepiej znoszą wahania temperatury w okolicach 0°C [2]. Winogrodnictwo w Polsce jest bardzo młode a technologie produkcji wina są stale modyfikowane stąd też duże zainteresowanie winiarzy wynikami badań na temat ich trunków, których na dzień dzisiejszy w literaturze jest niewiele.

Każde wino to unikatowa kompozycja smaku i aromatu, na które ma wpływ cały szereg czynników [2]. Jednym z najczęściej poruszanych tematów jest wpływ *terroir'u* na walory smakowe wina. Kładzie się duży nacisk na pochodzenie wina, a co za tym idzie na jego unikatowość wyrażoną smakiem i zawartością związków odpowiedzialnych za działania prozdrowotne na organizm człowieka. Kiedyś *terroir* i jego charakterystyka było istotne jedynie dla Francuzów, obecnie ten trend opanował cały świat. Niewątpliwie *terroir* każdej winnicy jest unikalne i niepowtarzalne ze względu na warunki klimatyczne, topograficzne i typ podłoża. Często zdarza się, że winnice które dzieli zaledwie kilkanaście kilometrów produkują zupełnie inne wina [3].

Ponadto bardzo duży wpływ na charakterystykę wina ma odmiana winorośli jak również sama technologia wytwarzania wina. Zmiany strukturalne głównych składników wina, zostały przedstawione na Rysunku 1.



Rysunek 1. Zmiany strukturalne w głównych składnikach wina zachodzące podczas procesu tłoczenia, fermentacji i dojrzewania wina [4].

Celem niniejszych badań było opracowanie precyzyjnych, niezawodnych i szybkich procedur analitycznych, które posłużą do scharakteryzowania win pochodzących z regionu o chłodnym klimacie, pod kątem zawartości polifenoli, kwasów organicznych oraz amin biogennych (BA) jak również znalezienie wzajemnych korelacji pomiędzy oznaczanymi związkami a mikro- i makroelementami. Wina wykorzystane do badań pochodziły z polskich winnic z różnych części naszego kraju. W zbiorze win znajdowało się 10 win czerwonych, 10 białych oraz 3 wina różowe. Wina były wyprodukowane między 2014 a 2018 rokiem. Natomiast zawartość alkoholu deklarowana przez producenta była na poziomie od 10,5 do 13,5%. Charakterystyka win wykorzystanych do badań jest przedstawiona w Tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka badanych win.

Sym-bol	Rok	Winnica	Rodzaj wina	Województwo	Zawartość alkoholu [%]	Odmiana winorośli	Zawartość cukru
1R	2015	HOPLE Winnica Poraj Paczkow	Czerwone	Opolskie	11,0	Regent	wytrawne
2R	2017	Winnica Chodorowa	Czerwone	Małopolskie	12,0	Regent	wytrawne
3R	2014	Dom Bliskowice	Czerwone	Lubelskie	12,0	Rondo	wytrawne

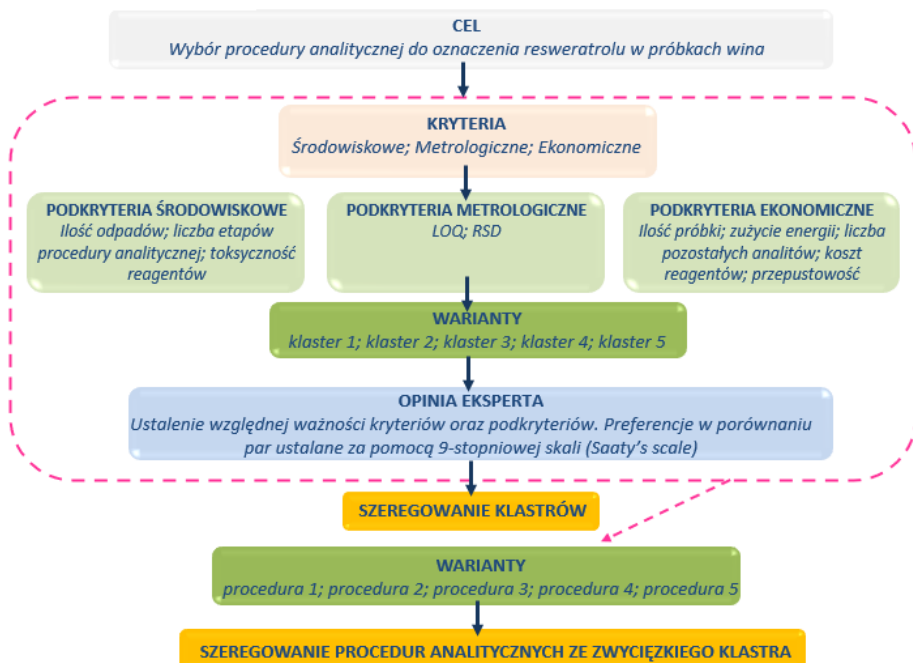
4R	2013	Winnica Witanowice	Czerwone	małopolskie	12,5	Regent	wytrawne
5R	2017	Adoria Vineyards	Czerwone	Dolnośląskie	13,5	Dornfelder	wytrawne
6R	2017	Winnica Chodorowa	Czerwone	Małopolskie	11,0	Rondo	wytrawne
7R	2017	Adoria Vineyards	Czerwone	Dolnośląskie	13,5	Pinot Noir	wytrawne
8R	2016	Winnica Turnau	Czerwone	Zachodniopomorskie	13,0	Rondo/Regent	wytrawne
9R	2015	HOPLE Winnica Poraj Paczkow	Czerwone	Opolskie	11,5	Rondo	wytrawne
10R	2016	Winnica Goleisz	Czerwone	Podkarpackie	12,5	Mieszanka trzech odmian	wytrawne
1W	2016	Winnica Solaris	Białe	Lubelskie	12,0	Johanniter	wytrawne
2W	2017	Adoria Vineyards	Białe	Dolnośląskie	12,0	Riesling	półwytrawne
3W	2016	Winnica Saint Vincent	Białe	Lubuskie	12,0	Pinot Gris, Riesling, Muscat Ottonel, Gewurztraminer	półwytrawne
4W	2017	Winnica Srebrna Gora	Białe	Małopolskie	12,0	Seyval Blanc, Hibernal, Johanniter, Solaris	półwytrawne
5W	2016	Winnica Saint Vincent	Białe	Lubuskie	13,0	Pinot Gris	półwytrawne
6W	2016	Winnica Solaris	Białe	Lubelskie	12,5	Solaris	słodkie
7W	2014	Winnica Witanowice	Białe	Małopolskie	12,0	Bianca	wytrawne
8W	2017	Winnica Turnau	Białe	Zachodniopomorskie	12,5	Solaris	wytrawne
9W	2017	Winnica Goleisz	Białe	Podkarpackie	12,0	Mieszanka kilku odmian	półsłodkie
10W	2015	Winnica Goleisz	Białe	Podkarpackie	11,5	Mieszanka ośmiu odmian	wytrawne
1Ro	2014	Winnica Srebrna Gora	Różowe	Małopolskie	10,5	Zweiglet	półwytrawne
2Ro	2015	Winnica De Sas	Różowe	Dolnośląskie	10,5	Regent	wytrawne
3Ro	2016	Winnica Goleisz	Różowe	Podkarpackie	11,5	Mieszanka trzech odmian	wytrawne

1. OZNACZANIE POLIFENOLI I KWASÓW ORGANICZNYCH

W literaturze dostępnych jest wiele metod do oznaczenia polifenoli. Jednak brakowało krytycznej oceny opracowanych metod nie tylko pod względem parametrów metrologicznych, ale również ich oddziaływania na środowisko. Dlatego zanim rozpoczęto prace nad nową metodą analityczną, poddano analizie dostępne metody. W tym celu wykorzystano jeden z algorytmów wielokryterialnej analizy decyzyjnej, analityczny proces hierarchiczny (AHP). Była to pierwsza próba oceny metod analitycznych za pomocą tego algorytmu.

1.1. ANALITYCZNY PROCES HIERARCHICZNY

Do analizy zebrano 19 metod analitycznych [5-23], opisanych w literaturze, używanych do oznaczenia resweratrolu w próbkach wina. Zebrane metody zostały opisane według kryteriów: środowiskowych (ilość odpadów [g], liczba etapów procedury analitycznej, toksyczność reagentów), metrologicznych (LOQ, RSD) oraz ekonomicznych (ilość próbki [ml], zużycie energii [kWh], liczba pozostałych oznaczanych analitów, koszt reagentów, przepustowość). Biorąc pod uwagę, że algorytm AHP można stosować do małych zbiorów danych, pierwszym krokiem była redukcja danych za pomocą analizy skupień. Wynikiem tej analizy była redukcja danych z 19 obiektów do 5 klastrów. Przebieg wybranego algorytmu został przedstawiony na Rysunku 2.



Rysunek 2. Schemat algorytmu AHP.

Zastosowanie algorytmu AHP pozwoliło wytypować jedną procedurę analityczną, która została najwyżej oceniona, a jest nią metoda oparta na wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem UV z bezpośrednim nastrzykiem. Wybrana metoda omija etap przygotowania próbki, jednak, trzeba też zwrócić uwagę na fakt, że oznaczano tylko jeden analit – resweratrol, a analiza zajęła 19 min. Ponadto przeprowadzona równolegle analiza zielonego charakteru, wybranych metod analitycznych, za pomocą Eco Skali oraz indeksu GAPI wskazała, że najmniej szkodliwa dla środowiska naturalnego jest metoda oparta na chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) [24].

1.2. WSPOMAGANA ULTRADŹWIEKAMI EKSTRAKCYJA PRÓBEK CIEKŁYCH ZA POMOCĄ ROZPUSZCZALNIKA PRZEZ MEMBRANY POROWATE POŁĄCZONA Z GC-MS (UAPM-LS-GC-MS)

Przeprowadzone studium literaturowe pozwoliło zauważyć, że brakuje procedur analitycznych pozwalających oznaczyć związki z grupy polifenoli oraz kwasów organicznych w trakcie jednego toku postępowania analitycznego. Ponadto niewiele jest prac, w których procedury analityczne są oparte na wykorzystaniu technik GC,

która pozwala osiągnąć wyższą rozdzielczość, lepszą selektywność, a przy tym zużywa znacznie mniej rozpuszczalników niż technika chromatografii cieczowej. Zastosowanie nowatorskiej techniki ekstrakcji próbek - wspomagana ultradźwiękami ekstrakcja próbek ciekłych za pomocą rozpuszczalnika przez membrany porowate połączona z GC-MS pozwoliła oznaczyć 15 związków należących do dwóch wcześniej wspomnianych grup (kw. mlekowy, kw. bursztynowy, kw. fumarowy, kw. jabłkowy, kw. winowy, kw. cytrynowy, kw. protokatechowy, kw. kumarowy, kw. galusowy, kw. ferulowy, kw. kawowy, kw. synapowy, pterostiblen, resweratrol i katechina), przy zachowaniu bardzo dobrych parametrów walidacyjnych (LOD [$\mu\text{g/ml}$]: 0,016 – 8,2; LOQ [$\mu\text{g/ml}$]: 0,047 – 24; liniowość o współczynniku determinacji 0,9852 – 0,9993) a dodatkowo odzysk >93%.

Optymalizacji poddano 4 parametry:

- rodzaj rozpuszczalnika (EtOAc; ACN; DCM; 1:1 v/v EtOAc:DCM);
- temperatura ekstrakcji (temperatura otoczenia; 25°C; 40°C);
- czas derywatywacji [min] (0+15; 15+15; 15+30);
- odczyn próbki wina (1,30; 3,45; 4,80; 6,00).

Najlepsze rezultaty (sygnały o najwyższej intensywności) otrzymano gdy spośród puli badanych rozpuszczalników zastosowano mieszaninę EtOAc z DCM w stosunku 1:1 v/v, w korelacji z temperaturą otoczenia; dodawano środek sililujący - BSTFA z 1%TMCS., a pH wynosiło 1.30 w przypadku kw. organicznych oraz 3.45 gdy brano pod uwagę polifenole. Zgodnie z przyjętą procedurą proces derywatywacji był prowadzony przez 15 min.

Przebieg procedury analitycznej wyglądał następująco:

1. Torebkę wykonaną z membrany polipropylenowej o wymiarach 1x1 cm wypełniono: 60 mg MgSO_4 oraz 250 μL próbki z dodatkiem wzorca wewnętrznego.
2. Zamkniętą torebkę zanurzono w 1 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego EtOAc:DCM (1:1 v/v) i poddano działaniu ultradźwięków przez 25 min.
3. Następnie usunięto torebkę, a ekstrakt odparowano do sucha w strumieniu azotu.
4. Przeprowadzono konwersję chemiczną analitów za pomocą środka sililującego - BSTFA z 1%TMCS.
5. Poddano próbkę analizie za pomocą GC-MS (Agilent 7890A GC system z detektorem 5975C MS; kolumna chromatograficzna ZB-5 MS (30m x 0,25 mm wew. śr.) ; temperatura dozownika: 250°C; przepływ He: 1 ml/min; program temperaturowy: 70°C (1 min), wzrost temperatury do 280°C (10°C/min), utrzymanie temperatury 280°C przez 5 min; całkowity czas analizy: 27 min).

Po zastosowaniu opracowanej metody do próbek rzeczywistych otrzymano następujące wyniki: w winach czerwonych najwyższą zawartość odnotowano dla kwasu bursztynowego około 400 $\mu\text{g/ml}$ oraz katechiny nawet 6226 $\mu\text{g/ml}$ a najmniejszą dla kwasu cytrynowego oraz kwasu synapowego, których zawartość była często poniżej granicy oznaczalności. Natomiast w próbkach win białych i różowych najwyższą zawartość oznaczono dla kwasu jabłkowego około 1000 $\mu\text{g/ml}$ oraz katechiny nawet 119 $\mu\text{g/ml}$, a najmniejszą dla kwasu fumarowego oraz synapowego często poniżej granicy oznaczalności.

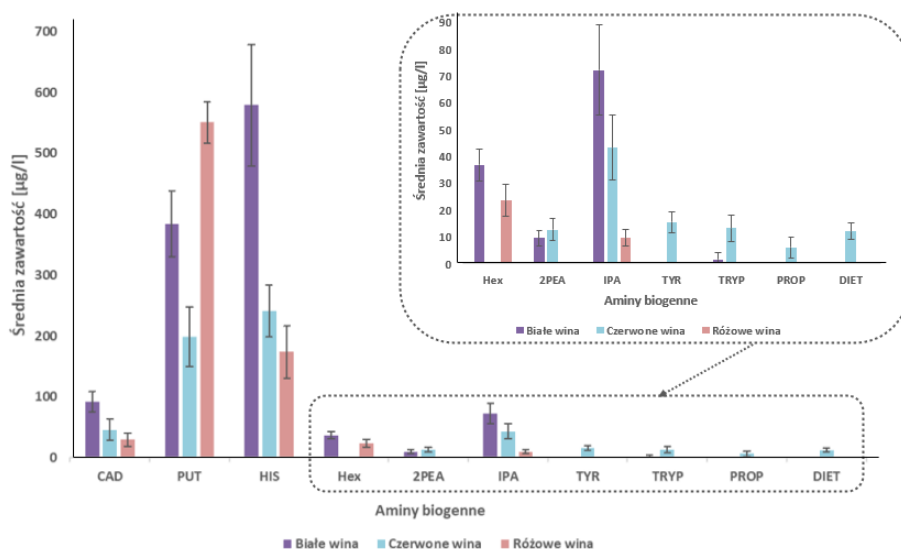
We wszystkich badanych próbkach win pterostilben był poniżej granicy wykrywalności natomiast kw. ferulowy poniżej granicy oznaczalności. Związek, który najbardziej wyróżnia badane próbki win od win pochodzących z innych rejonów świata jest resweratrol. Zawartość resweratrolu w próbkach win białych i czerwonych była na zbliżonym poziomie między 2 a 3 $\mu\text{g/ml}$ podczas gdy w winach białych pochodzących z innych rejonów świata zawartość resweratrolu jest znacznie mniejsza niż w winach czerwonych i nie przekracza 1 $\mu\text{g/ml}$.

2. OZNACZANIE AMIN BIOGENNYCH

Do oznaczenia BA w winach pochodzących z chłodnego klimatu, opracowano i zwalidowano procedurę analityczną opartą na zmodyfikowanej mikroekstrakcji typu ciec-ciecz (wspomaganej efektem wysolenie) w połączeniu z GC-MS (SALLME-GC-MS). Z uwagi na właściwości fizykochemiczne BA i ich polarność, stosowanie chromatografii gazowej do ich oznaczania jest bardzo wymagające ze względu na konieczność przeprowadzania procesu derywatywacji analitów. Jednak ze względu na wysoką dokładność i czułość pomiarów przy zastosowaniu techniki GC-MS podjęto to wyzwanie. Zaproponowana procedura analityczna obejmowała: filtrację próbek wina przez filtr strzykawkowy 0,45 μm , a następnie wzbogacenie próbek wina poprzez dodatek wzorca wewnętrznego – aniliny (IS). Derywatywacja analitów oraz ich ekstrakcja odbywały się równolegle. Proces konwersji chemicznej analitów był przeprowadzony z wykorzystaniem chloromrówczanu etylu w obecności trietylaminy, która pełniła rolę katalizatora reakcji. Natomiast rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym był EtOAc jako „zielona” alternatywa dla powszechnie stosowanych rozpuszczalników ekstrakcyjnych. Po przeprowadzeniu wstępnych badań do procesu optymalizacji wybrano trzy parametry: objętość EtOAc (w zakresie 50 – 250 μl), dodatek NaCl (w stężeniu od 5 do 15% w/v) oraz czas wytrząsania (10 - 90 sek.).

Optymalizacja procesu ekstrakcji została przeprowadzona w oparciu o model Box – Behnken'a. Wybrany model pozwolił na przeprowadzenie efektywnego procesu optymalizacji z wykorzystaniem zaledwie 15 próbek. Spośród wybranych parame-

trów największy wpływ na efektywność procesu ekstrakcji miała objętość EtOAc oraz dodatek NaCl. Najlepsze wyniki uzyskano przy wykorzystaniu 50 μ l EtOAc oraz 5% w/v NaCl. Ten niewielki dodatek NaCl zapobiegał tworzeniu się emulsji. Czas wytrząsania nie miał wpływu na efektywność ekstrakcji BA. Parametry metrologiczne opracowanej metody przedstawiały się następująco: liniowości sprawdzono dla dwóch poziomów stężeń od 0,05 do 1 mg/l i od 1 do 10 mg/l - w obu zakresach współczynniki determinacji wynosiły powyżej 0,99 dla wszystkich badanych związków; powtarzalność określono dla dwóch poziomów stężeń 0,25 mg/l oraz 2,5 mg/l, dla stężenia 0,25 mg/l mieściła się między 2,3 a 10 %, a dla stężenia 2,5 mg/l między 2,6 a 11 %; precyzja wynosiła 82 – 101 %; LOD mieściło się w zakresie 1,5 – 8,1 μ g/l.



Rysunek 3. Zawartość BA w badanych próbkach win.

W badanych próbkach win największe zawartości odnotowano dla kadaweryny, putrescyny oraz histaminy. Natomiast zawartość pozostałych amin biogennych była poniżej 100 μ g/l. Ten trend, w którym zawartości kadaweryny, putrescyny i histaminy są wyższe od zawartości pozostałych amin biogennych można zaobserwować również w winach pochodzących z innych krajów w tym z Grecji czy Hiszpanii. Jednak biorąc pod uwagę wartości stężeń oznaczanych amin są one niższe niż w winach z innych krajów, gdzie osiągają nawet kilkanaście mg/l.

3. OCENA PROFILU METABOLOMICZNEGO WIN POCHODZĄCYCH Z CHŁODNEGO KLIMATU

Kolejnym etapem badań była ocena profilu metabolicznego win pochodzących z chłodnego klimatu. Pierwszym krokiem by osiągnąć wyznaczony cel, było opracowanie metody opartej na elektroforezie kapilarnej sprzężonej ze spektrometrią mas (CE-MS) dla związków z grupy BA. Procedura analityczna obejmowała przygotowanie próbki, które polegało na przefiltrowaniu próbki wina przez filtr celulozowy 0,45 μm oraz poddaniu działaniom ultradźwięków. Tak przygotowana próbka mogła być analizowana za pomocą CE-MS. Czas analizy wynosił 10 min, w którym oznaczono 32 BA otrzymując bardzo dobre parametry walidacyjne - liniowość: $R^2 > 0,981$ w zakresie stężeń 0,05-10 $\mu\text{g/ml}$; LOD: 0,002-0,22 $\mu\text{g/ml}$; powtarzalność pola powierzchni (2,5 $\mu\text{g/ml}$) (n=5): CV <23; precyzja pośrednia pola powierzchni (2,5 $\mu\text{g/ml}$) (n=5): CV<16,8; powtarzalność czasu migracji (2,5 $\mu\text{g/ml}$) (n=5): CV<3,8; precyzja pośrednia czasu migracji (2,5 $\mu\text{g/ml}$) (n=5): CV<1,7.

Następnie w celu identyfikacji występujących w winie polarnych, obdarzonych ładunkiem elektrycznym metabolitów zastosowano analizę niecelowaną. Badaniu poddano wina białe i czerwone. Po usunięciu szumu, duplikatów, adduktów oraz fragmentów, oznaczono 94 polarne, głównie z grup aminokwasów, BA i białek związki. Analiza statystyczna (w tym analiza głównych składowych, analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów) pozwoliła wskazać, że największe różnice pomiędzy winami pochodzącymi z różnych części naszego kraju jak również pomiędzy typami win można zaobserwować wśród aminokwasów a zwłaszcza w zawartości proliny i fenyloalaniny. Natomiast rozpatrując różnice pomiędzy profilem metabolomicznym win białych i czerwonych a związkiem najbardziej determinującym kategoryzację win jest cykliczny kwas arginobursztynowy, który znajduje się w dynamicznej równowadze z kwasem arginobursztynowym w jego otwartej postaci. Cykliczną formę można zaobserwować w winach białych, które charakteryzują się niższą wartością pH niż wina czerwone.

4. OCENA WZAJEMNYCH ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY FIZYKO-CHEMICZNYMI PARAMETRAMI WINA

Istnieje wiele doniesień naukowych wskazujących, że warunki uprawy winorośli mają istotny wpływ na właściwości fizyko-chemiczne wina. W związku z tym przeprowadzona analiza chemometryczna miała na celu zbadanie potencjalnych korelacji pomiędzy zawartością polifenoli, kwasów organicznych (oznaczonych w poprzednim etapie badań) oraz mikro- i makroelementami w winach polskiego pochodzenia.

Skład pierwiastkowy badanych win został zbadany za pomocą spektrometrii mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-MS), obejmując analizę takich pierwiastków, jak: Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, Tl, V, Zn i Zr. Przed analizą wszystkie wina zostały poddane filtracji przez filtr strzykawkowy 45 μm oraz rozcieńczone wodą dejonizowaną w stosunku 1:10.

W celu odkrycia zależności między wybranymi grupami związków w winach chłodnego klimatu a ich właściwościami charakterystycznymi dla win czerwonych, białych i różowych, zastosowano wielowymiarową analizę statystyczną (grupowanie hierarchiczne oraz niehierarchiczne jak również analizę głównych składowych). Badanie opierało się na analizie 23 próbek win pochodzących z polskich winnic zlokalizowanych w różnych regionach, opisanych przy użyciu 43 zmiennych chemicznych. Wykorzystano eksplorację danych do identyfikacji grup podobieństw (wzorców, klastrów) pomiędzy winami oraz zmiennymi opisującymi ich skład. Dodatkowo, szczególny nacisk położono na analizę resweratrolu i jego powiązań z innymi związkami chemicznymi. Podczas rozróżniania win pochodzących z różnych rejonów Polski oraz rozróżniania typów win najbardziej znaczące są stężenia: kwasu mlekowego, kumarowego, galusowego, synapowego jak również resweratrolu, katechiny, K i Se, które są wyższe w winach czerwonych niż w winach białych i różowych. Natomiast wina białe i różowe są bogatsze w kwas jabłkowy i cytrynowy oraz Ca i Co [25].

Ponadto, punktacja ReliefF wskazuje na możliwą korelację między resweratrolem a kilkoma metalami, takimi jak Zr, K, B, Pb i Ba. Wykorzystanie w przyszłości innych narzędzi analitycznych być może pomoże zidentyfikować ewentualne kompleksy [25].

UWAGI KOŃCOWE

W omawianej pracy przedstawiono trzy metody analityczne, które następnie zostały wykorzystane do oznaczenia wybranych analitów z grupy polifenoli, kwasów organicznych, BA oraz mikro- i makroelementów w polskich winach. Biorąc pod uwagę znaczenie zrównoważonego rozwoju, wszystkie opracowane metody analityczne zostały stworzone w taki sposób, aby spełniały wymagania Zielonej Chemii Analitycznej. Cele przy projektowaniu tych technik obejmowały minimalizację użycia rozpuszczalników organicznych, redukcję czasu analizy oraz minimalizację i/lub znaczne ograniczenie źródeł błędów związanych z etapem przygotowania próbki w procedurze analitycznej. Co więcej, każda z opracowanych metod analitycznych została pomyślnie zastosowana do próbek rzeczywistych, dając wiarygodne i powtarzalne wyniki. Warto podkreślić, że oprócz nowych metod analitycznych, nowatorstwo badań polegało na wyborze samych

próbek. Polskie wina to unikalne, niszowe produkty o dużym potencjale rozwoju, rzadko omawiane w literaturze.

Przy użyciu opracowanych metodyk scharakteryzowano polskie wina pod kątem zawartości omawianych związków. Ponadto, wyniki uzyskane za pomocą opracowanych metod analitycznych zostały wykorzystane jako dane wejściowe do wielowymiarowej analizy statystycznej w celu znalezienia możliwych korelacji między parametrami fizykochemicznymi badanych próbek win, co może być użyte do oceny autentyczności win, rozróżnienia typów win, oceny jakości oraz oceny wpływu *terroir*.

Wyniki przeprowadzonych badań umożliwiają wybór techniki analitycznej, która pozwala na szybką, niedrogą i przyjazną dla środowiska ocenę jakościową i ilościową określonych składników w winach. Ponadto otrzymane wyniki mogą być kluczowe zarówno dla konsumentów, którzy będą w stanie ocenić jakość polskich win, a także dla winiarzy, którzy będą mogli kontrolować proces produkcji wina tak by dostarczać najwyższej jakości produkty.

PODZIĘKOWANIE

Serdecznie dziękuję Komitetowi Chemii Analitycznej Państwowej Akademii Nauk za przyznanie mi zaszczytnego tytułu Laureatki konkursu oraz za uznanie moich osiągnięć. Pragnę również podziękować firmie WITKO sp. z o.o. za ufundowanie nagrody. To dla mnie ogromne wyróżnienie i motywacja do dalszej pracy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Winogrodniczy, <https://winogrodniczy.pl/> (Dostęp: 30.10.2024)
- [2] T. Tarko, A. Duda-Chodak, P. Sroka, P. Satora, Eż. Jurasz, J. Food Compost. Anal. 2010, **23**, 463.
- [3] C. van Leeuwen, In Managing Wine Quality. Elsevier, 2010.
- [4] A. Robles, M. Fabjanowicz, T. Chmiel, J. Płotka-Wasyłka, Trends Anal. Chem. 2019, **120**, 115630
- [5] M. Gawlik, Ł. Nowak, M. Baran, Bromat. Chem. Toksykol. XLI 2008, 15-20
- [6] M. Gerogiannaki-Christopoulou, P. Athanasopoulos, N. Kyriakidis, I.A. Gerogiannaki, M. Spanos, Food Control 2006, **17**, 700-706
- [7] L. Cai, J. Koziel, M. Dharmadhikari, J. H. van Leeuwen, J. Chromatogr. A 2009, **1216**, 281–287
- [8] I. Kolouchova-Hanzlikova, K. Melzoch, V. Filip, J. Smidrkal, Food Chem. 2004 **87**, 151–158
- [9] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, J. Chromatogr. A 2013, **1315**, 21–27
- [10] J.J. Ren, H. Yan Liu, Y. Hong Hao, P. Gang He, Y. Zhi Fang, Chin. Chem. Letters. 2007, **18**, 985–988
- [11] T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, A. Silva, R. Cela, J. Chromatogr. A 2016, **1442**, 107–117
- [12] R. Montes, M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, Anal. Chim. Acta. 2010, **673**, 47–53

- [13] A. Souto, M. Carneiro, M. Seferin, M. Senna, A. Conz, K. Gobbi, *J. Food Comp. Anal.* 2001, **14**, 441-445
- [14] M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, I. Nicoletti, I. Zagnoni, *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**, 5226-5231
- [15] R. Preti, S. Vieri, G. Vinci, *J. Food Comp. Anal.* 2016, **46**, 7-14
- [16] E. Geana, O. Dinca, R. Ionete, V. Artem, V. Niculescu, *Food Technol. Biotechnol.* 2015, **53**, 73-80
- [17] Y. Wang, F. Catana, Y. Yang, R. Roderick, R. Van Breemen, *J. Agric. Food Chem.* 2002, **50**, 431-435
- [18] J. Goncalves, J. Camara, *J. Sep. Sci.* 2011, **34**, 2376-2384
- [19] M. Presta, B. Bruyneel, R. Zanella, J. Kool, J. Krabbe, H. Lingeman, *Chromatogr.* 2009, **69**, 167-173
- [20] L. Vlase, B. Kiss, S. Leucuta, S. Gocan, *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.* 2009, **32**, 2105-2121
- [21] L. Liu, Y. Zhou, Y. Kang, H. Huang, C. Li, M. Xu, B. Ye, *J. Anal. Meth. Chem.* 2017, 1-8
- [22] J. Goncalves, J. Câmara, *J. Sep. Sci.* 2011, **34**, 2376-2384
- [23] L. Gao, Q. Chu, J. Ye, *Food Chem.* 2002, **78**, 255-260
- [24] M. Fabjanowicz, M. Bystrzanowska, J. Namieśnik, M. Tobiszewski, J. Płotka – Wasylka, *Microchem. J.*, 2018, **142**, 126
- [25] M Fabjanowicz, V. Simeonov, M. Frankowski, W. Wojnowski, J. Płotka-Wasyłka, *Molecules* 2022, **27**, 6566

Praca wpłynęła do Redakcji 9 listopada 2024 r.