

JAN WOŹNIAK, ANDRZEJ TOKARZ

OZNACZANIE DWUFENYLU W OWOCACH CYTRUSOWYCH ZA POMOCĄ CHROMATOGRAPHII GAZOWEJ

Z Samodzielnej Pracowni Unikalnych Metod Analitycznych
Instytutu Biofarmacji Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik: dr hab. J. Woźniak

Oznaczono zawartość dwufenylu w skórkach i miąższu owoców cytrusowych. Stwierdzono, że stosowana metoda ekstrakcji i analizy chromatograficznej pozwala wykryć 0,3 µg dwufenylu w 1 cm³ ekstraktu.

Dwufenyl przedstawia pewien problem od czasu kiedy został zastosowany jako środek grzybobójczy hamujący wzrost pleśni powodujących gnicie owoców cytrusowych [11]. Z nasyconych nim bibulek, w które zawija się owoce, dwufenyl przenika do skórki owocu i w konsekwencji częściowo do miąższu. Łatwo więc dwufenyl trafia do ustroju człowieka. Kumulacja tego związku jest szczególnie duża u dzieci i ludzi chorych spożywających znaczne ilości tych owoców. Przyjęto, że dzienna nieszkodliwa dla człowieka dawka wynosi 50 mg [10].

Zagadnienie ilościowego oznaczania dwufenylu w owocach zwłaszcza cytrusowych istnieje od chwili zastosowania dwufenylu jako środka fungistatycznego. Opracowane metody kolorymetryczne polegają na przeprowadzeniu dwufenylu w związek o niebieskiej barwie w reakcji z kwasem siarkowym, formaldehydem i jonami żelazowymi lub w reakcji ze świeżo sublimowanym chlorkiem glinu. Barwę purpurową uzyskano kolejno przez nitrowanie, redukcję i sprzęganie z N-1 naftyloetylenodwumainą [9, 14, 2]. Instrumentalne metody oznaczania dwufenylu wykorzystują fotometrię [12], spektrofotometrię w ultrafiolecie przy długości fali 248 nm [1, 3, 5, 15, 4], spektrofotometrię w podczerwieni o paśmie absorpcji 14,3 µ [6, 8], chromatografię gazową z kolumną o dł. 1,8 m, olejem silikonowym jako fazą stacjonarną i detektorem argonowym [13]. Stosowano również chromatografię bibulową [7].

Celem niniejszej pracy było opracowanie możliwie szybkiej metody, która z dopuszczalnymi błędami oznaczeń mogłaby być wykorzystana w oznaczeniach rutynowych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał

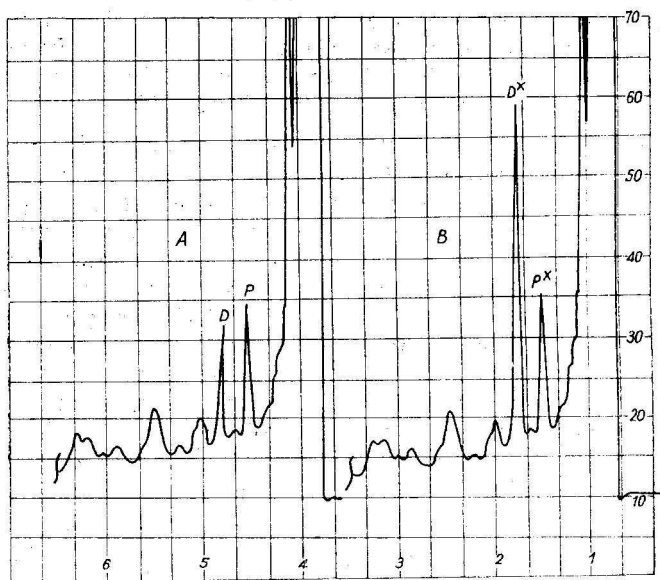
Materiałem badanym były cytryny, pomarańcze, grapefruity i sok pomarańczowy w puszkach znajdujących się na rynku wewnętrznym. Dwufenyl oznaczano oddzielnie w skórkach i miąższu owoców. Do wykreślenia krzywej wzorcowej ujm-

jącej zależność między stężeniem dwufenylu a powierzchnią odpowiadających mu pików przygotowano następujące roztwory dwufenylu w cykloheksanie: 0,312; 0,625 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Aparatura i urządzenia

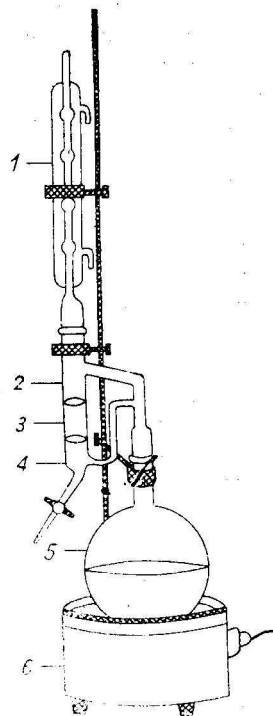
Oznaczenie dwufenylu wykonano za pomocą chromatografu gazowego Pye-Unicam seria 104. Użyto spiralną, szklaną kolumnę długości 2,7 m o średnicy wewnętrznej 4 mm, wypełnioną 3% silikonem OV-17 osadzoną na Gas-Chrom Q 80/100 mesh (Applied Science Lab.). Kolumnę kondycjonowano w temp. 250° przez 48 godz. Temperatura rozdziału wynosiła 160°. Gazem nośnym był argon przepływający przez kolumnę z szybkością 45 cm^3/min . Opuszczający kolumnę dwufenyl rejestrowano za pomocą detektora płomieniowo-jonizacyjnego, przy czym szybkość przepływu wodoru wynosiła 45 cm^3/min , zaś powietrza 450 cm^3/min . Temperaturę detektora ustalono na poziomie 170°. Próbkę o pojemności 2 μl wprowadzono mikrostrzykawką bezpośrednio do kolumny.

W omówionych warunkach rozdziału chromatograficznego pik dwufenylu jest dobrze oddzielony od pasma rozpuszczalnika, jest ostry i dość symetryczny wśród pików pochodzących od innych składników materiału badanego (ryc. 1).



Ryc. 1.

Ryc. 1. Chromatograficzny rozdział dwufenylu z ekstraktów grapefruitów.



Ryc. 2.

Ryc. 2. Zestaw do ekstrakcji dwufenylu z homogenatów owoców cytrusowych. (1 — chłodnica, 2 — odbieralnik, 3 — cykloheksan, 4 — woda, 5 — kolba destylacyjna, 6 — płaszcz grzejny).

Ekstrakcję dwufenylu z badanego materiału [4] prowadzono z zastosowaniem aparatu przedstawionego na ryc. 2. Owoce przed poddaniem ich procesowi ekstrakcji rozdrobniono w młynkomikserze typu MM 4.

Ekstrakcja dwufenylu z materiału badanego

Rozdrobnione owoce, skórki lub miąższ homogenizowano z dodatkiem wody destylowanej w ilości zapewniającej uzyskanie właściwej gęstości w młynkomikserze. Z tak otrzymanej średniej próby odważano około 100 g materiału do kolby aparatu ekstrakcyjnego dodawano 400 cm³ wody destylowanej i 2 cm³ stężonego kwasu siarkowego. Odbieralnik aparatu (ryc. 2) wypełnia się do rurki przelewowej wodą i 20 cm³ cykloheksanu otrzymując w ten sposób układ dwufazowy, przy czym górną fazę stanowi lżejszy od wody rozpuszczalnik organiczny. Dzięki lotności dwufenylu z parą, po skropleniu par w chłodnicy krople spadały do odbieralnika pozostawiając w cykloheksanie dwufenyl, a nadmiar wody przelewał się do podgrzewanej kolby.

Nie wprowadzono natomiast żadnego środka antypianowego polecanego przez niektórych autorów [4], ponieważ ostrożne ogrzewanie kolby w początkowym okresie ekstrakcji zapobiegało gwałtownemu pienieniu się. Po ostrożnym oddestylowaniu olejków i innych czynników pianotwórczych destylację można przyspieszyć intensywniej podgrzewając kolbę.

Po zakończeniu ekstrakcji trwającej 2—2,5 godziny fazę rozpuszczalnika organicznego przenosi się ilościowo do rozdzielacza przezywając chłodnicę i odbieralnik kilkakrotnie cykloheksanem. Wszystkie zebrane porcje rozpuszczalnika odwadnia się za pomocą bezwodnego siarczanu sodowego, a następnie przenosi się ilościowo do kolbek mierniczych o pojemności 25 cm³ i uzupełnia cykloheksanem do kreski.

Oznaczanie ilościowe

Uzyskane w opisany wyżej sposób ekstrakty bez dodatkowego oczyszczania poddawano analizie za pomocą chromatografu gazowego. Ażeby zapobiec wprowadzeniu do kolumny chromatograficznej zbyt dużej ilości związków ekstrahowanych z owoców wraz z dwufenylem, ekstrakty były rozcieńczane cykloheksanem w zależności od stopnia ich zanieczyszczenia. I tak ekstrakty z cytryn rozcieńczano 10-krotnie, z miąższu grapefruitów i z grapefruitów 20-krotnie, natomiast w przypadku pomarańczy nie zachodziła konieczność rozcieńczania ze względu na uboższy skład ekstraktów.

W analizie ilościowej posłużono się metodą kalibracji wewnętrznej, która wydała się najbardziej właściwą w związku z obecnością na chromatogramach dużej ilości pików niezidentyfikowanych związków.

Rycina 1 przedstawia rozdział dwufenylu ekstrahowanego z miąższu grapefruitów, przy czym część A jest obrazem rozdziału dwufenylu (pik „D”) w rozcieńczonym dwukrotnie ekstrakcie. Chromatogram ten nazwano pierwotnym dla odróżnienia od chromatogramu wtórnego uzyskanego z próbki wzbogaconej dwufenylem. Część B przedstawia właśnie chromatogram wtórny. Próbkę taką przygotowano przez wprowadzenie mikropipetą 20 µl roztworu dwufenylu w cykloheksanie o stężeniu 5 mg/cm³ do 5 cm³ rozcieńczonego ekstraktu. Zawartość pestycydów w badanych ekstrakcie obliczano za pomocą następującego wzoru:

$$G_D = \frac{a \cdot S_D}{\frac{S_P}{S_{P \times}} \cdot S_{D \times} - S_D}$$

w którym:

a — oznacza ilość (μg) czystego dwufenylu wprowadzonego do próbki wtórnej,
 S_D — oznacza powierzchnię pików dwufenylu na chromatogramie pierwotnym,
 S_{Dx} — oznacza powierzchnię pików dwufenylu na chromatogramie wtórnym,
 S_P — oznacza powierzchnię pików porównawczego na chromatogramie pierwotnym,

S_{Px} — oznacza powierzchnię pików porównawczego na chromatogramie wtórnym.

Ekstrakty uzyskane ze skórek odznaczały się uboższym składem, nie występował na chromatogramie obok dwufenylu pik wykorzystywany w obliczeniach ilościowych w próbkach z mięszu jako porównawczy.

Analizę ilościową tych prób prowadzono metodą dodawania wzorca z zastosowaniem podanego wyżej wzoru z tym, że zrezygnowano ze stosowania wartości odpowiadającej powierzchni pików porównawczego. Wzór przyjął wówczas postać następującą:

$$G_D = \frac{a S_D}{S_{Dx} - S_D}$$

Wyniki wraz z opracowaniem statystycznym przedstawiono w tabeli II.

W celu sprawdzenia stopnia odzysku do kolby zawierającej pozostałość po ekstrakcji dwufenylu z materiału badanego wprowadzono różne ilości dwufenylu od 2,5 do 20 mg i ekstrahowano w sposób opisany wyżej. Wykonano po 3—4 równoległe ekstrakcje. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli I.

Tabela I

Tabela odzysków dla roztworów modelowych po ekstrakcji dwufenylu z owoców cytrusowych

Nr próbki	Dodano [mg]	Wykryto [mg]	Wykryto średnio [$\bar{x}$ w mg]	Odzysk w %	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}} \cdot t_{0,05}^*)$
1	2,5	2,51	2,5	100,0	$2,5 \pm 0,06$
2	2,5	2,54			
3	2,5	2,45			
4	2,5	2,50			
5	5,0	4,80	4,8	96,5	$4,8 \pm 0,17$
6	5,0	4,90			
7	5,0	4,77			
8	10,0	9,52	9,7	97,9	$9,7 \pm 0,77$
9	10,0	9,75			
10	10,0	10,10			
11	15,0	14,95	14,6	97,3	$13,6 \pm 0,99$
12	15,0	14,15			
13	15,0	14,70			
14	20,0	18,97	19,5	97,9	$19,5 \pm 1,6$
15	20,0	19,52			
16	20,0	20,25			

$$*) \quad S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

$t_{0,05}$ = wartość krytyczna z tabeli Studenta w poziomie ufności $\alpha = 0,05$

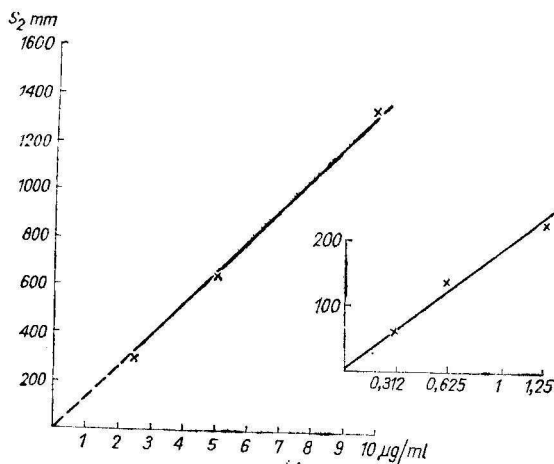
OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wykonane doświadczenia miały na celu opracowanie szybkiej i nieskomplikowanej metody oznaczania dwufenylu z zastosowaniem chromatografii gazowej. Próby takie były podejmowane przez Thomasa [13] już w 1960 r.

Zastosowany przez autora sposób wprowadzania substancji do aparatu polegał na wprowadzeniu niewielkiej ilości nośnika, nasyconego ekstraktem zawierającym dwufenyl, na początek odłączonej kolumny chromatograficznej. Każdorazowe odłączenie kolumny podczas kolejnego wprowadzenia próbki, a także możliwość rozsypania się nośnika podczas jego przenoszenia do kolumny i długi czas potrzebny na przeprowadzenie jednej analizy, wszystko to stanowi o nienajlepszych cechach tej metody.

W obecnej dobie, gdy nastąpił ogromny postęp w dziedzinie chromatografii gazowej w związku z wprowadzeniem szeregu nowych faz stacjonarnych, a także udoskonaleniem techniki możliwym staje się wybór warunków oznaczania dwufenylu w materiale biologicznym metodą odpowiadającą wyposażeniu technicznemu danego laboratorium.

Uzyskana krzywa wzorcowa wykonana dla roztworów dwufenylu w cykloheksanie w zakresie od 0,31 do 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ charakteryzuje się liniowością w całym przebadanym zakresie stężeń (ryc. 3). Wykreślono krzywą w oparciu o uzyskane średnie arytmetyczne z pięciu pomiarów dla poszczególnych stężeń.



Ryc. 3. Krzywa wzorcowa dwufenylu.

Z opracowania statystycznych danych (tab. I) wynika, że w zakresie stężeń w próbce badanej od 2,5 mg do 20 mg wykrywa się średnio 97,9% badanej substancji.

W tabeli II przedstawiającej opracowanie statystycznych wyników oznaczeń, obserwuje się wyraźną różnicę w zawartościach dwufenylu w skórkach i miąższu owoców, bo o ile znajdowano w miąższu pomarańczy średnio 0,58 mg/100 g dwufenylu, to w skórkach zawartość jego wynosiła średnio 14,57 mg/100 g, zaś w przypadku grapefruitów wartości te wynosiły 0,32 mg/100 g w miąższu i 19,81 mg/100 g w skórkach.

Tabela II
Zawartość dwufenylu w owocach cytrusowych

Rodzaj próbki	Nr próbki	Stężenie [mg/100 g]	Średnia $\bar{x}$ [mg/100 g]	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}} \cdot t_{0,05}^*)$
Miąższ poma- rańczowy	1	0,64	0,58	$0,58 \pm 0,0526$
	2	0,55		
	3	0,54		
	4	0,68		
	5	0,52		
	6	0,61		
	7	0,52		
	8	0,60		
Miąższ grape- fruitowy	9	0,345	0,326	$0,326 \pm 0,029$
	10	0,334		
	11	0,357		
	12	0,365		
	13	0,268		
	14	0,292		
	15	0,258		
	16	0,316		
	17	0,353		
	18	0,374		
Skórki poma- rańczowe	19	14,65	14,57	$14,57 \pm 1,06$
	20	15,42		
	21	16,03		
	22	13,24		
	23	14,01		
	24	14,10		
Skórki grape- fruitowe	25	20,95	19,81	$19,81 \pm 1,35$
	26	20,45		
	27	21,43		
	28	19,01		
	29	18,71		
	30	18,34		
Cytryny (całe)	31	7,85	7,10	$7,10 \pm 0,82$
	32	8,05		
	33	6,85		
	34	7,12		
	35	5,85		
	36	6,86		
Sok pomarań- czowy	37	0,00	—	—

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

$t_{0,05}$ = wartość krytyczna z tabeli *Studenta*
w poziomie ufności $\alpha = 0,05$

Ze względu na odmienny sposób konsumpcji cytryn cięto je na plasterki wraz ze skórką i sporządzono homogenat z całych owoców. Zawartość dwufenylu w tym przypadku wynosiła 7,1 mg/100 g. Nie stwierdzono obecności dwufenylu w ekstraktach z soku pomarańczowego.

Dodatkowym zagadnieniem było znalezienie odpowiedniej substancji, która mogłaby być zastosowana w charakterze wzorca wewnętrznego. Polecony przez Thomasa [13] tymol nie mógł być użyty w naszych badaniach ze względu na inne wypełnienie kolumny. Czas retencji pików tymolu pokrywał się z pikami niezidentyfikowanej substancji w ekstrakcie owoców cytrusowych. Zbadano również możliwości zastosowania heksadekanu jako wzorca wewnętrznego, lecz nie uzyskano rozdziału zadowalającego, gdyż różnica czasu retencji między heksadekanem a dwufenylem była nieznaczna. Zdecydowano się wybrać jako wzorzec wewnętrzny pik niezidentyfikowanej substancji występujący w ekstraktach. Wyraźnie krótszy czas retencji pików (P) od pików dwufenylu (ryc. 1) pozwalał posłużyć się nim jako wzorcem wewnętrznym. Oba piki są dobrze wykształcone i symetryczne oraz wykazują ostrą wzajemną zależność w oznaczeniach ilościowych.

WNIOSKI

1. Metoda ekstrakcji dwufenylu z homogenatów owoców z zastosowaniem cykloheksanu w opisanym aparacie ekstrakcyjnym jest szybka i nie wymaga skomplikowanych zabiegów.

2. Opracowana metoda pozwala na szybkie ilościowe oznaczenie dwufenylu w owocach z pominięciem żmudnego, obciążonego znacznymi stratami procesu oczyszczania ekstraktów.

3. Metoda może być potraktowana jako rutynowa, stosowana w szybkiej kontroli zawartości dwufenylu w materiale biologicznym, uwzględniająca przeszło 97% odzysk pestycydów z błędami wahającymi się między 5—10% w zależności od stężeń (0,3—20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$).

Е. Вожняк, А. Токаж

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИФЕНИЛА В ЦИТРУСОВЫХ ПЛОДАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Резюме

В работе представлены возможности применения газовой хроматографии для определения дифенила в плодах цитрусовых. Хроматографический анализ провели с применением газового хроматографа Pye-Unicam серия 104 со стеклянной колонкой, наполненной Gas-Chrom Q и осаждённым на нём, в качестве стационарной фазы 3% OV-17. В работе представлен метод экстракции дихенила с помощью циклогексана из гомогенизированных кож и мякоти фруктов, а также дан способ расчётов, полученных на хроматограмме результатов. Работа содержит также статистическую оценку полученных результатов.

J. Woźniak, A. Tokarz

DETERMINATION OF DIAPHENYL IN LEMONS, ORANGES AND GRAPEFRUITS BY MEANS OF GAS CHROMATOGRAPHY

Summary

The authors describe the possibility of using gas chromatography for determination of diphenyl in oranges, lemons and grapefruits. Chromatographic analysis

was conducted using a Pye-Unicam series 104 gas chromatograph with a glass column filled with Gas-Chrom Q and 3% OV-17 seated on it as the stationary phase. The authors describe the method of diphenyl extraction by means of cyclohexane from homogenized peels and fruits and the method of results calculation. The statistical analysis of results is included as well.

PISMIENNICTWO

1. *Baxter R. A.*: „A Modified Method for the Quantitative Estimation of Diphenyl in Citrus Fruits” *AOAC* 40, 282 (1957) — 2. *Benk E., Krehl A.*: *Fruchtsaft-industrie* 2, 86 (1957) ref. w *Analyst* 88, 36 (1963). — 3. *Cox M. E.*: *Analyst* 70, 373 (1945) ref. w *Analyst* 88, 36 (1963). — 4. *Gunther F. A., Blinn R. C., Barkley J. H.*: „Procedure for Routine Determination of Biphenyl and o-Phenylphenol on and in Citrus Fruit” *Analyst* 88, 36 (1963). — 5. *Kircher J. G., Miller J. M., Rice*: „Quantitative Determination of Biphenyl in Citrus Fruits and Fruit Products by Means of Chromatostrips” *J. Agric. Food Chem.* 2, 1031 (1954). — 6. *Kuodel L. R., Elvin E. J.*: „Infrared Determination of Biophenyl in Treated Fiberboard Cartons” *J. Anal. Chem.* 24, 1824 (1952). — 7. *Mitchell L. C.*: „Paper Chromatography of Biphenyl” *AOAC* 44, 730 (1961). — 8. *Newhall W. F., Elvin E. J., Knadel L. R.*: „Infrared Determination of Biphenyl in Citrus Fruits” *J. Anal. Chem.* 26, 1234 (1954). — 9. *Razjman A.*: „A Method for the Quantitative Micro Determination of Diphenyl” *Analyst* 85, 116 (1969). — 10. *Rusiecki W., Kubikowski P.*: *Toksykologia wspólna PZWŁ* 1969.

11. Specification for Identity and Purity and Toxicological Evaluation of some Antimicrobials and Antioxidants — *FAO* 1965. — 12. *Steyn A. P., Rosselet F.*: „Quantitative Photometric Determination of Diphenyl in Orange Peel” *Analyst* 74, 89 (1949). — 13. *Thomas R.*: „The Detection Juice by Gas Chromatography” *Analyst* 85, 551 (1969). — 14. *Tomkins R. G., Isharwood F. A.*: *Analyst* 70, 330 (1945) ref. w *Analyst* 88, 36 (1963). — 15. *Winkler W. O.*: Report on Diphenyl in Citrus Fruits” *AOAC* 42, 554 (1959).

Dn. 24.I.1975 r.

02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.