

Determinación de terpenos en bebidas alcohólicas mediante microextracción dispersiva líquido-líquido y cromatografía líquida

A. Oller, P. Viñas, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, España

1. Introducción

Los terpenos se encuentran en los organismos vivos desempeñando distintas funciones. Por su elevada volatilidad aportan el aroma a flores, árboles, frutos o especias; mientras que en animales desempeñan la función fisiológica de ciertas vitaminas. La Figura 1 muestra la estructura de los monoterpenos estudiados en esta comunicación (linalool, geraniol, eugenol, carvacrol y timol) que, como puede apreciarse, contienen diez átomos de carbono, dispuestos de forma cíclica o lineal. Todos ellos son producidos por diversos tipos de plantas y flores, por lo que se emplean como aromatizantes naturales. Además, todos presentan múltiples efectos beneficiosos para la salud y se usan como aditivos en la fabricación de bebidas y alimentos.

El trabajo se centra en la identificación y cuantificación de los monoterpenos en diferentes tipos de bebidas alcohólicas, en las que estos compuestos pueden encontrarse procedentes de las materias primas empleadas en su elaboración, o simplemente por haber sido añadidos al producto final para establecer su carácter organoléptico.

2. Análisis por cromatografía líquida

La cromatografía líquida se basa en la separación de los analitos según su diferente interacción con la fase estacionaria y la fase móvil. Por ello, la selección correcta de ambas fases determina la obtención de una buena separación de los compuestos. Se probaron diferentes fases estacionarias y los mejores resultados se obtuvieron con la basada en el polímero polietilenglicol (PEG). La fase móvil que conduce a la mejor separación es la compuesta por agua y acetonitrilo (AcN) en modo gradiente, variando la proporción de AcN desde un 25% mantenida durante 8 minutos, hasta el 40%, que se alcanzó en el minuto 9 y se mantuvo hasta el final del análisis. Con un flujo de fase móvil de 1 mL/min, y un volumen de inyección de 20 μ L, los analitos eluyeron con tiempos de retención comprendidos entre 5,3 y 12 minutos, que correspondían a linalool y timol, respectivamente.

Para una identificación inequívoca de los compuestos separados, se aplicó detección dual, es decir, se utilizó la detección por diodos (DAD) mediante absorción en el espectro UV y por espectrometría de masas (MS). Los espectros UV de los compuestos mostraron su máxima absorptividad molar a 210 nm, siendo ésta la longitud de onda a la que se

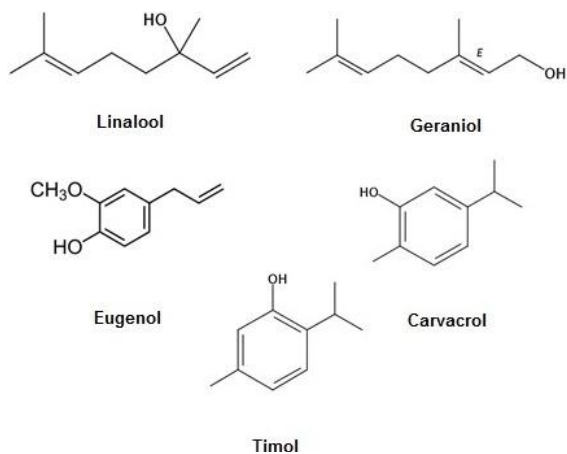


Figura 1. Estructura química de los terpenos bajo estudio.

monitorizaron todos los terpenos en DAD. El espectrómetro de masas empleado estaba equipado de una fuente ionización química a presión atmosférica (APCI) y un analizador de trampa de iones (IT). La ionización se llevó a cabo en modo positivo, para linalool y geraniol y en modo negativo para el resto de compuestos.

La Figura 2 muestra el cromatograma LC-DAD obtenido para una disolución de los estándares bajo las condiciones experimentales seleccionadas.

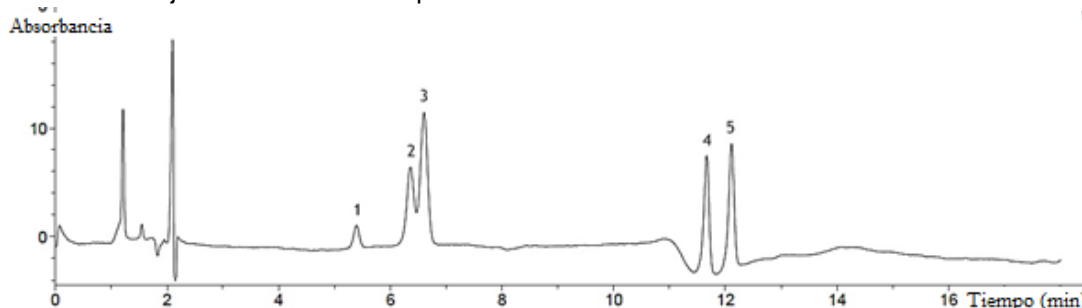


Figura 2. Cromatograma LC-DAD para una mezcla de estándares. (1) Linalool; (2) Eugenol; (3) Geraniol; (4) Carvacrol y (5) Timol.

3. *Microextracción Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME)*

Los niveles de concentración a los que habitualmente se encuentran los terpenos estudiados en las bebidas alcohólicas son generalmente bajos, por lo que, para obtener mejores señales y un procedimiento analítico con bajos límites de detección (LOD), se empleó para su preconcentración la técnica microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME).

Esta técnica fue introducida en 2006 por Assadi y col.¹ y Rezaee y col.². Se trata de una versión miniaturizada de la extracción líquido-líquido (LLE) convencional. En LLE clásica, las dos fases se agitan en un embudo de decantación para hacer más efectiva la extracción y el volumen de disolvente participante está en el orden de mililitros. Por el contrario, en la técnica miniaturizada DLLME se usan microlitros de disolvente orgánico, por lo que se considera una técnica englobada en la ideología de la química analítica verde.

En la técnica convencional se trabaja con dos disolventes, la fase aceptora y la fase dadora. Sin embargo, en DLLME³ se trabaja con un sistema ternario de disolventes; es decir, además de las fases dadora y aceptora, existe una tercera que dispersa la fase aceptora en la dadora. La presencia del dispersante, que es miscible tanto en la fase dadora como en la aceptora, proporciona la formación de infinitas microgotas del disolvente orgánico en el seno de la fase acuosa (Figura 3).

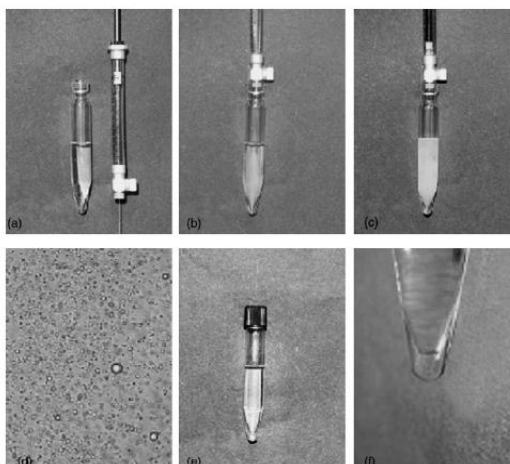


Figura 3. Etapas del procedimiento DLLME: (a) antes de la inyección de la muestra y el disolvente de extracción en el dispersante, (b) inicio de la inyección, (c) final de la inyección, (d) fotografía al microscopio óptico, magnitud 1000 (que muestra las partículas finas del extractante en el estado turbio), (e) después de la centrifugación y (f) vista aumentada de la fase sedimentada.

Básicamente su aplicación consiste en colocar la muestra acuosa conteniendo los analitos en un tubo de centrifuga de fondo cónico e inyectarle vigorosamente una mezcla de los disolventes dispersante y extractante. Esta rápida inyección provoca la aparición de una turbidez como consecuencia de la dispersión de la fase extractante en finisimas gotas en el seno de la fase acuosa. Esto incrementa la superficie de contacto entre el disolvente extractante (fase aceptora) y la disolución acuosa (fase dadora), alcanzándose muy rápidamente el equilibrio de extracción y obteniéndose con ello factores de recuperación y enriquecimiento muy altos en un tiempo muy corto, siendo una de las principales ventajas de esta técnica su independencia del tiempo, pues la extracción tiene lugar de forma instantánea.

Seguidamente, se centrifuga la mezcla, quedando en el fondo del tubo cónico la fase extractante sedimentada conteniendo los analitos, procediéndose a su análisis directo, si el disolvente es compatible con la instrumentación empleada, o evaporando y reconstituyendo el extracto en un disolvente compatible.

Esta técnica se ve afectada por diferentes parámetros que son sometidos a optimización para mejorar los resultados del método.

- **Disolvente Extractante:** se probaron disolventes orgánicos menos densos que el agua como octano, isooctano, tolueno, 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-propanol, 2-octanona y 2-undecanona. Y, por otro lado, disolventes orgánicos más densos que el agua (CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2 , 1,2-dicloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano y 1,1,2,2-tetracloroetano).

Con octano, isooctano y 2-propanol no se obtuvo gota tras la centrifugación. Tolueno, 2-octanona y 2-undecanona no conseguían la extracción simultánea de todos los compuestos. Los disolventes que más eficientemente extrajeron los analitos fueron 1-dodecanol y 1-undecanol, sin embargo, la recolección de sus gotas era difícil, además al aplicarlo a muestras reales la gota se enturbiaba, por lo que se descartaron. Con los

disolventes clorados, los mejores resultados se obtuvieron con 1,2-dicloroetano y cloroformo, seleccionando por dar mejores resultados en MS, el cloroformo.

El volumen del disolvente extractante se varió entre 75 y 200 μL . Entre 75 y 150 μL , la señal iba aumentando, mientras que con 200 μL las áreas disminuyeron por efecto de la dilución. Por tanto, se seleccionó un volumen de 150 μL .

- **Disolvente Dispersante:** se ensayaron AcN, etanol, metanol y acetona (Figura 4). La acetona proporcionó la mayor sensibilidad; sin embargo, teniendo en cuenta que el método iba a ser aplicado al análisis de bebidas alcohólicas, y que los resultados obtenidos con etanol también fueron buenos, se seleccionó como dispersante. Además, puesto que las bebidas alcohólicas ya lo contienen, no fue necesaria su adición. El volumen de dicho disolvente se estudió entre 0,5 y 2 mL, no encontrándose diferencias significativas. Estos resultados facilitan el tratamiento de las muestras, cuyos grados alcohólicos varían según el tipo de bebida y, por tanto, el volumen de etanol en ellas.

- **Volumen de muestra:** se estudió con tres bebidas diferentes (whisky, ginebra y licor), de las que se tomaron volúmenes de 5, 8 y 10 mL, inyectando 150 μL de cloroformo. Los mejores resultados se alcanzaron con 8 mL de muestra en todos los casos (Figura 5).

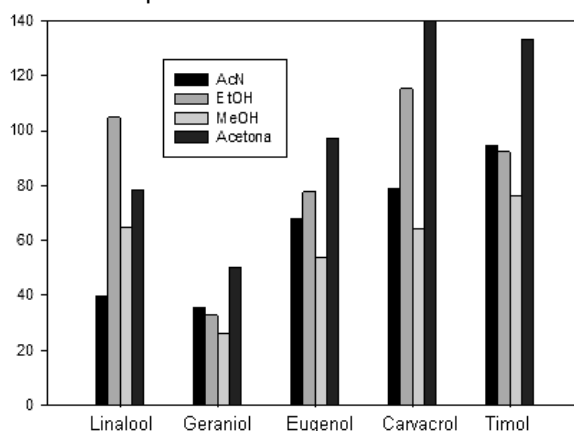


Figura 4. Elección del disolvente dispersante.

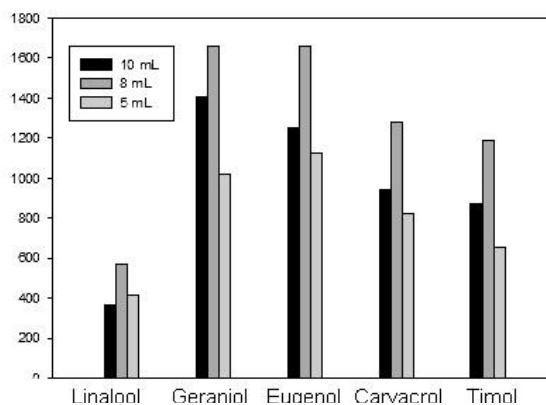


Figura 5. Elección de la cantidad de muestra.

El procedimiento DLLME finalmente propuesto para el análisis de las muestras consistió en la inyección rápida de 150 μL de cloroformo en 8 mL de bebida alcohólica, seguida de centrifugación durante 3 min a 3000 rpm. La fase sedimentada se evaporó mediante una corriente suave de gas nitrógeno, siendo finalmente reconstituido el residuo seco en 50 μL de AcN, de los cuales 20 μL se inyectaron en el sistema cromatográfico.

4. Resultados y discusión

Puesto que no se disponía de ningún material de referencia certificado para la validación del método, se comprobó su exactitud mediante estudios de recuperación realizados sobre tres muestras diferentes (ron, licor de ginseng y ginebra) fortificadas a dos niveles de concentración (0,5 y 0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Las recuperaciones obtenidas se encontraron en el rango 80-120%.

Los valores de R^2 obtenidos en la calibración del método fueron buenos, demostrando la excelente linealidad para el intervalo de concentraciones estudiado. La sensibilidad del método fue evaluada calculando los límites de detección (LODs), que se hallaron en el rango de 1,1 a 25 ng mL⁻¹, excepto para linalool cuyo LOD varió entre 25 y 600 ng mL⁻¹, dependiendo de la muestra. Por otro lado, se hizo un estudio de recuperación de los analitos para DLLME y se encontró entre 80 y 117 %.

Se analizaron diferentes bebidas alcohólicas, siendo detectado linalool en tres de ellas (anís, ginebra y licor de ginseng); geraniol en las dos ginebras, en licor de avellana y ginseng y en vino tinto; y timol en una de las ginebras. La Tabla 1 muestra los contenidos encontrados en dichas muestras.

Tabla 1. Contenidos encontrados ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de los monoterpenos en las bebidas alcohólicas

Muestra	Linalool	Geraniol	Eugenol	Carvacrol	Timol
Anís	16,22	ND	ND	ND	ND
Ginebra 1	6,5	0,49	ND	ND	ND
Ginebra 2	NQ	0,025	ND	ND	0,28
Licor de avellana	ND	1,85	ND	ND	ND
Licor de ginseng	1,84	0,25	ND	ND	ND
Vino tinto	ND	0,42	ND	ND	ND

ND significa no detectado.

Referencias

- Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Milani Hosseini, M.-R. and Aghaee, E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *J. Chromatogr. A* **1123**, 1-9 (2006).
- Rezaee, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* **1116**, 1-9 (2006).
- Panagiotou, A. N., Sakkas, V. A. and Albanis, T. A. Application of chemometric assisted dispersive liquid-liquid microextraction to the determination of personal care products in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* **649**, 135-140 (2009).