

УДК 535.37:546.65:541.183

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСЕРВАНТА Е-210 В СОКАХ И БЕЗАЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКАХ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ливенцова Е.О., Бельтюкова С.В., Теслюк О.И. *

*Одесская национальная академия пищевых технологий, 65039, Одесса,
Канатная, 112, e-mail: liventsova_helen@mail.ru*

**Физико-химический институт им. А.В.Богатского НАН Украины, 65080, Одесса,
Люстдорфская дорога, 86 e-mail: olgateslyuk@rambler.ru*

Консерванты находят широкое применение в пищевой промышленности. Введение консервантов в сырье и готовую продукцию обеспечивает предупреждение их порчи, снижение потерь, увеличение сроков годности и выпуск высококачественных изделий, сохраняющих в течение длительного времени характерные особенности, свойственные свежим, полноценным продуктам. В качестве химических консервантов применяют только малотоксичные вещества, введение которых в пищевые продукты в строго регламентированных количествах не оказывает на организм человека нежелательного воздействия. Это в основном, сорбиновая, бензойная и дегидрацетовая кислоты, а также эфиры галловой кислоты [1]. В то же время избыточные количества любых химических консервантов могут привести к токсичности пищи, аллергическим реакциям, а также к дисбалансу активных химических веществ в организме. Введение избытка консервантов ухудшает качество продуктов вследствие изменения рН, консистенции вкуса, запаха, цвета и др. показателей. Недостаточные концентрации консервантов не обеспечивают сохранения высокого качества сырья и продукции. Консерванты поступают в

организм человека с пищей практически в течение всей жизни, поэтому особенно нежелательны негативные воздействия их избыточных количеств. Эти обстоятельства вызывают необходимость контроля содержания консервантов в различных видах пищевого сырья, готовых продуктах и напитках.

Консервант Е-210 (бензойную кислоту (БК)) используют в качестве консерванта для маргаринов, майонезов, хлебобулочных и кондитерских изделий, сыров, а также при консервировании фруктовых соков, предназначенных для дальнейшей переработки, фруктовых пульп, чистых фруктовых соков и напитков на их основе, вин.

Для определения БК предложены титриметрические, спектрофотометрические, фотометрические и хроматографические методы. Титриметрические методы позволяют определять высокие содержания БК (0,06 – 0,15 г/г) и не находят широкого применения [2]. Недостаточная избирательность спектрофотометрических методов также ограничивает их использование [3]. Наиболее широкое применение для определения БК получили хроматографические методы – тонкослойная

[4,5], газовая хроматография [6] и ВЭЖХ [7-9].

Метод тонкослойной хроматографии предусматривает выделение БК из пищевого продукта путем перегонки с водяным паром, либо путем экстракции соответствующим растворителем [4]. Качественное обнаружение БК на хроматографической пластинке проводят по проявлению темного пятна, либо путем получения окрашенного соединения непосредственно на пластинке [10]. При количественном определении БК элюируют с пластинки этилацетатом и определяют оптическую плотность элюата при $\lambda = 270$ нм [4].

Наиболее эффективны методы газовой хроматографии [6] и ВЭЖХ [7-9], однако они весьма дорогостоящие и не всегда доступны.

Целью данной работы являлась разработка методики определения бензойной кислоты в соках и безалкогольных напитках методом тонкослойной хроматографии с использованием в качестве проявляющего раствора хлорида европия (III), который обнаруживает сенсibilизированную люминесценцию в тонком слое сорбента в присутствии бензойной кислоты.

Аппаратура и техника эксперимента

Хлорид европия готовили растворением высокочистого оксида (99,988%) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением ее избытка упариванием. Концентрацию Eu(III) устанавливали комплексонометрическим титрованием. Раствор бензойной кислоты готовили растворением точной навески вещества в спирте этиловом (96%), раствор 1,10 – фенантролина готовили растворением точной навески вещества в дистиллированной воде с добавлением 1М раствора соляной кислоты до pH 5. Для хроматографирования использовали пластинки для ТСХ марки Sorbfil (сорбент силикагель СТХ-1ВЭ, связывающее вещество силиказоль, подложка – алюминиевая фольга). Люминесценцию возбуждали излучением ртутно-кварцевой лампы ДРШ-250 со светофильтром УФС-2. Спектры люминесценции регистрировали с

помощью спектрометра СДЛ-1 (ЛОМО, Ленинград). Спектры возбуждения люминесценции растворов записывали на спектрофлуориметре Cary Eclipse “Varian” (Австралия) с двойным источником света (ксеноновая лампа 150-W сплошного спектра и импульсная лампа), сорбатов комплексов – на спектрометре СДЛ-2. В этом случае источником возбуждения являлась ксеноновая лампа. Регистрация спектров возбуждения проводилась в области перехода $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ европия ($\lambda = 610-625$ нм). Спектры поглощения растворов реагентов регистрировали на спектрофотометре UV – 2401PC “Shimadzu” (Япония).

Результаты и их обсуждение

В спектре поглощения БК в этанольном растворе имеется полоса максимумом 225 нм и плечо 272 нм (рис. 1а). Относительно высокое значение молярного коэффициента светопоглощения ($1,2 \cdot 10^4$) обуславливает способность эффективно поглощать энергию возбуждения. Согласно теории [11] в этом случае возможна внутримолекулярная передача поглощенной молекулой энергии с лиганда на энергетический уровень лантанида, в результате чего происходит сенсibilизация люминесценции последнего. Однако люминесценция комплекса Eu(III) с БК в растворе не обнаруживается [12], что может быть связано с присутствием молекул воды, находящихся во внутренней координационной сфере иона лантанида и оказывающих тушающий эффект на аналитический сигнал.

Известно [11] что, введение молекул донорно-активных веществ ведет в ряде случаев к образованию разнолигандных комплексов, и вытеснению молекул воды из внутренней сферы комплекса, что соответственно уменьшает безызлучательные потери энергии возбуждения, благодаря чему интенсивность люминесценции возрастает. Кроме того, введение в молекулу комплекса таких донорно-активных веществ как 1, 10 – фенантролин (Фен) и 2,2’ – дипиридил (Дип) обеспечивает также возбуждение иона Ln^{3+} через полосы поглощения гетероциклических дииминов. Это приводит к увеличению яркости свечения аддуктов по сравнению с

солями. Длинноволновый край полосы, относящийся к молекулам Фен и Дип в спектре возбуждения иона Eu^{3+} лежит, соответственно при 350 и 325 нм [13]. Поэтому при возбуждении в диапазоне 250-350 нм интенсивность люминесценции аддукта значительно возрастает. В спектре поглощения 1,10-фенантролина в водном растворе имеются две полосы при $\lambda=226$ и 264 нм (рис.1) с молярными коэффициентами поглощения $4,5 \cdot 10^4$ и $3,1 \cdot 10^4$ соответственно. Часть энергии возбуждения, поглощенной молекулами гетероциклического диимина, из низшего возбужденного синглетного состояния через низшее возбужденное

триплетное состояние диимина (22100 см^{-1} для Фен) попадает на уровни иона Ln^{3+} , часть на нижний триплетный уровень ароматического карбоксилата – бензойной кислоты (21280 см^{-1}) и затем на ион Ln^{3+} . Увеличение яркости свечения аддукта Eu^{3+} с бензойной кислотой и 1,10 – фенантролином объясняется близостью энергий наиболее низких триплетных состояний карбоксилат-иона к энергии ${}^5\text{D}_2$ уровня иона Eu^{3+} ($\sim 21470 \text{ см}^{-1}$), что и обуславливает эффективную передачу энергии на ион Eu^{3+} с последующей безызлучательной дезактивацией на ${}^5\text{D}_1$ уровень (19000 см^{-1}) и затем на первый возбужденный уровень ${}^5\text{D}_0$ (17250 см^{-1}).

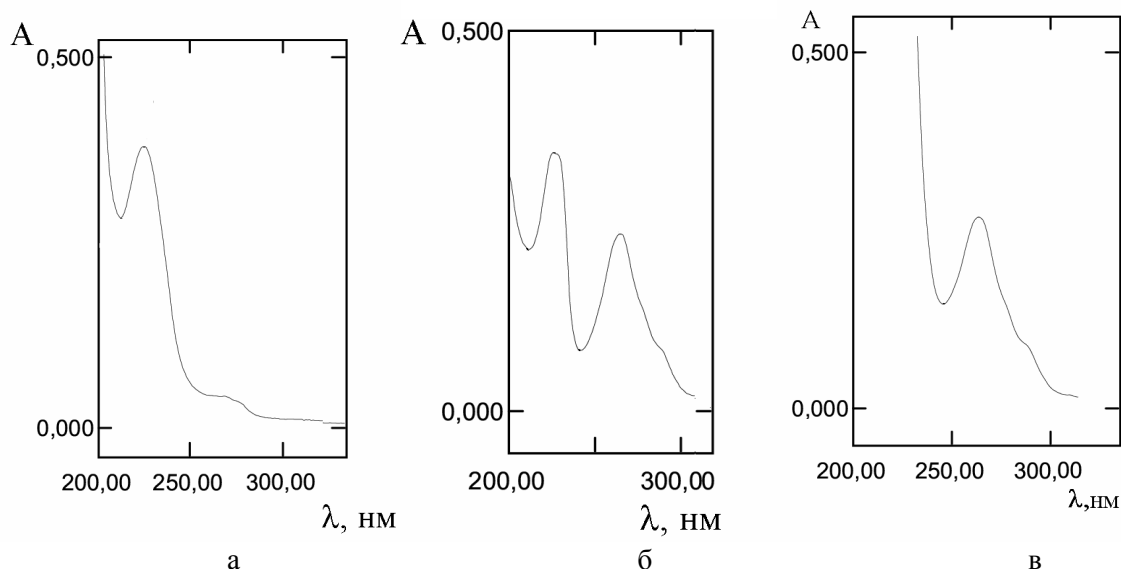


Рис.1 Спектры поглощения этанольного раствора бензойной кислоты – а; водного раствора 1, 10 – фенантролина – б; раствора разнолигандного комплекса – в. ($C_{\text{БК}} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $C_{\text{Фен}} = 8 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $C_{\text{Eu}} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.)

Интенсивность люминесценции ($I_{\text{люм}}$) комплекса значительно усиливается на сорбентах, в частности в тонком слое сорбента на пластинках для ТСХ. Это связано, очевидно, с увеличением жесткости комплекса, который образуется на поверхности сорбента и уменьшением в связи с этим безызлучательных потерь энергии возбуждения. Кроме того, спектры возбуждения сорбата комплекса смещены в более длинноволновую область по сравнению со спектрами возбуждения раствора комплекса (рис.2). Спектр возбуждения раствора комплекса

характеризуется наличием двух полос в области 250-340 нм с максимумами при $\lambda = 275$ и 295 нм. Для спектра возбуждения сорбата характерно значительное уширение по сравнению со спектром возбуждения в растворе и увеличение его по интенсивности. Это позволяет заключить, что рассматриваемые сорбаты будут поглощать энергию возбуждения в более широком спектральном диапазоне длин волн, чем растворы комплексов, и это может способствовать более эффективной трансформации УФ-излучения в видимое.

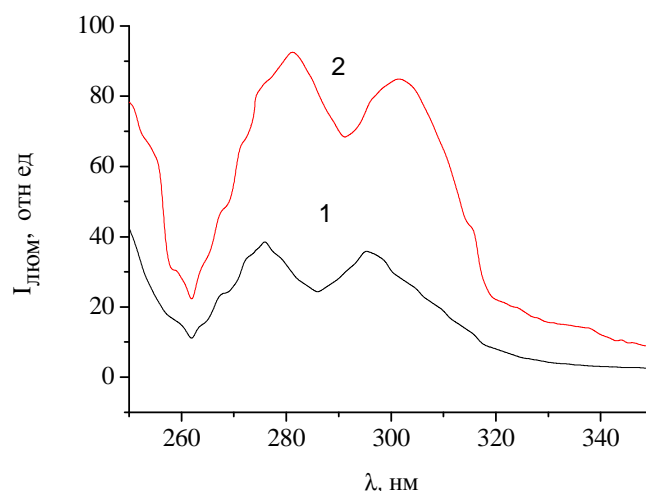


Рис.2 Спектр возбуждения раствора комплекса Eu (III) , бензойная кислота, Фен (1) и сорбата комплекса на пластинке для ТСХ (2).

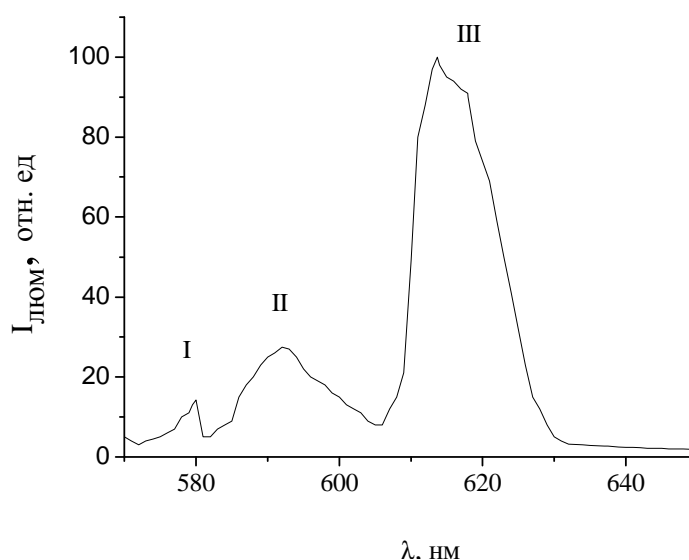


Рис. 3 Спектр люминесценции сорбата комплекса Eu-БК-Фен. Переходы $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ (I), $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (II), $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (III) ($C_{Eu} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

В спектре люминесценции сорбата комплекса наблюдаются полосы, соответствующие энергетическим переходам иона Eu(III): $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ (580 нм), $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (590 нм), $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (615 нм) (рис.3). Наиболее интенсивной в спектре является полоса, соответствующая электродипольному $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ переходу, что характерно для большинства люминесцирующих соединений европия. Следует так же отметить довольно высокую интенсивность магнитно-

дипольного перехода $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, интенсивность которого в 1,7 раза меньше интенсивности электродипольного перехода $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, несколько меньше интенсивность перехода $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$. Наблюдаемое распределение интенсивности в полосах люминесценции иона Eu(III) в разнолигандных комплексах с карбоксилат-ионами и ароматическими аминами (например, Фен или Дип) согласуется с данными работ [14,15], согласно которым

координация ароматических аминов приводит не только к увеличению квантового выхода люминесценции, но и к перераспределению интенсивностей и появлению ряда переходов с одного и того же люминесцентного уровня. Наблюдаемое перераспределение интенсивностей переходов, значительное возрастание интенсивности ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ перехода свидетельствует об увеличении асимметрии карбоксилата Eu(III) при координации ароматического амина [15] и указывает на низкую симметрию центров люминесценции.

С целью выбора оптимальных условий и режимов хроматографирования исследован ряд неподвижных фаз, различающихся по своим свойствам (Silufol, Sorbfil, CTX-1A). Наилучшим оказалось применение хроматографических пластинок марки Sorbfil, на которых изображение пятен БК было более четким и пригодным для количественного анализа.

Изучено несколько элюирующих систем (метанол : этанол : уксусная кислота, этанол : фосфорнокислый однозамещенный натрий : метанол; бензол : диоксан : уксусная кислота, бензол : ацетон : уксусная кислота и др.), в качестве оптимальной выбрана система толуол : ацетонитрил : метанол : муравьиная кислота в соотношении 15:5:1:1.

Установлен оптимальный объем пробы (в диапазоне 0,5–3 мкл), наносимый на пластинку. Наилучший результат достигался при нанесении 2 мкл раствора. При меньших или больших количествах пробы пятна на пластинке приобретают вытянутую форму.

Интенсивность люминесценции Eu(III) на пятне хроматограммы зависит от концентрации иона лантанида в проявляющем растворе. Наибольшая $I_{\text{люм}}$ обнаруживается при использовании хлорида Eu(III) с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л (табл. 1). При больших концентрациях наблюдается возрастание интенсивности “холостой пробы”.

Таблица 1

Зависимость интенсивности люминесценции европия (III) на хроматограмме от его концентрации в проявляющем растворе

$C_{\text{Eu(III)}}$, моль/л	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$
$I_{\text{люм}}$	10	30	60	80	100	70

Поскольку наибольшее значение интенсивности люминесценции комплекса Eu(III) с БК и Фен обнаруживается в нейтральных растворах при значениях pH 6,8–7,2, то проявление пластинки проводят в присутствии уротропина (4%-ного раствора).

Изучение зависимости интенсивности люминесценции сорбата от количества 1,10 – Фен в проявляющем растворе показало, что оптимальным является использование 0,05%–ного раствора.

На основании проведенных исследований разработана методика люминесцентного определения бензойной кислоты с использованием метода тонкослойной хроматографии.

Определение бензойной кислоты проводили в соках и напитках на их основе.

Методика выполнения анализа

Анализируемую пробу разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:10, затем наносят 2 мкл пробы микрошприцем на линию старта хроматографической пластинки. Параллельно на пластинку наносят стандартный раствор бензойной кислоты, содержащий $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ мг/л БК в зависимости от предполагаемого содержания БК в пробе. Пластинку подсушивают и помещают в хроматографическую камеру в подвижную фазу (смесь толуол: ацетонитрил: метанол: муравьиная кислота (15:5:1:1)). Когда фронт растворителя достигает высоты 70 мм, пластинку извлекают из камеры и отмечают положение фронта растворителя. Полученную хроматограмму высушивают и равномерно последовательно обрабатывают проявляющим раствором, содержащим

хлорида европия ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), 1, 10 – фенантролин (0,05%) и уротропин (4%). Идентификацию бензойной кислоты проводят по появлению красной люминесценции Eu(III) при облучении люминесцентной лампой со светофильтром УФС-2 ($\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм).

Количественное определение БК проводят по градуировочному графику, для построения которого поступают следующим образом. На пластинку наносят различные количества стандартного раствора БК и далее проводят хроматографирование и проявление хроматограммы, как описано выше. Затем из пластинки вырезают пятна с БК, помещают в кювету для твердых образцов и измеряют

интенсивность люминесценции при $\lambda = 612$ нм. По полученным данным $I_{\text{люм}}$ Eu(III) – концентрация БК строят градуировочный график, по которому определяют содержание БК в анализируемой пробе. Предел обнаружения для БК составляет 0,012 мкг/мл. Точность и достоверность определения БК проверена методом статистической обработки результатов анализа. При $n=5$, $P=0,95$ величина относительного стандартного отклонения S_r составляет 0,45 – 0,80.

Результаты определения БК и проверка правильности полученных результатов методом добавок приведены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты определения бензойной кислоты в яблочном соке и безалкогольных напитках
($n = 5$; $P = 0,95$)

Объект анализа	Введено мг/мл	Найдено в пробе с добавкой мг/мл	Найдено в пробе мг/мл	$S_r, \%$
1	2	3	4	5
Сок яблочный производитель ТМ «Jaffa»	0,1	0,159±0,016	0,059	5,8
-	0,2	0,260±0,030	0,060	4,6
Персиковый нектар производитель ТМ «Rich»	0,1	0,165±0,011	0,065	6,0
-	0,2	0,260±0,023	0,060	4,5
Безалкогольный напиток «Живчик» производитель ЗАТ «Оболонь»	0,1	0,907±0,084	0,807	6,1
-	0,2	1,005±0,102	0,805	4,8
Напиток «Ice tea» производитель ТМ «Семерка»	0,1	0,398±0,036	0,298	7,7
-	0,2	0,501±0,059	0,301	6,2
Вода фруктовая «Ананас» производитель ТМ «Биола»	0,1	0,701±0,072	0,601	8,0
-	0,2	0,812±0,056	0,612	6,8

Полученные результаты показывают хорошую воспроизводимость и правильность разработанной методики.

Литература

1. Люк Э., Ягер М. Консерванты в пищевой промышленности. Свойства и применение. – Санкт-Петербург: ГНОРД, 1998. – 256 с.

2. Отраслевой стандарт 7846–73 “Ароматические кислоты”
3. Костюковский Я.Л., Меламед Д.Б. Методы определения химических консервантов и антиоксидантов в пищевых продуктах // Журн.аналит.химии. – 1989. – 44. – С.5–44.
4. Руководство по методам анализа качества пищевых продуктов. / Под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. – М.:Брандес, Медицина, 1998.– с.330.
5. Беляева Л.Ю., Прохорова А.Ф., Беклемишев М.К. Определение бензоат-иона методом бумажной хроматографии с детектированием по ингибирующему действию в реакции фотосенсибилизированного автоокисления пирогаллола А // Журн.аналит.химии. – 2010. – Т.65, № 1. – С. 66–72.
6. Dong Ch., Wang W. Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acid in beverages // Anal. Chim. acta. – 2006. – V. 562. – P.23–29.
7. Techakriengkrai I., Surakarnkul R. Analysis of benzoic acid and sorbic acid in Thai wines and distillates by solid-phase sorbent extraction and performance liquid chromatography // J. Food Composition and Analysis – 2007. – V. 20. – P. 220–225.
8. Saad B., Bari Md., Saleh M. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography // J. Chromatography A. – 2005. – V. 1037. – P. 393–397.
9. Дулина Е., Литинская В. Определение консервантов в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Вісник Харків. нац. ун-ту. – 2005. – Вип 13(36), № 669. – С. 134–138.
10. Кабардин С.А., Макаров К.Л. Тонкослойная хроматография в органической химии. – М.: Химия, 1978. – с. 48.
11. Полуэктов Н.С., Кононенко Л.И., Ефрюшина Н.П., Бельтюкова С.В. Спектрофотометрические и люминесцентные методы определения лантанидов. – Киев: Наукова Думка. – 1989. – 256 с.
12. Kallistratos G. Fluorescent properties of aromatic complex with rare earths and other elements of the IIIa-group // Chimica Chronica. New Series. 1982. – V. 11, P. 249–266.
13. Царюк В.И., Журавлев К.П., Золин В.Ф., Кудряшова В.А., Легендзевич Я., Шостак Р. Эффективность люминесценции ароматических карбоксилатов европия и тербия при наличии метиленовых мостиков и нитрогрупп в лигандах // Журн. прикл. спектроскопии. – 2007. – Т.74, № 1. – С. 48–54.
14. Калиновская Н.В., Задорожная А.Н., Николаенко Ю.М., Карасев В.Е. Флуоресцентные свойства разнолигандных карбоксилатов европия // Журн. неорган. химии. – 2006. – Т.51, №3. – С.505-509.
15. Гайдук М.Н., Золин В.Ф., Гайгерова Л.С. Спектры люминесценции европия. – Из-во «Наука», 1974. – 194 с.

DETERMINATION OF PRESERVATIVES E 210 IN JUICE AND SOFT DRINKS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY METHOD

Liventsova E.O., Beltyukova S.V., Teslyuk O.I.

The possibility of the determination of preservatives E 210 (benzoic acid (BA)) in juice and soft drinks by thin-layer chromatography method was investigated. The simple and reliable method of the quantitative determination of BA by thin-layer chromatography method in juice and soft drinks was developed. The europium chloride (III) in presence 1,10-phenanthroline was proposed as an enhanced solution, that provokes lanthanide-sensitized luminescence at BA presence on the chromatography plate.