

УДК 661.155.8:543.544.5.068.7

Е.Ю. Купчик, канд. хим. наук (Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г.Шевченко, г. Чернигов, Украина)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕНЗОЙНОЙ И СОРБИНОВОЙ КИСЛОТ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ МЕТОДОМ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Описана методика мицеллярной жидкостной хроматографии для разделения и определения 2 веществ-консервантов: бензойной кислоты (ВА) и сорбиновой кислоты (СА). В ходе разработки соответствующей методики подобран состав гибридного мицеллярного элюента. Разделение эффективно при использовании подвижной фазы, состоящей из 0,05 М додецилсульфата натрия (ДСН), 1% п-пентанола, хлоридной кислоты (рН≈3) на октадецилсиликагеле С₁₈. Длина волны детектирования соответствует 240 нм. При соблюдении условий разделение всех компонентов возможно за 11 мин. Определены аналитические характеристики разделения: предел детектирования, диапазон линейности и воспроизводимость. Правильность результатов подтверждена апробацией методики на различных продуктах питания.

Ключевые слова: мицеллярная жидкостная хроматография (МЖХ), консерванты.

Наличие дифильных микроагрегатов в подвижной фазе и динамическая модификация стационарной фазы создают в МЖХ новые возможности разделения. Не прибегая к градиентному элюированию, в условиях МЖХ удается одновременно разделять смеси гидрофобных и гидрофильных, ионных и неионных аналитов [1, 2]. Дополнительные интересные возможности возникают при использовании МЖХ для анализа растительных материалов, биологических образцов и других объектов, содержащих вещества, малорастворимые в воде. Пробоподготовка таких объектов анализа существенно упрощается, поскольку мицеллярная подвижная фаза может использоваться непосредственно для растворения пробы и извлечения определяемых компонентов за счет солюбилизующего действия мицелл ПАВ [2]. В современном производстве продуктов питания, лекарств, косметических и парфюмерных товаров широко используются химические консерванты — вещества, добавки которых замедляют или предотвращают развитие микрофлоры (бактерий, плесеней, дрожжей и других микроорганизмов) и тем самым обеспечивают сохранность продукта [3, 4]. Консервантами могут служить вещества различной природы; при выборе принимают во внимание эффективность действия вещества на различные микроорганизмы, безвредность для потребителя, степень влияния на органолептические свойства продукта. К наиболее распространенным консервантам продуктов питания относятся:

1. *Бензойная кислота.* Входит в состав многих плодов и является распространенным природным консервантом [3]. Антимикробное действие связано со способностью бензойной кислоты подавлять в микробных клетках активность ферментов, ответственных за окислительно-восстановительные реакции и усиливается в кислой среде при рН ниже 5, где преобладает недиссоциированная форма кислоты [4].

2. *Сорбиновая кислота.* Обладает достаточно высоким антимикробным действием, наибольшую антимикробную и антигрибковую активность проявляет при рН около 4.5. Действие сорбиновой кислоты при рН 5 превосходит действие бензойной кислоты в 2-5 раз [2].

Аналитическое определение консервантов играет важную роль в обеспечении качества потребительских товаров, защите интересов и безопасности потребителя. Нет универсальных консервантов, которые были бы пригодны для

всех продуктов потребления; все чаще для расширения спектра антимикробного действия используются смеси консервантов. Поэтому среди методов контроля содержания консервантов наибольший интерес представляют методы, обеспечивающие одновременное селективное обнаружение и определение всего перечня консервантов, находящихся в продукте.

За последние годы для определения отдельных консервантов в продуктах питания предложены методики обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) [5-11], газовой хроматографии [12, 13], капиллярного электрофореза [14], мицеллярной электрокинетической хроматографии [15].

Мицеллярная жидкостная хроматография (МЖХ) является разновидностью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. В качестве подвижной фазы в МЖХ применяют водные растворы поверхностно-активных веществ с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования, содержащие небольшие добавки органических растворителей, как правило, алифатических спиртов [1].

Применение МЖХ описано для определения бензойной кислоты, 4-гидроксибензойной кислоты, метил-, этил-, пропил-, изопропил- и бутилпарабенов в косметической продукции (шампуни, лосьоны для рук, крема) и продуктах питания. Мемон N и др. рекомендуют метод мицеллярной хроматографии на колонке Lichrosorb ODS, пробу растворяют в *n*-пропаноле, добавляют водный раствор 2% Brij-35, доведенный до pH 3.0 фосфорной кислотой, – пропанол в соотношении 80:20 (v/v). Навески образцов растворяли в *n*-пропаноле, а затем действовали ультразвуком в течение 15 мин. В случае куриного паштета и томатного кетчупа, смеси ещё и фильтровали [16].

Главной целью этой работы является развитие возможностей применения МЖХ для разделения и одновременного определения консервантов в пищевых продуктах.

Из ранее изученного нами ассортимента консервантов [17] выбрано 2 соединения. В работе использовались бензойная кислота и сорбиновая кислоты производства Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Для приготовления подвижных фаз использовались додецилсульфат натрия, хлоридная кислота, *l*-пентанол, метанол производства Merck (Германия). Растворы готовились на бидистиллированной воде.

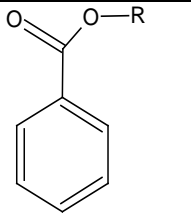
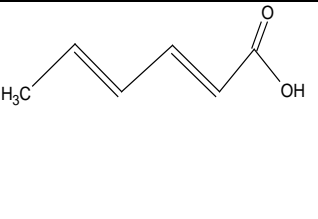
Исходный раствор 0,1 моль/л ДСН готовили растворением навески додецилсульфата натрия в бидистиллированной воде и фильтровали на стеклянном фильтре ПОР 16 под вакуумом. Мицеллярные подвижные фазы готовили разбавлением исходного раствора ДСН.

Хроматографирование проводилось на приборе ProStar (Varian, Нидерланды), состоящего из насоса ProStar 210, детектора флуоресцентного ProStar 363 и диодной матрицы ProStar 335. Разделение компонентов проводилось на обращенно-фазовой колонке 250 mm × 4,6 mm Microsorb 100 C 18 с размером частиц 5 μm. Температура колонки соответствовала 40,0 ± 0,1 °C в течение всего анализа. Объем пробы соответствовал 20 мкл. pH подвижной фазы контролировали pH-метром Beckman Ф50, который предварительно калибровали по стандартным буферным растворам со значением pH 1,68 и 3,56, 4,01.

Распределение веществ между стационарной фазой C₁₈, динамически модифицированной компонентами мицеллярного элюента, и мицеллярной подвижной фазой регулируется в основном двумя типами взаимодействий:

гидрофобными и электростатическими. Электростатическое отталкивание диссоциированных по карбоксильной группе кислот от анионных микроагрегатов ДСН в подвижной фазе и на поверхности модифицированной стационарной фазы приводит к тому, что вещества заметно удерживаются лишь при значениях pH подвижной фазы ниже pK_a диссоциации кислот по карбоксильной группе. При этом удерживание регулируется и гидрофобностью веществ (табл.1)[16].

Таблица 1. Формулы, значения $\log P_{o/w}$ и pK_a для консервантов

Консервант (BA) – Бензойная кислота		Консервант (SA) – Сорбиновая кислота	
	R = H		
	$pK_a=4.20\pm 0.20$ [18] $\log P_{o/w} = 1.89\pm 0.21$ [18]		$pK_a=4.60\pm 0.10$ [18] $\log P_{o/w} = 1.35\pm 0.25$ [18]

Становится очевидным то, что pH подвижной фазы должна быть менее 4,00, чтобы разделяемые компоненты находились только в протонированной форме. Поэтому в качестве компонента, определяющего pH, решили использовать хлоридную кислоту.

Таким образом, хроматографирование проводилось с подвижной фазой состава: 0,05М ДСН, 1% (по объему) *n*-пентанола и хлоридная кислота HCl.

Чтобы определить с длиной детектирования были сняты индивидуальные УФ-спектры веществ, навески которых растворяли в 10 мл метанола с последующим разбавлением (1:100) подвижной фазой. Индивидуальные УФ-спектры веществ были получены на спектрофотометре 8453 фирмы Hewlett Packard. и представлены на рис. 1.

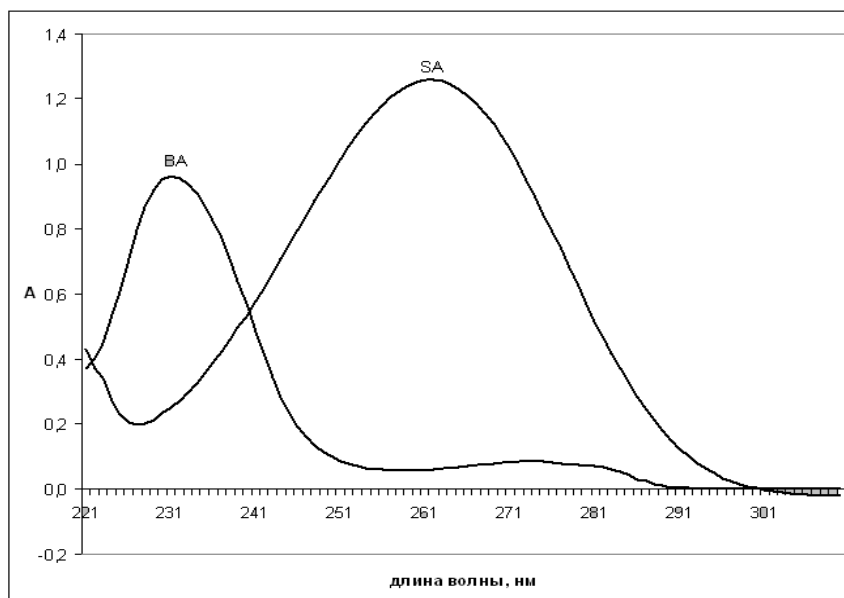


Рис. 1. Индивидуальные спектры консервантов, мкг/мл: SA, 2.5; BA, 10

Из рис. 1 видно, что бензойная кислота имеет максимум поглощения в районе 230 нм, сорбиновая кислота – в районе 260 нм. В области 240 нм поглощают в равной степени оба присутствующие анализа, поэтому

детектирование проводилось при длине волны (λ) 240 нм; скоростью потока 1,0 мл/мин.

Для приготовления исходного раствора точно взвешенные навески веществ помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и растворяли в метаноле. Рабочие растворы смеси консервантов готовили разбавлением 1 мл исходного раствора в 100 раз соответствующей подвижной фазой (рис. 2).

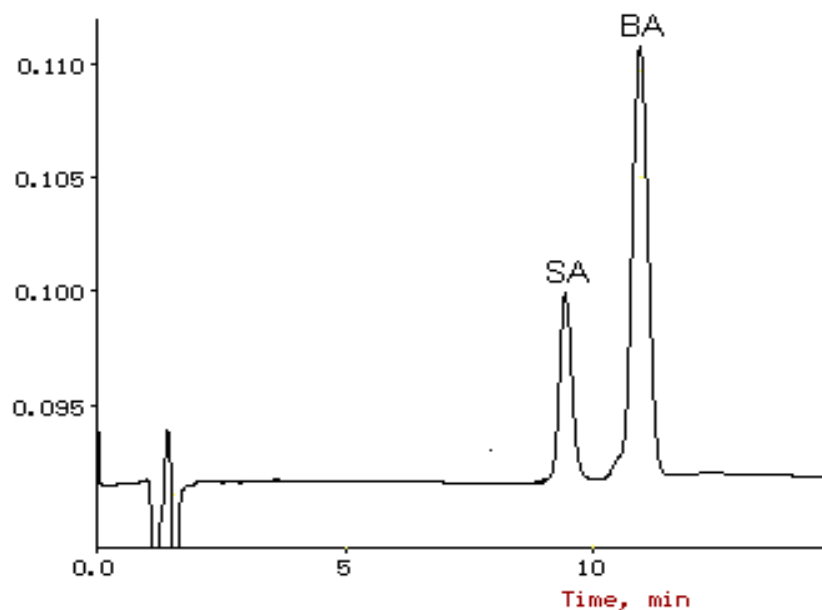


Рис. 2. Хроматограмма стандартной смеси консервантов, ммоль/л: BA, 8.5 и SA, 1.2

Исследование проводилось на объектах, которые были куплены в супермаркетах города Луганска. Набор объектов состоял из морса, соков, нектара и варенья. Пробоподготовка напитков заключалась в простом центрифугировании (если объект содержал мякоть), а затем образец вводился в хроматографическую колонку.

В образцах хроматограмм присутствуют некоторые неизвестные пики, однако все пики хорошо разделены и их наличие не оказывает влияние на чистоту (разделение) пиков изучаемых компонентов – т.е. данный пик соответствует только одному компоненту (рис.3) [19].

Идентификация пика консерванта в образцах базируется на сравнении времени удерживания данного компонента в стандартном образце и как подтверждение – известная добавка компонента стандарта к образцу.

Для анализируемых компонентов корреляция между площадью пика и концентрацией консервантов описывается уравнением линейной регрессии с высоким значением коэффициента корреляции r . Предел детектирования был вычислен на основании стандартного отклонения сигнала (SD) и тангенса наклона калибровочной кривой (b) по формуле $3,3 \text{ SD}/b$ [19]. Все результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Линейность и предел детектирования для консервантов

Консерванты	Диапазон линейности, мг/л	Уравнение регрессии	R ²	LOD, мг/л
BA	10,4-104	$y = 42217 \cdot x + 37471$	0,999	0,13
SA	1,3-13,4	$y = 54569 \cdot x + 42507$	0,998	0,05

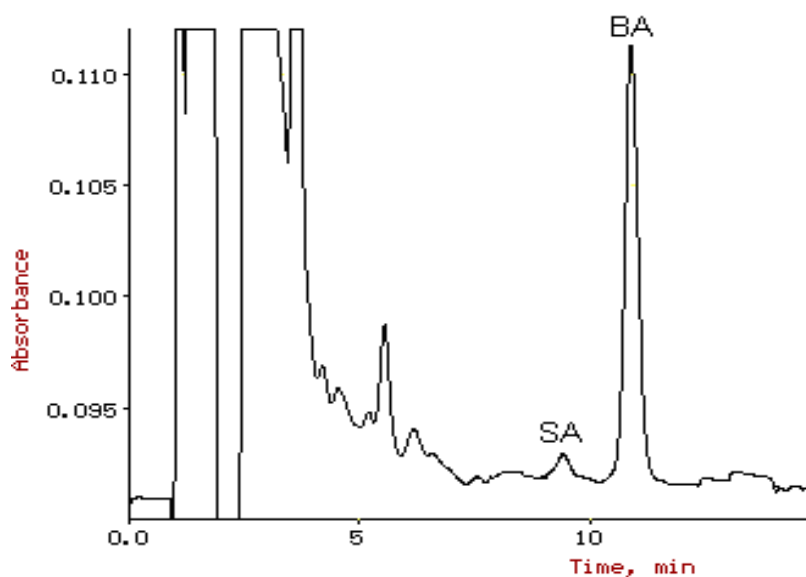


Рис. 3. Хроматограмма сока «Гранатового»

Для оценки правильности методики наиболее подходящим является метод добавок. С этой целью исследуется анализируемый образец реального объекта, в который вводят точные известные количества аналита. В процессе исследования принималось во внимание влияние эффекта различной матрицы образца, перенесенное на реальный объект, а именно: на время удерживания и площадь пика.

Воспроизводимость была определена вычитанием результата образца без добавки от такого же образца с добавкой. По предлагаемой методике с использованием внешнего стандарта (того же самого аналита) находится его содержание в исследуемом растворе. Результат, полученный с использованием метода добавок, должен совпадать с погрешностью, не превышающей погрешность методики [19].

Результаты обработки полученных данных представлены в таблице 3.

Таблица 3. Сравнение результатов, полученных по предлагаемой методике, на реальных объектах при использовании «метода вколотой пробы»

Объект	Степень извлечения (%) $\pm s^*$	
	BA	SA
сок «Гранатовый»	104,6 \pm 0,4	97,9 \pm 0,2
варенье из моршки	96,1 \pm 0,6	95,7 \pm 0,1

*- стандартное отклонение, вычисленное для 3 определений

Результат показывает хорошую воспроизводимость для всех аналитов в пределах 8%, таким образом подтверждая практическую эффективность методики.

По предложенной методике с использованием метода внешнего стандарта (градуировочные графики линейности для каждого компонента) были определены средние значения концентраций консервантов в реальных объектах и результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Анализ реальных образцов

образец	консер-т	С (мг/л)	образец	консер-т	С (мг/л)
сок виноградный	BA	13,1	варенье из морошки	BA	64,5
морс "Журавлинный"	BA	28,6		SA	12,5
сок фруктовый «ТАМТАН»	BA	92,3	сок яблочный	BA	14,0
	SA	4,5		SA	9,8
сок «Гранатовый»	BA	108,3	нектар «Гранатовый»	BA	-
	SA	7,3		SA	-

«-» - не обнаружено

На этикетках морсов, соков и варенья было указано, что они приготовлены из натуральных компонентов и не содержат консервантов, но как можно увидеть из таблицы 4 – это не совсем соответствует действительности.

Выводы и предложения. Предлагаемая методика одновременного определения бензойной и сорбиновой кислот отличается простой пробоподготовкой. Удовлетворительный результат показывает, что метод МЖХ является быстрым, точным, селективным, удобным и эффективным, обеспечивающим перспективу и пригодность скорого внедрения для контроля использования разрешенных консервантов.

Автор выражает благодарность, инженеру I категории испытательной лаборатории пищевой и сельскохозяйственной продукции ГП «Луганскстандартметрология» Ю.В. Панченко за помощь в проведении эксперимента.

Список использованных источников

- Berthod A. Micellar Liquid Chromatography / A. Berthod, M.C. Garcia-Alvarez-Coque. – New York: Marcel Dekker, 2000. — 632 p.
- Куликов А.Ю. Мицеллярная жидкостная хроматография в фармацевтическом анализе и других областях анализа (обзор) / А.Ю. Куликов, Л.П. Логинова, Л.В. Самохина // Фармаком. — 2004. — №1. — С. 22-52.
- Скурихин И.М. Все о пище с точки зрения химика: Справ. Издание / И.М. Скурихин, А.П. Нечаев. – М.: Высш. шк. 1991. — 288 с.
- Булдаков А. Пищевые добавки. Справочник / А. Булдаков. — Санкт-Петербург, «УТ», 1996. — 240 с.
- Pylypiw Jr. Harry M. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods / Harry M. Pylypiw Jr., Maureen T. Grether // J. Chromatogr. — 2011. — Vol. 883. — P. 299-304.
- Terada H. Studies on the analysis of food additives by high-performance liquid chromatography V. Simultaneous determination of preservatives and saccharin in foods by ion-pair chromatography / H. Terada, Y. Sakabe // J. Chromatogr. — 2005. — Vol. 346. — P. 333-340.
- Ganzera M. Development and Validation of an HPLC/UV/MS Method for Simultaneous Determination of 18 Preservatives in Grapefruit Seed Extract / M. Ganzera, A. Aberham, H. Stuppner // J. Agric. Food Chem. — 2006. — Vol. 54. — P. 3768-3772.
- Saad B. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography / B. Saad, M.F. Bari, M.I. Saleh, K. Ahmad, M.K.M. Talib // J. Chromatogr. A — 2005. — Vol. 1073. — P. 393-397.
- Dossi N. Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks / N. Dossi, R. Toniolo, S. Susmel, A. Pizzariello, G. Bontempelli // J. Chromatogr. — 2012. — Vol. 63. — P. 557-562.
- Hann J.T. Gradient liquid chromatographic method for the simultaneous determination of sweeteners, preservatives and colours in soft drinks / J.T. Hann, I.S. Gilkison // J Chromatogr. — 1987. — Vol. 395. — P. 317-322.

11. Ferreira I.M.P.L.V.O. Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC / I.M.P.L.V.O. Ferreira, E. Mendes, P. Brito, M.A. Ferreira // Food Research International. — 2000. — Vol. 33, № 2. — P. 113-117.
12. Gonzalez M. Gas chromatography flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods / Gonzalez M., Gallego M., Valcarcel M. // J.Chromatogr. — 1999. — Vol. 848. — P. 529-536.
13. Lili Wang. Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography / Lili Wang, Xiao Zhang, Yiping Wang, Wei Wang // Anal. Chim. Acta. — 2006. — Vol. 577. — P. 62-67.
14. Frazier R.A. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks / Frazier R.A., Inns E.L., Dossi N., Ames J.M., Nursten H.E. // J.Chromatogr. — 2000. — Vol. 876. — P. 213-220.
15. Bayce M.C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography / Bayce M.C. // J.Chromatogr. — 1999. — Vol. 847. — P. 369-375.
16. Memon N. Determination of preservatives in cosmetics and food samples by micellar liquid chromatography / N. Memon, M.I. Bhangar, M.Y. Khuhawer // J. Sep. Sci. — 2005. — Vol. 28. — P. 635-638.
17. Loginova L.P. MLC determination of preservatives in cranberry foodstuffs / Lidia P. Loginova, Artem U. Kulikov, Elena Y. Yakovleva, Alexander P. Boichenko // Chromatographia — 2008. — Vol. 67. — P. 615-620.
18. Advanced Chemistry Development, <http://www.acdlabs.com>
19. Представление результатов химического анализа (Рекомендации IUPAC 1994 г.) // Журн. анал. химии — 1998. — Т. 53, № 9. — С. 999-1008.

Надійшла до редколегії 10.03.2014.

О.Ю. Купчик ВИЗНАЧЕННЯ БЕНЗОЙНОЇ ТА СОРБІНОВОЇ КИСЛОТ В ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ МЕТОДОМ МІЦЕЛЯРНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Описано методику міцелярної рідинної хроматографії для розділення і визначення 2 речовин-консервантів: бензойної кислоти (ВА) та сорбінової кислоти (СА). При розробці відповідної методики підібрано склад гібридного міцелярного елюенту. Розділення ефективно при використанні рухомої фази складу 0,05 М додецилсульфату натрію (ДСН), 1% п-пентанолу, хлоридна кислота (рН≈3) на октадецилсилікагелі С18. Довжина хвилі детектування відповідає 240 нм. При виконанні умов розділення всіх компонентів можливе за 11 хвилин. Визначено аналітичні характеристики розділення, такі як: ліміт детектування, діапазон лінійності та відтворюваність. Правильність результатів підтверджено апробацією методики на різних продуктах харчування.

Ключові слова: міцелярна рідинна хроматографія МРХ, консерванти

E. Yu. Kupchik DETERMINATION OF BENZOIC AND SORBIC ACIDS IN FOODSTUFFS BY MICELLAR LIQUID CHROMATOGRAPHY

A MLC method that allows the separation and simultaneous determination of 2 preservatives: benzoic acid (BA) and sorbic acids (SA) is described. In developing an appropriate methodology was selected the hybrid micellar eluent. The separations were effected by using a mobile phase containing 0.05 M sodium dodecyl sulphate (SDS), 1% n-pentanol, chloric acid (pH≈3) with an octadecyl silica column C₁₈. The detector wavelength was set at 240 nm. Under these conditions, separation of the 2 components was achieved in less than 11 min. Analytical characteristics of the separation such as limit of detection, linear range and reproducibility were evaluated. The correctness of the results was confirmed by a number of techniques approbation of foods containing.

Keywords: micellar liquid chromatography (MLC), preservatives

Купчик Елена Юрьевна – канд.хим.наук, ассистент кафедры химии, Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г.Шевченко, г. Чернигов, Украина. E-mail: lenochka-lugansk@mail.ru.