

Ф.О. Чмиленко, Ю.А. Мінаєва, Л.П. Сидорова, К.В. Шкуровська

ЕКСТРАКЦІЙНО-ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СИНТЕТИЧНИХ БАРВНИКІВ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

Розроблена методика ідентифікації та кількісного визначення вмісту синтетичних барвників у харчових продуктах методом хроматографії у тонкому шарі, підібрана оптимальна рухома фаза і використана дана методика для аналізу харчових продуктів.

Харчові барвники – це органічні забарвлюючі речовини та їх суміші, або неорганічні пігменти та їх суміші з незабарвленими компонентами, що дозволені Міністерством охорони здоров'я України для забарвлення харчових продуктів [1]. Синтетичні харчові барвники (СХБ), порівняно з натуральними мають значні технологічні переваги. Вони менш чутливі до технологічного оброблення, світла, окислювачів і змін рН, і надають яскравих, легко відтворюваних кольорів. Синтетичні барвники є термостабільними, тому забарвлений продукт можна піддавати всім необхідним технологічним операціям, у тому числі пастеризації, стерилізації, охолодженню і заморожуванню. Не потребують спеціальних умов зберігання, а також мають більш тривалі їх терміни. Їх вартість є набагато нижчою в порівнянні з натуральними барвниками, а виробництво не залежить від сезонності [2].

Однак деякі синтетичні барвники, що використовуються при виробництві безалкогольних напоїв, надають певної шкоди здоров'ю людини, викликаючи алергічні реакції або канцерогенну дію.

У зв'язку з цим, контроль вмісту барвників у продуктах харчування вкрай важливий, а розробка методів їх ідентифікації та визначення стала в останні роки однією з найбільш актуальних проблем.

Відомо багато методів кількісного визначення азобарвників: високоефективна рідинна хроматографія, спектрофотометричні методи, іонна хроматографія, капілярний електрофорез та інші [3–5]. Тонкошарова хроматографія дозволяє ідентифікувати велику кількість барвників з мінімальними матеріальними затратами [6].

Метою даної роботи є розробка екстракційно-хроматографічної методики визначення вмісту синтетичних барвників: тартразін (Е-102), жовтий «сонячний захід» (Е110), понсо 4R (Е-124) у харчових продуктах, яка дозволила б одночасно визначати декілька барвників з одного кон-

центрату.

Експериментальна частина

Водні розчини синтетичних барвників тартразін (Е-102), жовтий «сонячний захід» (Е-110), понсо 4R (Е-124) готували з концентраціями 0,1 мг/см³. Масові частки цільових компонентів визначали спектрофотометрично. Для екстракції барвників використовували такі розчинники: пропанон «х.ч.», ізопропіловий спирт «х.ч.», ізобутиловий спирт «х.ч.». Готували розчини натрію гідроксиду «х.ч.» та калію гідроксиду «х.ч.» з концентрацією 0,1 моль/л.

Спектри світлопоглинання індивідуальних СХБ реєстрували на спектрофотометрі Spesord M-40 (Німеччина), щодо води ($l=1$ см). Барвники розділяли на силікагелевих пластинах Сорбфіл (ПТСХ-АФ-В-УФ) з характеристиками: тип сорбенту – силікагель СТХ-1ВЕ, зернення – 8–12 мкм, товщина шару – 90–100 мкм, тип підкладки – алюміній, розміри – 10×15 см.

Методики експерименту

Екстракційно-хроматографічна методика

До 10 см³ водних розчинів барвників додавали 7 г амоній сульфату до насичення. В одержаний розчин вводили 1 см³ суміш пропанону-ізопропанолу. Об'ємне співвідношення рівноважних водної та органічної фаз 10:1. Струшували протягом 10 хв, після розшарування системи екстракт відділяли. Газовані напої звільняли від діоксиду вуглецю струшуванням протягом 30 хв.

Розраховували коефіцієнт розподілу (D) і ступінь вилучення (R) при екстракції сульфазобарвників бінарною сумішшю пропанон-ізопропанол за формулами:

$$D = \frac{A_1 - A_2}{A_2} \cdot \frac{V_w}{V_0};$$

$$R = \frac{D}{[D + (V_w/V_0)]},$$

де A_1 – оптична густина розчину до екстракції; A_2 – оптична густина розчину після екстракції; V_0 – рівноважний об’єм органічної фази, см^3 ; V_w – рівноважний об’єм водної фази, см^3 .

Після розшарування системи екстракт відокремлювали і капіляром відбирали невелику кількість екстракту і наносили на старт хроматографічної пластини. Пластику висушували на повітрі, після чого її вміщували в склянку з рухомою фазою, яка протягом 15–20 хв насичувалася парами розчинників. В якості рухомої фази використовували ізопропанол–циклогексанон–натрій гідроксид. Після того як фронт рухомої фази піднімався до верхнього краю пластинки не доходячи до 5 мм, пластину виймали і висушували на повітрі. Барвники ідентифікували за забарвленням і за коефіцієнтом R_f :

$$R_f = \frac{h}{H},$$

де h – фронт досліджуваної речовини, мм; H – фронт розчинника, мм.

Для кількісного визначення барвників одержані хроматографічні пластинки сканували, а далі, використовуючи програму Photoshop, знаходили значення каналів R, G і B. Будували графік залежності інтенсивності каналу від концентрації і за даними величини апроксимації вибирали той графік в якому величина апроксимації буде ближча до 1 [6]. Рівняння градувальних графіків наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Рівняння градувальних графіків оптимальних каналів

Барвник	Канал	Рівняння градувального графіку	Коефіцієнти кореляції
E-102	Канал $V_{\text{ср}}$	$y = -10,82x + 222,80$	0,99
E-110	Канал $G_{\text{ср}}$	$y = -2,00x + 227,10$	0,95
E-124	Канал $G_{\text{ср}}$	$y = -1,03x + 225,08$	0,99

Хроматографічна методика зі спектрофотометричним детектуванням у видимому діапазоні

Хроматографічний експеримент проводився на рідинному хроматографі «Міліхром-1А» (НВО «Науцприлад», м. Орел, Росія) з УФ-детектором (190–360 нм). Довжина хвилі детектора 216 (218) нм. Сталева колонка 160×2мм, заповнена сорбентом Діасорб 130 С16Т. В якості рухомої фази використовували ацетонітрил дистильована вода (10:90, об.%) фосфатний буфер рН (4,6). Розхід РФ 0,1 мл/хв. На виході з УФ-детектора Міліхрома був приєднаний фотоелектроколориметр КФО УХЛ 4.2 (415–630 нм) до аналого-цифрового перетворювача без використання схеми посилення сигналу, який використовували як детектор видимої області. Для збору і обробки хроматографічних даних викорис-

товувалася система Мультіхром 1,5х (Амперсенд, Росія).

Кількісне визначення барвників виконували методом градуйованого графіка і добавок. Для кожного барбника готували серії розчинів в інтервалі концентрацій C мг/дм³: 20,0–0,2. Пробу газованого напою звільняли від диоксиду вуглецю струшуванням протягом 30 хв, за допомогою дозатора відбирали 5 мкл проби і хроматографували. Ідентифікація здійснюється за часом утримування барвників в стандартних хроматографічних умовах.

Результати та обговорення

Екстракт аналізували методом хроматографії в тонкому шарі, який дозволяє досить швидко виявити барвники. При виборі оптимальної рухомої фази використовували такі розчинники: ізобутанол, пропанон, калій гідроксид (0,1 моль/дм³), циклогексанон, ізопропанол, натрій гідроксид (0,1 моль/дм³).

За отриманими даними, що представлені в табл. 2, оптимальною рухомою фазою для розділення сульфоазобарвників є система ізопропанол – циклогексанон – NaOH. При даній ру-

Таблиця 2

Підбір компонентів рухомої фази

Барвник	R_f	Суміш розчинників	Склад суміші
E-102 E-110 E-124	–	Ізобутанол–Пропанон–КОН (0,1 М)	5:1:4
E-102 E-110 E-124	0,13 0,32 0,13	Ізобутанол–Циклогексанон–КОН (0,1 М)	5:3:2
E-102 E-110 E-124	–	Ізобутанол–Пропанон–КОН (0,1 М)	5:2:3
E-102 E-110 E-124	0,92 1,00 0,92	Ізопропанол–Циклогексанон–КОН (0,1 М)	5:2:3
E-102 E-110 E-124	0,16 0,24 0,17	Ізобутанол–Пропанон–NaOH (0,1 М)	5:3:2
E-102 E-110 E-124	0,32 0,62 0,47	Ізопропанол–Циклогексанон–NaOH (0,1 М)	4:4:2

Таблиця 3

Підбір оптимального співвідношення компонентів рухомої фази

Співвідношення об’ємів розчинників			R_f		
Ізопропанол	Циклогексанон	NaOH	E-102	E-110	E-124
3	5	2	0,19	0,52	0,25
4	4	2	0,47	0,70	0,49
3	6	1	0,18	0,50	0,32
2	6	2	–	0,36	0,10

хомій фазі спостерігається найкраще розділення цих синтетичних харчових барвників.

Після встановлення компонентів рухомої фази, знайшли їх оптимальне співвідношення між собою. Найкраще розділення спостерігається при співвідношенні 3:6:1 компонентів ізопропанол – циклогексанон – NaOH. Рухома фаза є оптимальною, коли R_f не перевищує значення 0,65. Як видно з даних, що представлені в табл. 3 рухома фаза в співвідношенні компонентів 4:4:2 не придатна для розподілу сульфозобарвників, так як для E-110 $R_f=0,7$, а для барвників E-102 і E-110 R_f дуже близькі значення, що негативно впливає на розподіл суміші. При співвідношенні компонентів рухомої фази 2:6:2 значення R_f для всіх барвників дуже малі.

Відтворюваність отриманих даних, наведені в табл. 4, перевірені методом «введено – знайдено». Відносна похибка визначення за даною запропонованою методикою не перевищує 5%.

Таблиця 4

Результати обробки хроматограми модельного розчину

Барвник	Введено, мг	Канал R_{cp}	Канал G_{cp}	Канал V_{cp}	Знайдено, мг
E-102	3,60	–	–	177,78	3,69
E-110	3,52	–	218,89	–	3,66
E-124	3,10	–	220,89	–	3,22

Дану методику випробовували на безалкогольних напоях таких, як «Мультифруктовий», «Тархун», «Малина», «Апельсин».

Аналіз наведених продуктів на вміст барвників проводився і за допомогою хроматографічної методики зі спектрофотометричним детектуванням у видимому діапазоні [4].

Показана можливість визначення СХБ в безалкогольних напоях методом вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Основним видом використання ВЕРХ для визначення барвників в напоях є її обернено-фазовий (ОФ) варіант з детектуванням спектрофотометрії в ультрафіолетовій (190–360 нм) і видимій (380–720 нм) області. Використання різних довжин хвиль УФ- і видимого діапазону значно розширює можливості ВЕРХ і робить визначення точнішим, селективним, при цьому виключається можливість помилкової ідентифікації барвників.

На підставі спектрів поглинання для СХБ вибрані наступні умови детектування: довжина хвилі 450 нм для жовтих (E-102, E-110), 500 нм для червоних (E-124). Вивчено утримування СХБ в умовах ОФ ВЕРХ.

Вибір рухомої фази для ОФ ВЕРХ

Вплив концентрації органічного розчинника

Дуже велика різниця в утримуванні сорбатів різної гідрофобності не дозволяє використовувати ОФ ВЕРХ для одночасного визначення

більшості досліджених СХБ в ізократичному режимі елюювання. Зниження елююючої сили рухомої фази шляхом зменшення співвідношення вмісту ацетонітрила в суміші ацетонітрил – дистильована вода, приводить до кращого розділення барвників. Оптимальним є вибір рухомої фази з мінімально допустимим значенням ацетонітрила. Проте достатнього розділення не спостерігається навіть при складі РФ 10 об.% ацетонітрила – 90 об.% дистильованої води. Використання стандартних сталевих колонок з нітрільною фазою (Діасорб CN) є переважнішим і забезпечує краще розділення, чим на колонках Діасорб 130 С16 Т.

Вплив рН

Використання буферних розчинів дозволяє значно вплинути на розділення і збільшує час виходу СХБ. При використанні стандартної рухомої фази, вживаної для визначення підслащувачів і консервантів (15% ацетонітрила: 85% фосфатного буферного розчину з рН=3,2), синтетичні барвники сорбуються на колонці і в даних умовах при даному значенні рН не детектуються. Підвищення вмісту ацетонітрила до 50% не дає позитивних результатів, на хроматограмі піки не детектуються. Зміною рН буферних розчинів можна добитися виходу одних барвників і сорбцію інших і таким чином виключити помилкову ідентифікацію піків. До кращого розділення приводить застосування РФ з оптимальним значенням рН 4,0–5,9 і зменшенням вмісту ацетонітрилу. Змінюючи значення рН при градієнтному режимі можна добитися чіткого розділення всіх компонентів.

Значення рН буферного розчину і вміст органічного модифікатора є основними параметрами при оптимізації складу рухомої фази.

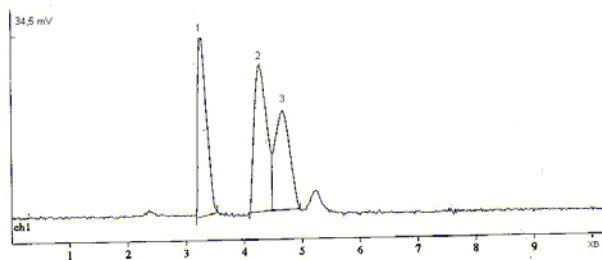
Розділення і визначення синтетичних барвників

Оскільки зазвичай в реальних зразках присутні не більше 2–4 СХБ, можна підібрати склад рухомої фази так, щоб отримати їх оптимальне розділення за мінімальний час. В оптимальних умовах в ізократичному режимі елюювання розділена модельна суміш з 3 СХБ (E-102, E-110, E-124) (рисунок) Межі виявлення складають 20–50 мкг/л. Методика була використана для визначення СХБ в напоях і сумішах синтетичних барвників. Результати досліджень підтверджені апробацією методики на реальних напоях з додаванням індивідуальних барвників (E-102, E-110, E-124) з концентрацією 20 мг/л. Погрішність отриманих результатів не перевищує 10%.

У напоях «Мультифруктовий», «Тархун», «Апельсин» і «Малина» кількісно визначена присутність там заявлених барвників E-110, E-102 і E-124 відповідно (табл. 5).

Результати визначення барвників в напоях (n=5, P=0,95)

Об'єкти аналізу (напої)	Шифр барвника	Знайдено С±Δ, мг/ дм ³ за ТШХ	S _r	Знайдено С±Δ, мг/ дм ³ за ВЕРХ	S _r
«Мультифруктовий»	E-102	1,96±0,11	0,056	2,03±0,09	0,044
	E-110	2,89±0,21	0,072	3,05±0,11	0,036
«Тархун»	E-102	4,98±0,27	0,051	5,12±0,16	0,031
«Апельсин»	E-102	4,21±0,31	0,73	4,71±0,21	0,045
	E-110	6,05±0,43	0,071	6,31±0,31	0,049
«Малина»	E-124	4,57±0,27	0,059	4,91±0,19	0,039



Хроматограма модельної суміші з СХБ: 1 – E-102; 2 – E-124, 3 – E-110 з рухомою фазою ацетонітрил: дистильована вода (10:90, об.%), фосфатний буфер рН (4,6), розхід РФ 0,1 мл/хв

Таким чином, розроблена методика ідентифікації та кількісного визначення вмісту синтетичних барвників в харчових продуктах методом хроматографії у тонкому шарі, підібрана оптимальна рухома фаза. Проаналізовані безалкогольні газовані напої за розробленою та запропонованою хроматографічною методикою зі спектрофотометричним детектуванням у видимому діапазоні для ідентифікації СХБ (E-102, E-110, E-124).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Селютіна Г.А., Золотоверхий Є.О., Селютін В.М. До питання використання барвників у харчових продуктах // Прогресивні техніка та технологія харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі. – 2005. – Вип.2. – С.301-308.
2. Офіленко Н.О. Актуальність і безпечність використання барвників у харчових продуктах // Обладнання та технології харчових виробництв. – 2010. – Вип.26. – С.534-539.
3. *Спектрофотометрическое* определение натуральных и синтетических красителей в колбасных изделиях с белковыми добавками / Л.В. Антипова, И.А. Глотов, С.А. Титов, А.С. Пешков // Аналитика и аналитики: материалы Международ. форума. – Воронеж. – 2003. – Т.2. – С.445.
4. *Ідентифікація* барвників в напоях методом високо-ефективної рідинної хроматографії / Ф.О. Чмиленко, Н.П. Мінаєва, О.В. Сандомирський, Л.П. Сидорова // Харчова промисловість. – 2008. – № 7 – С.17-19.
5. Бибик О.В., Стец Н.В., Бойко Е.С. Исследование

возможности определения красителей в напитках методом капиллярного электрофореза с фотометрическим детектированием // Вопр. химии и хим. технологии. – 2003. – № 6. – С.9-11.

6. Коренман Я.И., Суханов П.Т., Губин А.С. Экстракционно-хроматографическое определение пищевых красителей и их полупродуктов в пищевых объектах // Аналитика и контроль. – 2004. – Т.8. – № 4. – С.355-360.

Надійшла до редакції 17.02.2014

EXTRACTION-CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF THE CONTENT OF SYNTHETIC DYES IN FOOD

F.A. Chmilenko, Y.A. Minayeva, L.P. Sidorova, K.V. Shkurovskaya

Dnipropetrovsk National University, Dnepropetrovsk, Ukraine

A method of the identification and quantitative determination of synthetic dyes in foods by thin-layer chromatography was developed in this work. The optimum mobile phase- isopropanol, cyclohexanone and NaOH (0.1 M) at a volume ratio of components (3:6:1) was chosen. Some soft drinks were analyzed by the developed and proposed chromatographic method with spectrophotometric detection in the visible range for the identification of synthetic food dyes (SFD): tartrazine (E-102), yellow, «the sunset» (E-110), and Ponceau 4R (E-124). Quantitative determination of the dyes was performed by the calibration curve and additives. For each series of dyes, solutions were prepared in the concentration range (mg/dm³): 20.0-0.2. The samples of carbonated drink were released from carbon dioxide by shaking for 30 min; then 5 μL of sample were taken using the dispenser and chromatographed. The identification was performed by the retention time of dyestuffs under standard chromatographic conditions. The technique was used to determine SFD in beverages and blends of synthetic dyes. The research results were confirmed by the actual techniques approbation of beverages supplemented with the individual dyes (E-102, E-110 and E-124) at a concentration of 20 mg/L. The error of the results does not exceed 10%. The presence of declared dyes E-110, E-102 and E-124 was quantified in the drinks «Multifruit», «Tarragon», «Orange» and «Raspberry».

Keywords: synthetic dyes; food; chromatography; mobile phase; drinks.

REFERENCES

1. Selyutina G.A., Zolotoverkh E.O., Selyutin V.M. Do pytannya vykorystannya barvnykyv u kharchovykh produktakh [On the question of the use of dyes in food]. *Progresywni tekhnika ta tekhnologiya kharchovykh vyrobnyctv restorannogo gospodarstva i tovgovli*, 2005, vol. 2, pp. 301-308. (in Ukrainian).
2. Ofilenko N.O. *Aktyalnist' i bezpechnist' vykorystannya barvnykyv u kharchovykh produktakh* [Urgency and safety of use of dyes in food]. *Obladnannya ta tekhnologii kharchovykh vyrobnyctv*, 2010, vol. 26, pp. 534-539. (in Ukrainian).
3. Antipov L.V., Glotov I.A., Titov S.A., Hiking A.S., *Spektrofotometricheskoe opredelenie natyralnyh i sinteticheskikh krasitelei v kolbasnyh izdeliyah s belkovymi dobavkami*

[Spectrophotometric determination of natural and synthetic dyes in sausage products with protein supplements]. *Proceedings of the international conference «Analitika i analitiki»*. Russian Federation, Voronezh, 2003, vol. 2, pp. 445. (in Russian).

4. Chmilenko F.O., Minaeva N.P., Sandomirsky O.V., Sidorova L.P. Identifikaciya barvnykiv v napoyah metodom visokoeffektivnoi ridinnoi hromatografii [Identification of dyes in beverages by high performance liquid chromatography]. *Kharchova promyslovist*, 2008, no. 7, pp. 17-19. (in Russian).

5. Bibik O.V., Stec N.V., Boyko E.S. Issledovanie vozmozhnosti opredeleniya krasitelei v napitkah metodom kapillyarnogo elektroforeza s fotometricheskim detektirovaniem [Study of the possibility of determining the dyes in beverages by capillary electrophoresis with photometric detection]. *Voprosy khimii i khimicheskoi tehnologii*, 2003, no. 6, pp. 9-11. (in Russian).

6. Korenman Y.I., Sukhanov P.T., Gubin A.I. Ekstrakcionno-khromatograficheskoe opredelenie pischevykh krasitelei i ikh polyprodyktov v pishchevykh ob'ektakh [Extraction-chromatographic determination of food dyes and their intermediates in the food objects]. *Analitika i kontrol*, 2004, vol. 8, no. 4, pp. 355-360. (in Russian).