



Dr Robert Socha, prof. URK
Centrum Innowacji
oraz Badań Prozdrowotnej
i Bezpiecznej Żywności
Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie
ul. Balicka 104
30-149 Kraków

Kraków, 09.07.2025 r.

Raport z badań dotyczy: Identyfikacji i analizy związków zapachowych obecnych w ulu inhalacyjnym z wykorzystaniem metod chromatograficznych

Raport z wykonania badań z wykorzystaniem nosa elektronicznego HERACLES2/Neo

Rezultatem prowadzonych badań była analiza zawartości związków lotnych w badanych próbkach powietrza w ulu inhalacyjnym z wykorzystaniem nosa elektronicznego HERACLES2/NEO (firmy - Alpha Mos, Toulouse, Francja). Analizę związków zapachowych dokonywano metodą „headspace”, z późniejszym zatrzymaniem składników próbki przez adsorbent oraz ich rozdziale na dwóch niezależnych kolumnach chromatograficznych, (niepolarną MXT-5 i polarną MXT-1701) metodą chromatografii gazowej i przy użyciu dwóch detektorów płomieniowo-jonizacyjnych (FID1 i FID2). Analizie poddano próbki powietrza w ulu inhalacyjnym z umieszczonej w nim ramki z miodem oraz ula bez ramki z miodem w podwyższonej temperaturze, stosowanej podczas inhalacji. Dodatkowo analizie poddano skład powietrza ula z ramką w temperaturze pokojowej. Rezultatem badań była identyfikacja związków lotnych dla badanych próbek, oraz określenie ich procentowego udziału w fazie lotnej.

Aby uzyskać założone cele badań:

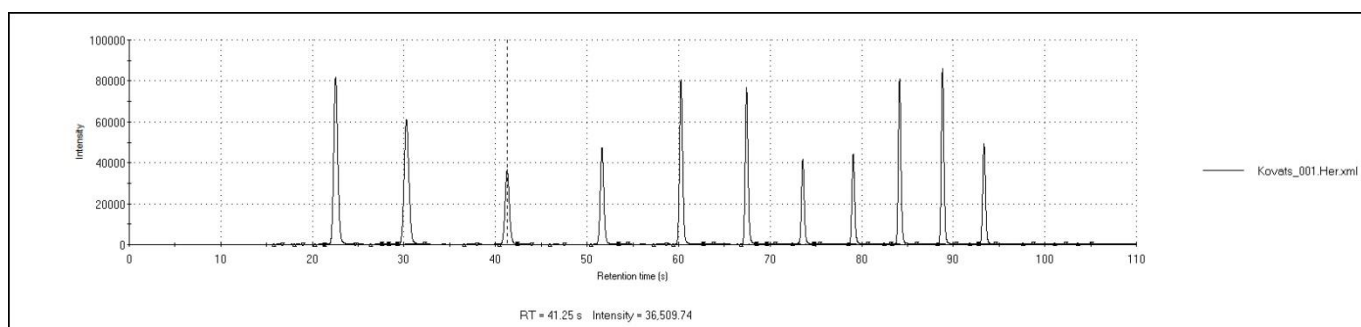
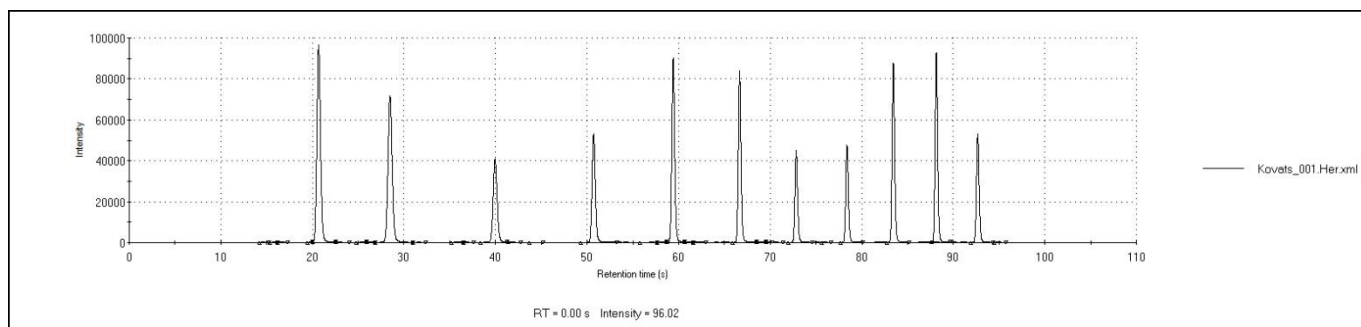
- przygotowano metodykę analityczną, adekwatną do typu analizowanych próbek,
- dokonano kalibracji kolumn chromatograficznych z wykorzystaniem lotnych wzorców węglowodorów,
- przeprowadzono analizę chromatograficzną badanych próbek w 3 powtórzeniach,
- zinterpretowano wyniki analizy, poprzez integrację pików chromatograficznych oraz identyfikację poszczególnych związków lotnych na uzyskanych dwóch niezależnych chromatogramach.

Metodyka analizy związków lotnych w badanych próbkach



Pierwszym etapem analizy było **przygotowanie metodyki analitycznej**, adekwatnej do jakościowej i ilościowej analizy związków lotnych, obecnych w powietrzu badanego ula inhalacyjnego. W tym celu ustawiono odpowiednie parametry w przypadku dozownika automatycznego, inkubatora, kolumn chromatograficznych, pułapki absorpcyjnej oraz detektorów płomieniowo-jonizacyjnych (FID). Objętość nastrzykiwanej frakcji lotnej wynosiła 5000 μL , temperatura dozownika 200 $^{\circ}\text{C}$, temperatura w której zachodził proces inkubacji (tj. desorpcji frakcji lotnej z próbki) 60 $^{\circ}\text{C}$, a czas inkubacji 20 min. Temperatura urządzenia termostatującego kolumny chromatograficzne wynosiła 50 $^{\circ}\text{C}$, natomiast temperatura detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID) wynosiła 260 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura w jakiej dochodziło do desorpcji frakcji lotnej (z pułapki absorpcyjnej) wynosiła 40 $^{\circ}\text{C}$. Fiolki szklane, które umieszczono w ulu inhalacyjnym w celu pobrania próbek powietrza, zamknięto szklanymi kapslami, zaopatrzonymi w septę, a następnie poszczególne próbki umieszczano w dozowniku automatycznym nosa elektronicznego HERACLES2/Neo. Analizę obecności i zawartości związków lotnych w badanych próbkach przeprowadzono w 2 powtórzeniach.

Drugim etapem analizy była **kalibracja urządzenia**. Ponieważ nos elektroniczny nie identyfikuje bezpośrednio substancji rozdzielanych w trakcie analizy chromatograficznej, należało przed wykonywanymi analizami dokonać wstępnej kalibracji kolumn chromatograficznych. W tym celu dokonano wstępnej kalibracji dwóch kolumn chromatograficznych (MXT-5 i MXT-1701) z wykorzystaniem wzorców, którymi były mieszaniny węglowodorów (C6 – C16), tj. węglowodorów o zróżnicowanej ilości atomów węgla od 6 (C6) do 16 (C16). Po nastrzyknięciu tych wzorców na kolumny chromatograficzne, otrzymano dwa niezależne chromatogramy, z pikami chromatograficznymi, przypisanymi dla każdego węglowodoru, obecnego w mieszaninie wzorców (C6 –C16). Piki te uzyskano w wyniku rozdziału poszczególnych składników mieszaniny wzorcowej na dwóch kolumnach chromatograficznych nosa elektronicznego HERACLES2/Neo.



Rys. 1. Chromatogramy z pikami chromatograficznymi, przypisanymi dla każdego węglowodoru, obecnego w mieszaninie wzorców (C6 –C16).

Na podstawie odczytanych przez program (Alpha Soft) wartości indeksów retencji Kovatsh'a dla poszczególnych pików chromatograficznych mieszaniny wzorców węglowodorów (C6-C16), istnieje możliwość identyfikacji substancji lotnych, obecnych w badanych próbkach na podstawie porównania wartości indeksów retencji Kovatsh'a pików chromatograficznych uzyskanych dla badanych próbek (poniżej), z tymi otrzymanymi dla mieszaniny wzorców (C6-C16).

Analiza uzyskanych wyników:

Na podstawie uzyskanych dwóch chromatogramów w przypadku każdej badanej próbki, program (Alpha Soft), obsługujący nos elektroniczny HERACLES2/Neo przypisał dla każdego pików chromatograficznego odpowiadające mu związki lotne. Identyfikacja związków lotnych odbywała się na następującej zasadzie: program przypisywał nazwy chemiczne związków lotnych, odpowiadające pikowi chromatograficznego z pierwszej kolumny i pikowi odpowiadającego tej samej substancji na drugiej kolumnie chromatograficznej. Zidentyfikowane związki przedstawiono w Tabeli 1.

Zidentyfikowane związki można zakwalifikować do głównych grup związków chemicznych takich jak: alkohole, aldehydy, ketony, estry, nienasycone węglowodory, związki aromatyczne (aldehyd benzoowy, 2-fenyletanol), kwasy organiczne, węglowodory nienasycone, związki heterocykliczne (pochodne furanu) oraz pochodne węglowodórów (terpenoidy roślinne, np. pinen, terpinolen, linalol).

Zawartość związków lotnych w ulu z ramką z miodem w temperaturze podwyższonej					
Lp.	Nazwa substancji lotnej	Współczynnik zgodności [%]	Zawartość w fazie lotnej [%] średnia ± odchylenie standardowe	1 powtórzenie Pole powierzchni piku	2 powtórzenie Pole powierzchni piku
1.	Etanol	92,71	10,70 ± 1,47	3112,5	2942,3
2.	Aceton	87,42	1,67 ± 0,08	317,29	322,73
3.	Kwas propionowy	91,90	1,62 ± 0,09	97,05	77,06
4.	Octan butylu	93,59	1,90 ± 0,27	99,06	102,73
5.	Furfural	93,71	1,29 ± 0,23	65,76	71,93
6.	1-Hexanol lub 2-Heptanon	97,61 97,46	0,60 ± 0,01	53,14	52,19
7.	Dihydro-2(3H)-furanon	97,24	1,74 ± 0,44	83,44	101,53
8.	α-Pinen	96,79	9,58 ± 0,09	561,23	468,76
9.	Aldehyd benzoowy	89,18	6,64 ± 0,15	394,95	321,52
10.	Terpinolen	95,93	1,45 ± 0,04	85,83	69,98
11.	Linalol	79,97	1,84 ± 0,03	106,03	92,11



12.	2-Fenyloetanol	91,29	$1,28 \pm 0,30$	95,11	91,80
13.	Ester etylowy kwasu oktanowego	97,83	$1,09 \pm 0,18$	60,24	56,12
14.	4-Winylo- gwajakol	87,13	$4,12 \pm 0,18$	209,57	228,74
15.	Cynamonian metylu	89,21	$1,40 \pm 0,16$	74,80	74,95
16.	Benzofenon	92,14	$1,53 \pm 0,42$	90,06	61,02

Analizując skład powietrza w ulu z ramką z miodem w temperaturze podwyższonej, stwierdzono, że w największej ilości występowały w nim: etanol, alfa-pinen, oraz aldehyd benzoesowy, stanowiąc ok. 25% składu związków lotnych wykrytych przez nos elektroniczny. Należy zwrócić uwagę na obecność „mini-składników”, które pomimo niskiego stężenia mogą odpowiadać w istotnym stopniu za aromat wyczuwalny w trakcie inhalacji. Przykładem tego typu substancji mogą być: 2-fenyloetanol, octan n-butyłu, oraz terpenoidy (tj., linalol i terpinolen), spośród których np. linalol może być odpowiedzialny za nutę zapachową propolisu, którego niewielkie ilości były obecne w analizowanym ulu inhalacyjnym. Estry zapachowe (np., octan butyłu i cynamonian metyłu) są odpowiedzialne za nutę zapachową, zbliżoną do zapachu owoców. Natomiast aldehyd benzoesowy wprowadza nutę zapachową zbliżoną do zapachu gorzkich migdałów.

Zawartość związków lotnych w ulu z ramką z miodem w temperaturze pokojowej					
Lp.	Nazwa substancji lotnej	Współczynnik zgodności [%]	Zawartość w fazie lotnej [%] średnia $\pm$ odchylenie standardowe	1 powtórzenie Pole powierzchni piku	2 powtórzenie Pole powierzchni piku
1.	Etanol	92,71	$20,96 \pm 0,17$	2961,15	3261,6
2.	Octan etylu	80,68	$0,56 \pm 0,08$	76,46	67,41
3.	2-metylo-1-propanol	97,57	$1,07 \pm 0,02$	162,4	165,43
4.	Pentanal lub 2-pentanol	92,28/92,22	$1,66 \pm 0,08$	240,47	263,59
5.	2-Metylo-1-butanol	93,15	$5,44 \pm 0,27$	785,58	864,05
6.	Maślan etylu	95,38	$5,49 \pm 0,04$	815,77	779,91
7.	2-Heptanon lub	89,92/89,91	$0,80 \pm 0,05$	114,17	128,22

	1-Heksanol				
8.	Dihydro-2(3H)-furanon	96,67	$1,08 \pm 0,01$	163,37	164,75
9.	α -Pinen	96,79	$21,47 \pm 0,63$	3277,07	3219,88
10.	Aldehyd benzoesowy	99,15	$0,70 \pm 0,02$	108,24	105,28
11.	1-metylo-4-izopropenylo-1-cykloheksen	95,15	$8,55 \pm 0,25$	1252,72	1336,87
12.	(Z)-2-Oktenal	79,97	$1,50 \pm 0,01$	225,27	228,38
13.	Alkohol benzyłowy	97,84	$0,77 \pm 0,11$	106,88	117,98
14.	Ester etylowy kwasu oktanowego	97,83	$1,09 \pm 0,18$	60,24	56,12
15.	n-Nonanal	91,73	$0,67 \pm 0,03$	96,48	106,88
16.	Cynamonian metylu	91,99	$1,43 \pm 0,03$	69,2	62,89

Analizując skład powietrza w ulu z ramką z miodem w temperaturze pokojowej, stwierdzono, że analogicznie jak w poprzednim w największej ilości występowały w nim: etanol oraz alfa-pinen, przy czym ta druga substancja (należąca do terpenoidów roślinnych) występowała w badanej próbce powietrza w największej ilości (ponad 21%). Biorąc pod uwagę sensoryczne „mini-składniki”, w badanej próbce występowały (analogicznie jak w poprzedniej): dihydro-furanon, aldehyd benzoesowy, cynamonian metylu. Nie stwierdzono natomiast obecności: benzofenonu, 2-fenyloetanolu, winylogwajakolu, linalolu, terpinolenu, furfuralu i octanu n-butylu. Może to wynikać z faktu, iż substancje te z uwagi na niską lotność (niższą prężnością pary) w porównaniu z pozostałymi, bardziej lotnymi substancjami nie przechodzą do powietrza z ramki z miodem oraz innych elementów ula, np. części drewnianych, zawierający niewielkie ilości propolisu w temperaturze pokojowej. Ta różnica temperatur ma istotny wpływ zarówno na profil i zawartość związków lotnych, jak i nutę zapachową (aromat) wyczuwalny podczas inhalacji.

Zawartość związków lotnych w ulu bez ramki z miodem w temperaturze podwyższonej					
Lp.	Nazwa substancji lotnej	Współczynnik zgodności [%]	Zawartość w fazie lotnej [%] średnia ± odchylenie standardowe	1 powtórzenie Pole powierzchni piku	1 powtórzenie Pole powierzchni piku
1.	Etanol	92,08	19,11 ± 1,99	734,35	711,38
2.	Octan butylu	94,52	1,91 ± 0,04	56,34	67,12
3.	Propionian butylu	97,75	2,69 ± 0,45	87,55	84,72
4.	α-Pinen	92,72	8,50 ± 0,68	321,3	286,95
5.	psi-Kumen lub 5-Metylofurfural	97,85 90,64	3,58 ± 0,03	103,55	114,96
6.	Fenol	94,08	2,60 ± 0,56	95,72	88,55
7.	p- Cymen	96,74	6,27 ± 0,56	209,94	267,91
9.	Aldehyd benzoesowy	89,73	3.31 ± 0,44	105,33	95,72
10.	2-Fenylloetanol	95,22	1,62 ± 0,35	59,09	55,04
11.	Maltol	93,79	2,15 ± 0,16	72,97	66,14
12.	Dekanal	97,11	1,93 ± 0,12	58,62	53,68

Analizując skład powietrza w ulu pozbawionym ramki z miodem w temperaturze podwyższonej, stwierdzono, że profil związków zapachowych jest znacznie uboższy w porównaniu z powietrzem w ulu zawierającym ramkę z miodem. Pomimo tego, stwierdzono, że dwie najważniejsze substancje, obecne w analizowanej próbce powietrza to etanol i α-pinen, których zawartość procentowa w badanej próbce (w odniesieniu do frakcji lotnej) sięga 27,5 %. Do istotnych sensorycznie mini-składników, które mogą decydować o nucie zapachowej (tj. aromacie), badanej próbki powietrza można zaliczyć: estry zapachowe (octan butylu i propionian butylu), p-cymen (terpenoid węglowodorowy), maltol i dekanal. W badanej próbce stwierdzono również te substancje, które występowały w ulu z ramką (tj, aldehyd benzoesowy i 2-fenylloetanol), które poza acetonem i alfa-pinenem uczestniczą w tworzeniu swoistego „śladu zapachowego” badanego ula inhalacyjnego.

Raport sporządził: dr Robert Socha, prof. URK,
Kierownik pracowni analizy zapachu



**Centrum Innowacji oraz Badań
Prozdrowotnej i Bezpiecznej Żywności**

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie



**Centrum Innowacji oraz Badań
Prozdrowotnej i Bezpiecznej Żywności**

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie