

РОЗДІЛ I

Аналітична хімія

УДК 543.544:544.77.051.62:664.8.03

Олена Купчик

Визначення консервантів у продуктах харчування методом міцелярної рідинної хроматографії

Описано методику міцелярної рідинної хроматографії для розділення і визначення *n*-гідроксибензойної кислоти, метил-, етил-, пропіл- та бутілпарабенів. Розділення ефективне при використанні рухомої фази: додецилсульфат натрію ($c = 0,05$ моль/л), 1-бутанол ($\varphi = 3$ %), хлоридна кислота ($\text{pH} \approx 3$) на октадецил-силікагелі при 254 нм за 23 хвилини.

Ключові слова: міцелярна рідинна хроматографія, консерванти, парабени.

Постановка наукової проблеми та її значення. Сучасне виробництво продуктів харчування, косметичних, парфюмерних засобів і фармацевтичних препаратів засновано на широкому застосуванні консервантів і антимікробних речовин. У 1923 р. Т. Сабличка запропонував використати як консерванти складні ефіри *n*-гідроксибензойної кислоти – парабени [3].

У харчовій промисловості парабени зашифровані в кодах харчових добавок: Е 218 – це метилпарабен, Е 214 – етилпарабен, Е 216 – пропілпарабен. Е 218 дозволений практично в усіх країнах, окрім Росії, для консервації багатьох продуктів. У харчовій промисловості Е 214 застосовується дуже рідко, оскільки змінює смак продукту і є сильним алергеном. За допомогою наукових досліджень виявлено шкідливий вплив Е 216 на організм, тому цей консервант заборонений у багатьох країнах, в Україні й Росії включно, оскільки він дуже небезпечний. Парабени не винахід учених, це природні речовини, які містяться в різних рослинах. Так, наприклад, метилпарабен, що виступає протимікробним агентом, виявлений в лохині. Зазвичай синтетичні парабени застосовуються в продукції з високим вмістом водної фази. Метилпарабен, етилпарабен, пропілпарабен додають в хліб, олію, торти, тістечка й інші кондитерські вироби. Їх заковдані назви можна виявити на етикетках рибних консервів, майонезів, соусів, кетчупів [2].

Ефективність парабенів як консервантів пояснюється їх бактерицидними і фунгіцидними властивостями. Спектр дії кожного парабена має свої особливості. Наприклад, метилпарабен краще пригнічує зростання плісневих грибів, а пропілпарабен – дріжджових. Окрім цього, парабени мають слабку естрогенну активність, значно слабшу, ніж активність різних фітоестрогенів, що містяться у продуктах.

Тобто парабени характеризуються низькою токсичністю, ефективністю в широкому діапазоні рН, не мають специфічного запаху, кольору і смаку, не змінюють органолептичних властивостей продукції, в яку вводяться. Не мутагени. Парабени високоефективні щодо плісневих і дріжджоподібних грибів і малоактивні щодо бактерій, тому їх украй рідко використовують як самостійні консерванти. Їх доцільно комбінувати один з одним і з консервантами, що мають високу антибактеріальну активність [1; 7].

У харчових продуктах вміст парабенів коливається від 0,04 до 0,1 %. При концентрації понад 0,1 % парабени чинять локальну анестезувальну і спазмолітичну дію [5]. Їх концентрація розраховується на кілограм маси тіла – так, щоб вміст парабенів був менше 10 мг на 1 кг з розрахунку норм споживання їжі [2].

Для контролю вмісту парабенів у продуктах харчування запропоновано такі методи: високо-ефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [12; 14; 15; 20; 22; 23], газова хроматографія [13; 21],

електрокінетична хроматографія [9], мікроемulsionна електрокінетична хроматографія [16], капілярний електрофорез [11].

Міцелярна рідинна хроматографія (МРХ) є різновидом обернено фазової рідинної хроматографії (ОФ ВЕРХ). Як рухливу фазу в МРХ застосовують водні розчини поверхнево активних речовин (ПАР) з концентрацією вище критичної концентрації міцелоутворення, що містять невеликі добавки органічних розчинників, зазвичай, аліфатичних спиртів [10]. Наявність дифільних мікроагрегатів в рухливій фазі і динамічна модифікація стаціонарної фази створюють в МРХ нові можливості розділення. Не застосовуючи градієнтне елюювання, в умовах МРХ вдається водночас розділяти суміші гідрофобних і гідрофільних, іонних та неіонних аналітів [4; 10]. Додаткові цікаві властивості виникають при використанні МРХ для аналізу рослинних матеріалів, біологічних зразків та інших об'єктів, що містять речовини, малорозчинні у воді. Пробопідготовка таких об'єктів аналізу істотно спрощується, оскільки рухлива фаза міцели може використовуватися безпосередньо для розчинення проби і вилучення визначуваних компонентів завдяки солюбілізувальній дії міцел ПАР [4].

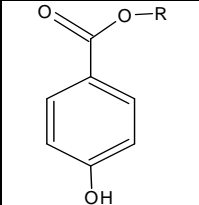
Використання методу МРХ на основі аніонної ПАР додецилсульфату натрію (ДСН) запропоновано для аналізу косметичній продукції (УФ-фільтрів і 4 консервантів: метил-, етил-, пропіл-, і бутилпарабенів), а також 14 консервантів у продуктах харчування [18; 19; 24]. На основі неіонної ПАР Brij-35 описано застосування МРХ для визначення бензойної кислоти, 4-гідроксибензойної кислоти, метил-, етил-, пропіл-, ізопропіл- і бутилпарабенів в косметичній продукції (шампуні, лосьйони для рук, крему) і продуктах харчування [17].

Мета роботи – розвиток можливостей застосування МРХ для розділення й одночасного визначення консервантів (п-гідроксибензойної кислоти і парабенів) у харчових продуктах.

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. З уже вивченого асортименту консервантів [12; 18; 20] вибрано 5 сполук. У роботі використовувалися *n*-гідроксибензойна кислота і її ефіри : метиловий, етиловий, пропіловий і бутиловий виробництва Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Формули речовин показані в таблиці 1.

Таблиця 1

Графічні формули консервантів і їх кислотна характеристика

	R	-H	п-Гідроксибензойна кислота, ПГБК (1)	pK _a [23]	4,57 ± 0,10
		-CH ₃	Метилпарабен, МП (2)		9,22 ± 0,13
		-C ₂ H ₅	Етилпарабен, ЕП (3)		8,31 ± 0,13
		-C ₃ H ₇	Пропілпарабен, ПП (4)		8,31 ± 0,13
		-C ₄ H ₉	Бутилпарабен, БП (5)		8,23 ± 0,15
					8,22 ± 0,15

Для приготування рухливих фаз використовувалися додецилсульфат натрію, хлороводнева кислота, 1-пентанол, 1-бутанол, 1-пропанол, метанол виробництва Fluka Chemie. Розчини готували на бідистильованій воді.

Початковий розчин 0,2 моль/л ДСН готували розчиненням наважки додецилсульфату натрію у бідистильованій воді і фільтрували на скляному фільтрі ПОР 16 під вакуумом. Міцелярні рухомі фази готували розведенням початкового розчину ДСН.

Для приготування початкового розчину точно зважені наважки речовин помістили в мірну колбу ємкістю 50 мл і розчиняли в метанолі. Концентрації речовин в початковому розчині становили: 0,54 г/л ПГБК; 0,50 г/л МП; 0,83 г/л ЕП; 1,03 г/л ПП; 1,55 г/л БП. Робочі розчини суміші консервантів готували розведенням 1 мл початкового розчину в 100 разів відповідною рухомою фазою.

Хроматографування проводили на приладі ProStar (Varian, Нідерланди), що складається з насоса ProStar 210, детектора флуоресцентного ProStar 363 і діодної матриці ProStar 335. Розділення компонентів проводили на обернено фазовій колонці 250 mm × 4,6 mm Microsorb 100 C 18 з розміром частинок 5 μm. Температура колонки відповідала 40,0 ± 0,1 °C упродовж усього аналізу. Об'єм проби відповідав 20 мкл. рН рухомої фази контролювали рН-метром Beckman Ф50, який заздалегідь калібрували по стандартних буферних розчинах зі значенням рН 3,56 і 4,01.

Результати та їх обговорення. Щоб визначитися з довжиною хвилі детектування, ми зняли індивідуальні ІЧ-спектри речовин, наважки яких розчиняли в метанолі. На рис. 1 представлено спектри усіх досліджуваних речовин.

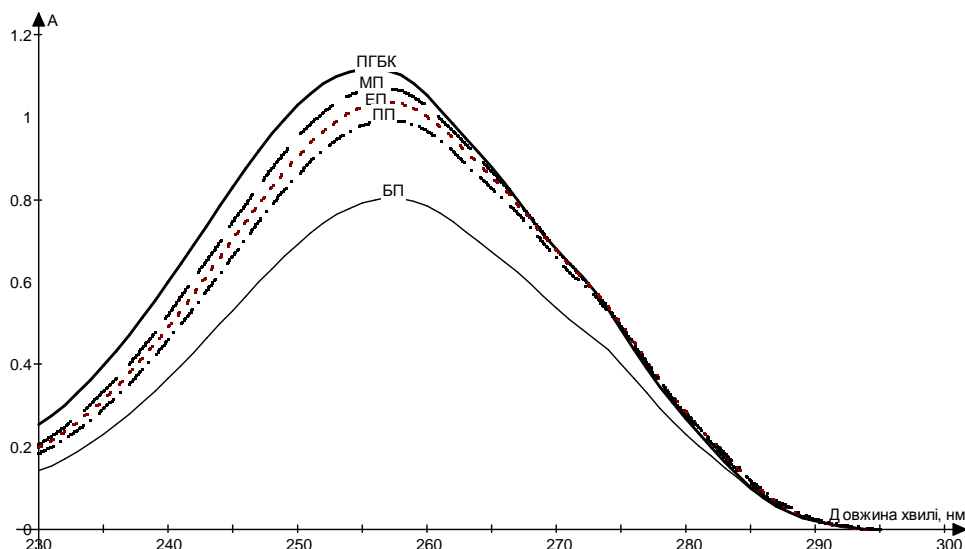


Рис. 1. Індивідуальні ІЧ-спектри консервантів, г/л: ПГБК – 0,54; МП – 0,51; ЕП – 0,83; ПП – 1,56; БП – 1,03

З рисунка 1 видно, що п-гідроксибензойна кислота і її ефіри мають максимум поглинання у ділянці 254 нм – таким способом ми вибрали довжину хвилі детектування.

Щоб визначитися зі складом елюента, ми випробували три варіанти міцелярних рухомих фаз, при цьому концентрація ПАР залишалася незмінною. Як органічний модифікатор, що підвищує селективність розділення, використовують в основному органічні спирти: 1-пропанол ($\phi = 6\%$), 1-бутанол ($\phi = 3\%$) та 1-пентанол ($\phi = 1\%$). Для створення певного значення рН близько 3,5, щоб усі компоненти, що розділяються, містилися тільки в протонній формі, використано хлорводневу кислоту.

Краще розділення отримане при використанні ДСН ($c = 0,05$ моль/л), $pH \approx 3$ ($V_{HCl} = 1$ мл), і як добавка до рухомої фази 1-бутанол ($\phi = 3\%$), який приводить до поліпшення форми піку і скорочує час утримування. Елюювання і розділення суміші з п'яти компонентів досягається за 23 хв (рис. 2).

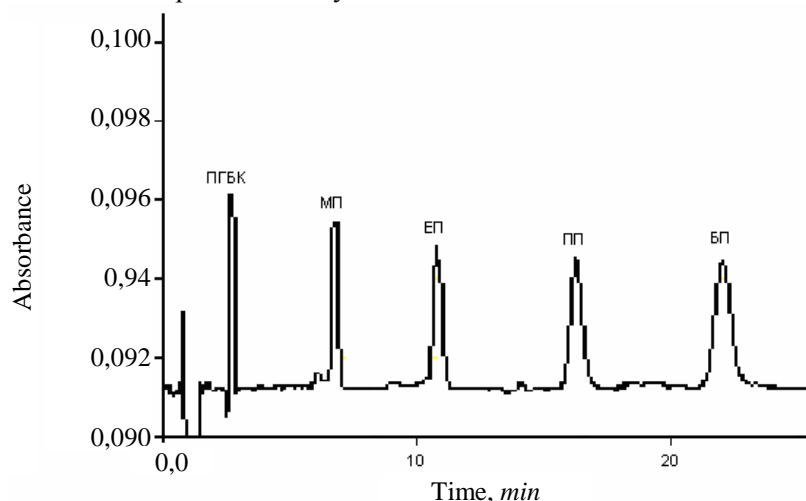


Рис. 2. Хроматограма стандартної суміші консервантів

Лінійну кореляцію між площею піку і концентрацією проводили для кожного компонента. Визначено і проаналізовано значення для семи розчинів з різною концентрацією компонентів. Кожен розчин уколуювали 3-4 рази. Використовуючи метод найменших квадратів, обчислено нахил прямої, що проходить через точки, і коефіцієнт кореляції (r). Межу детектування (LOD) і межу кількісного визначення (LOQ) визначено на підставі стандартного відхилення сигналу (SD) і тангенса нахилу калібрувальної кривої (b) по формулах: $3,3 SD/b$ і $10 SD/b$, відповідно [6]. Усі результати представлено в таблиці 2.

Аналітичні характеристики методу МРХ

Параметр	Консервант				
	ПГБК	МП	ЕП	ПП	БП
Діапазон лінійності (мг/л)	0,53–26,79	0,51–25,33	0,83–41,46	1,02–51,27	1,56–78,18
r^2	0,999	0,998	0,998	0,999	0,996
LOD (мг/л)	1,65	1,95	3,23	3,79	6,53
LOQ (мг/л)	5,02	5,91	9,78	11,49	19,80

Вибір об'єктів для аналізу, куплених в супермаркетах міста, ґрунтований на продукції, що містить журавлину і лохину, оскільки сама ягода журавлини містить у собі вже бензойну кислоту – один із консервантів, а лохина – метилпарабен, крім того враховувався склад, вказаний на етикетках. Набір об'єктів складався з журавлинного морсу, журавлини на коньяку, соєвого соусу, а також свіжих ягід лохини. Пробопідготовка зразків полягала в простому центрифугуванні (якщо об'єкт містив м'якуш), а потім зразок вводився у хроматографічну колонку. Ідентифікація піку консерванта в зразках заснована на порівнянні часу утримування цього компонента в стандартному зразку і як підтвердження – відома добавка компонента стандарту до зразка (рис. 3). У процесі дослідження брався до уваги вплив ефекту різної матриці зразка перенесеного на реальний об'єкт, а саме: на час утримування і площу піку.

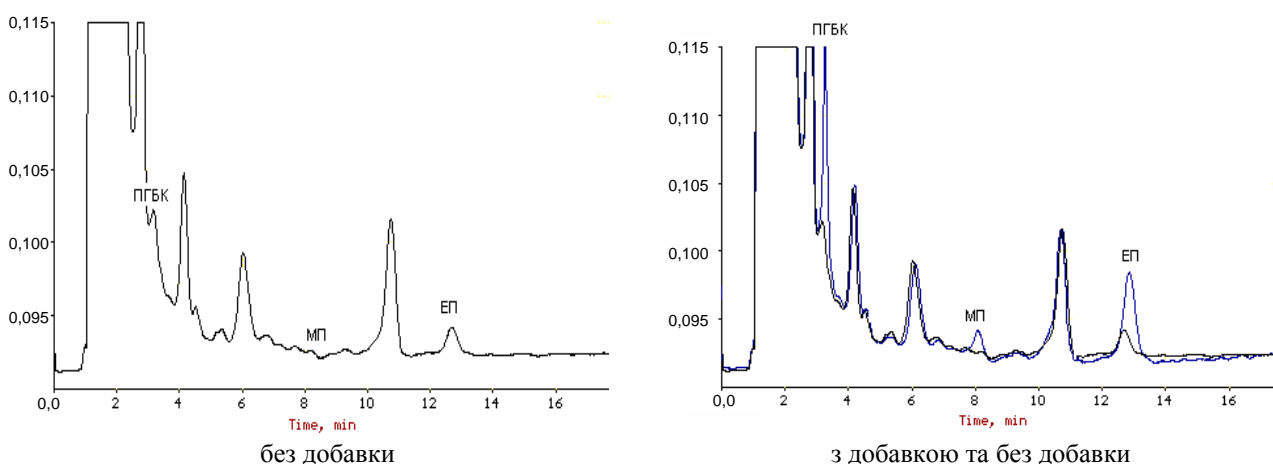


Рис. 3. Хроматограма досліджуваного зразка морсу

Відтворюваність (табл. 3) визначено відніманням результату зразка без добавки від такого самого зразка з добавкою. Результат, отриманий з використанням методу добавок, має збігатися з похибкою, що не перевищує похибку методики [6].

Таблиця 3

Результати відтворюваності уколеного стандарту в різні зразки

Зразок харчовий	Відтворюваність (%)				
	ПГБК	МП	ЕП	ПП	БП
Ягоди лохини (сік-фреш)	96,3	101,0	95,0	98,0	97,5
Журавлина на коньяку 1	100,9	95,0	97,0	97,7	96,8
Журавлина на коньяку 2	99,5	93,3	97,4	98,7	95,9
Журавлина на коньяку 3	100,5	99,8	97,7	98,3	95,3
Морс 1	95,5	97,5	96,0	104,0	108,0
Морс 2	95,2	98,3	96,0	100,8	104,3
Морс 3	95,8	98,0	96,3	101,5	106,4
Соус	96,6	96,0	94,0	103,0	95,3

У жодному зі зразків не знайдено бутилпарабену. Метилпарабен виявлено в сокові-фрешеві зі свіжих ягід лохини (18,09 мг/л), етилпарабен – у журавлині на коньяку (1,06 мг/л), соусі (15,47 мг/л) і морсі (4,19; 3,56; 3,77 мг/л), пропілпарабен – у соусі (4,75 мг/л), а п-гідроксибензойна кислота – у фруктовому морсі (0,62 мг/л). Проте вміст парабенів в продуктах харчування не регламентується нормативними документами України.

Висновки та перспективи подальшого дослідження. Заропонована методика одночасного визначення п-гідроксибензойної кислоти і парабенів відрізняється простою пробою підготовкою. Представлена аналітична процедура для розділення і визначення п'яти консервантів з використанням методу мицелярної рідинної хроматографії на стаціонарній фазі – октадецилсиликагелі і детектуванням в ІЧ-області спектру (254 нм). Елюент містив ДСН з концентрацією 0,05 моль/л, рН-підтримувальний компонент HCl і як модифікатор – 1-бутанол з об'ємною часткою 3 %. Можливість застосування методу для визначення п-гідроксибензойної кислоти і її ефірів перевірено під час аналізу продуктів харчування із супермаркету. Концентрація консервантів в реальних продуктах знайдена в межах від тієї, що не детектується до 18 мг/л. Задовільний результат показує, що метод швидкий, точний, селективний, зручний та ефективний, такий, що забезпечує перспективу і придатність швидкого упровадження для контролю використання дозволених консервантів.

Автор висловлює вдячність інженерові I категорії випробувальної лабораторії харчової і сільськогосподарської продукції ГП «Луганськстандартметрологія» Ю. В. Панченко за допомогу в проведенні експерименту.

Джерела та література

1. Булдаков А. Пищевые добавки : справочник / А. Булдаков. – СПб. : УТ, 1996. – 240 с.
2. Виноградова И. Парабены: правда и вымысел / И. Виноградова // Season of Beauty. – 2010. – № 4 (57). – С. 32–35.
3. Контроль содержания п-гидроксибензойной кислоты и парабенов в косметических средствах методом мицелярной тонкослойной хроматографии / Л. П. Логинова, Д. В. Едаменко, А. Ю. Куликов, А. Н. Лавриненко // Вісн. ХНУ. Сер. : Хімія. – 2006. – № 731. – Вип. 14 (37). – С. 127–134.
4. Куликов А. Ю. Мицелярная 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.
5. Люк Э. Консерванты в пищевой промышленности : пер. с нем. / Э. Люк, М. Ягер. – 3-е изд. – СПб. : ГИОРД, 1998. – 256 с.
6. Представление результатов химического анализа (рекомендации IUPAC 1994 г.) // Журн. анал. химии. – 1998. – Т. 53, № 9. – С. 999–1008.
7. Скурихин И. М. Все о пище с точки зрения химика : справ. изд. / И. М. Скурихин, А. П. Нечаев. – М. : Высш. шк. 1991. – 288 с.
8. Advanced Chemistry Development [Electronic resource]. – Access mode : <http://www.acdlabs.com>
9. Bayce M. C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography / M. C. Bayce // J. Chromatogr. – 1999. – Vol. 847. – P. 369–375.
10. Berthod A. Micellar Liquid Chromatography / A. Berthod, M. C. Garcia-Alvarez-Coque. – New York : Marcel Dekker, 2000. – 632 p.
11. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks / R. A. Frazier, E. L. Inns, N. Dossi et al. // J. Chromatogr. – 2000. – Vol. 876. – P. 213–220.
12. 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.
13. Gonzalez M. Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods / M. Gonzalez, M. Gallego, M. Valcarcel // J. Chromatogr. – 1999. – Vol. 848. – P. 529–536.
14. 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.
15. Leuenberger U. Determination of food preservatives and saccharin by high-performance liquid chromatography / U. Leuenberger, R. Gauch, E. Baumgartner // J. Chromatogr. – 1979. – Vol. 173. – P. 343–348.
16. Mahuzier P. E. Selective and quantitative analysis of 4-hydroxybenzoate preservatives by microemulsion electrokinetic chromatography / P. E. Mahuzier, K. D. Altria, B. J. Clark // J. Chromatogr. A. – 2001. – Vol. 924. – P. 465–470.

17. 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.
18. MLC determination of preservatives in cranberry foodstuffs / L. P. Loginova, A. U. Kulikov, E. Y. Yakovleva, A. P. Boichenko // Chromatographia. – 2008. – Vol. 67. – P. 615–620.
19. Noguera-Orti J. F. Determination of Parabens in Cosmetics without Previous Extraction by Micellar Liquid Chromatography / J. F. Noguera-Orti, R.M. Villanueva-Camanas, G. Ramis-Ramos // J. Chromatogr. Sci. – 1999. – Vol. 37. – P. 83–87.
20. 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 et al. // J. Chromatogr. A – 2005. – Vol. 1073. – P. 393–397.
21. 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.
22. Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks / N. Dossi, R. Toniolo, S. Susmel et al. // J. Chromatogr. – 2006. – Vol. 63. – P. 557–562.
23. 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.
24. Tomasella F. P. Determination of sun-screen agents in cosmetic products by micellar liquid chromatography / F. P. Tomasella, P. Zuting, L. J. Cline Love // J. Chromatogr. – 1991. – Vol. 587. – P. 325–328.

Купчик Елена. Определение консервантов в продуктах питания методом мицеллярной жидкостной хроматографии. Описана методика мицеллярной жидкостной хроматографии для разделения и определения 5 веществ-консервантов: *n*-гидроксibenзойной кислоты (ПГБК), метилпарабена (МП), этилпарабена (ЭП), пропилпарабена (ПП) и бутилпарабена (БП). В ходе разработки соответствующей методики подобран состав гибридного мицеллярного элюента. Разделение эффективно при использовании подвижной фазы, состоящей из 0,05 М додецилсульфата натрия (ДСН), 3 % (v/v) *n*-бутанола, хлоридной кислоты (pH ≈ 3) на октадецил-силикагеле C₁₈. Длина волны детектирования соответствует 254 нм. При соблюдении условий разделение всех компонентов возможно за 23 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, парабены.

Kupchik Elena. Determination of Preservatives in Foodstuffs by Micellar Liquid Chromatography. A MLC method that allows the separation and simultaneous determination of 5 preservatives: *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA), methyl-(MP), ethyl-(EP), propyl-(PP) and butylparabens (BP) 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), 3 % (v/v) *n*-butanol, chloric acid (pH ≈ 3) with an octadecyl silica column C₁₈. The detector wavelength was set at 254 nm. Under these conditions, separation of the 5 components was achieved in less than 23 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.

Key words: micellar liquid chromatography (MLC), preservatives, parabens.

Чернігівський національний педагогічний університет
імені Тараса Шевченка

Стаття надійшла до редколегії
22.09.2014 р.

УДК 543.422.3

**Жолт Кормош
Наталя Зубеня**

Потенціометричні сенсори для визначення граміну

Створено грамін-селективний сенсор, що містить як електродо-активну речовину іонний асоціат граміну із бромфеноловим синім, тетрафенілборатом, тетраїодостибіатом і тетраїодобісмутатом. Робочий інтервал