KRYSTYNA LEMIESZEK-CHODOROWSKA

WYKRYWANIE I OZNACZANIE SZTUCZNYCH SUBSTANCJI SŁODZĄCYCH W NIEKTÓRYCH ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH CZ. II OZNACZANIE SACHARYNY *)

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku
Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr *M. Nikonorow*

Zaadaptowano, po wprowadzeniu pewnych modyfikacji, kolorymetryczną metodę oznaczania sacharyny z fenolem w środowisku kwasu siarkowego [7].

Ponieważ dulcyna jak również cyklaminiany nie są dozwolone w Polsce jako substancje dodatkowe do środków spożywczych, jakościowe stwierdzenie ich obecności metodą opisaną w I części tej pracy [12] jest wystarczającym powodem dyskwalifikacji produktu. Nie ma potrzeby ilościowego oznaczania. Natomiast sacharyna dopuszczona jest do stosowania, w określonych ilościach w dietetycznych środkach spożywczych przeznaczonych dla diabetyków [16].

Wykrycie więc tej substancji w analizowanej próbce [12] wymaga dalszego badania, określającego jej zawartość.

Do ostatnio opisywanych w piśmiennictwie, metod ilościowego oznaczania sacharyny należą: chromatografia gazowa [8, 10]; gazowo-cieczowa [2, 4] oraz wysokociśnieniowa-cieczowa [15]; spektrofotometria w podczerwieni [3] i w ultrafiolecie [9]; polarografia [6]; emisja molekularna [1] a nawet metoda wagowa [13].

Niewiele z nich może znaleźć zastosowanie w analizach seryjnych średnio wyposażonych laboratoriów. M. in. wykorzystywana jest metoda kolorymetryczna wg *Fernandez-Flores* i wsp. [7] oparta na reakcji z fenolem w środowisku kwasu siarkowego, którą zaadaptowano w niniejszej pracy, po wprowadzeniu pewnych modyfikacji.

Inną metodą kolorymetryczną, polecaną przez autorów włoskich [5] jest metoda z ferroiną, o bardzo dużej wykrywalności (2—6 mg/kg). Nie można jej było wypróbować z powodu braku podstawowego odczynnika.

Do ilościowego oznaczania sacharyny tylko w napojach bezalkoholowych, opisana jest metoda z odczynnikiem *Nesslera* [14]. Ta sama zasada metody była przyjęta przez *Krauzego, Miśkiewicz* i *Bąk* [11] do oznaczania w lemoniadach.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Odczynniki: 1) benzen; 2) chloroform; 3) roztwory *Carreza* wg [12]; 4) kwas solny (1,19) oraz 1 + 4; 5) kwas siarkowy (1,84); 6) sodu siarczan bezwodny wysuszony w temp. 130°C; 7) sodu wodorotlenek 1-n, 20%-owy i 10%-owy; 8) fenol

*) Praca wykonana w ramach problemu MR-12

kryst. bezbarwny oraz roztwór wodny (10 + 1); 9) sacharyna sól wapniowa*); 10) roztwór wzorcowy sacharyny zawierający 0,200 g soli wapniowej w 100 cm³ (1 cm³ = 2 mg**)); 11) rozpuszczalnik ekstrakcyjny — mieszanina chloroformu z benzenem (95 + 5).

Stosowano wszystkie odczynniki o czystości analitycznej, wodę destylowaną, chloroform i benzen dwukrotnie destylowane. Aparatura i szkło specjalne: 1) Specol z kiuwetą 1 cm; 2) rozdzielacze 100 cm³.

Ekstrakcja i wykonanie oznaczenia

A. Soki owocowe i napoje bezalkoholowe (oranżady)

10 cm³ próbki (w razie potrzeby pozbawionej uprzednio dwutlenku węgla) przenoszono do rozdzielacza poj. 100 cm³, dodawano 15 cm³ wody oraz 0,5 cm³ 1-n ługu sodowego i ekstrahowano za pomocą 50 cm³ mieszaniny chloroformu z benzenem (95 + 5) wstrząsając przez 1 min. Po rozdzieleniu się warstw, warstwę chloroformowobenzenową (dolną) odrzucano. Do fazy wodnej dodawano 5 cm³ kwasu solnego (1 + 4) i ekstrahowano trzykrotnie mieszaniną chloroformu z benzenem (95 + 5) biorąc kolejno: 50; 30; 20 cm³ i wstrząsając za każdym razem przez 1 min.

Wszystkie frakcje ekstraktu sączono przez sączek z bibułą filtracyjną i siarczanem sodu (przemyte uprzednio rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym) do kolby miarowej poj. 100 cm³.

Dopełniano do kreski tym samym rozpuszczalnikiem i mieszano. 20 cm³ pipetowano do kolby stożkowej poj. 50 cm³ i odparowywano na łaźni wodnej do sucha, po czym wstawiano kolbę na 20 min. do suszarki o temp. 80°C.

Po ostudzeniu dodawano pipetą: 2,5 cm³ roztworu wodnego fenolu (10 + 1), mieszając dokładnie dla całkowitego rozpuszczenia pozostałości, a następnie 1,5 cm³ kwasu siarkowego.

Krzywą wzorcową przygotowywano po ekstrakcji, w następujący sposób: do kolejnych rozdzielaczy pipetowano ilości roztworu wzorcowego, w cm³: 0; 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 uzupełniając wodą do obj. 25 cm³ oraz po 5 cm³ kwasu solnego (1 + 4), po czym ekstrahowano i postępowano dalej jak przy próbce badanej. Dla każdego stężenia wykonywano trzy próbki równoległe. Wszystkie kolby (zawierające: ekstrakty badane, ślepą, wzorce) zamykano szczelnie korkiem naturalnym z podkładką z folii aluminiowej i wstawiano na 2 h do suszarki o temp. ściśle 175°C. Do kolb ostudzonych do temp. poniżej 100°C dodawano po 30 cm³ gorącej wody, mieszano zawartość, dodawano po 10 cm³ 20%-go ługu sodowego i ponownie mieszano. Po ostudzeniu do temp. pokojowej przenoszono ilościowo do kolb miarowych poj. 100 cm³ i uzupełniano wodą do kreski.

W próbkach wzorcowych oraz w badanych, zawierających sacharynę, powstaje zabarwienie różowofioletowe; w próbce zerowej bardzo jasno różowe.

Pomiary absorbancji wykonywano przy użyciu aparatu Specol z 1 cm kiuwetą, przy sprawdzonej doświadczalnie długości fali 557 nm. Z krzywej wzorcowej, wykreślonej na podstawie średnich z trzech równoległych, odczytywano zawartość sacharyny w próbce badanej, którą przeliczano wg uproszczonego wzoru:

$$C \times 5 = \text{mg sacharyny w 100 g produktu}$$

C = stężenie badanego roztworu w μg/cm³, odczytane z krzywej

B. Dżemy, galaretki niskosłodzone

25,00 g zhomogenizowanej próbki, odważonej w zlewce, przenoszono przy użyciu 50 cm³ gorącej wody do kolby *Stohmana* poj. 100 cm³, dodawano cá 1 cm³ 10%-go ługu sodowego do pH 7,5 (przy papierku uniwersalnym) i wytrawiano na gorącej łaźni wodnej przez 30 min. Po ochłodzeniu do temp. pokojowej dodawano kolejno po 5 cm³ roztworów *Carreza* I i II, dopełniano wodą do kreski wstrząsano i ponownie odstawiano na 30 min. Po przesączeniu przez bibułę filtracyjną, 25 cm³ przesączu i 5 cm³ kwasu solnego (1 + 4) pipetowano do rozdzielacza, ekstrahowano trzykrotnie mieszaniną chloroformu z benzenem i postępowano dalej jak przy sokach owocowych.

Zawartość sacharyny obliczano wg uproszczonego wzoru:

$$C \times 8 = \text{mg sacharyny w 100 g produktu}$$

C = stężenie badanego roztworu w μg/cm³ odczytane z krzywej wzorcowej

*) stosowano odczynnik f-my Sigma

**) w przeliczeniu na imid: 0,8 mg

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Metodę sprawdzono dodając do skontrolowanych uprzednio na nieobecność sacharyny próbek produktów żywnościowych (soki owocowe, oranżady, dżemy niskosłodzone), sól wapniową sacharyny w ilościach 10—40 mg/100 g (co odpowiada ok. 4—16 mg imidu).

Ogółem wykonano 85 oznaczeń.

Wyniki zebrano w tabeli I. Wartość średnia odzysku dla wszystkich produktów i wszystkich stężeń wynosi 96,7%. Wartości skrajne 72,5—

Tabela I. Wartości odzysku

Lp.	Produkt	Liczba próbek	Sacharyna***) mg/100 g			% odzysku	
			dodano	wartości skrajne	średnie	wartości skrajne	średnie
1	Sok wiśniowy**)	5	10	9,2—12,0	10,2	92,5—120,0	102,5
2	Sok wiśniowy**)	6	20	19,3—20,7	20,0	96,2—103,7	99,8
3	Sok jabłkowy*)	6	10	10,5—12,7	11,5	105,0—127,5	114,9
4	Sok jabłkowy*)	6	20	19,0—23,2	20,4	95,0—116,2	102,0
5	Sok jabłkowy*)	8	40	38,2—42,5	40,3	95,6—106,2	100,7
6	Oranżada*)	9	10	7,2—9,2	8,4	72,5—92,5	84,5
7	Oranżada*)	8	20	18,7—23,2	21,5	93,7—116,2	107,3
8	Oranżada*)	12	35	26,7—32,0	29,6	76,4—91,4	84,5
9	Dżem śliwkowy*)	6	20	18,0—22,0	20,0	90,0—110,0	100,3
10	Dżem śliwkowy**)	4	20	16,0—22,8	18,7	80,0—114,0	93,5
11	Dżem śliwkowy*)	10	40	33,6—44,8	37,4	84,0—112,0	93,4
12	Dżem śliwkowy**)	5	40	35,2—38,8	36,3	88,0—97,0	90,8

*) pobrano z rynku
**) przygotowano w laboratorium
***) sól wapniowa

—127,5%. Przy wyrywkowych porównaniach tych wyników z wynikami obliczanymi wg *Fernandez-Flores* i wsp. [7], bez stosowania krzywej wzorcowej, na podstawie porównania absorbancji próbki badanej i najbardziej zbliżonego wzorca, uzyskiwano na ogół dużą zbieżność. Szczególnie wtedy, gdy poziom fortyfikacji był dobrany do poziomu jednego z wzorców. Znacznie większe odchylenia pomiędzy wynikami obliczonymi na podstawie krzywej wzorcowej oraz wg wzoru *Fernandez-Flores* i wsp. [7] obserwowano wtedy, gdy stężenia wzorca nie były ściśle dopasowane do stosowanych fortyfikacji.

Jeżeli w praktyce deklarowana jest na opakowaniu produktu zawartość sacharyny, można w przybliżeniu obliczyć w jakim zakresie stężeń należy przygotować wzorce. Unika się wtedy popełnienia dużego błędu, jaki jest możliwy przy zupełnie nieznanej zawartości sacharyny w badanym produkcie, oznaczonej bez wykreślania krzywej wzorcowej.

Wadą zaadaptowanej metody jest zła powtarzalność (mimo ściśle przestrzeganych warunków oznaczania) reakcji barwnej. Konieczne jest więc wykonywanie trzech oznaczeń równoległych dla każdego punktu krzywej wzorcowej, przygotowanej po ekstrakcji, równolegle z próbką badaną.

Nie zdołano uzyskać lepszej powtarzalności zmieniając czas i temperaturę reakcji oraz inne parametry. Najodpowiedniejsza jest zalecana [7] temp. 175°C przy 2 h ogrzewaniu.

Usprawnieniem okazała się możliwość stosowania w reakcji fenolu uwodnionego (10 + 1) zamiast zalecanego krystalicznego [7], który wymagał każdorazowo topienia i stwarzał trudności przy dokładnym odmierzaniu.

WNIOSEK

Metoda, mimo stosunkowo dużego błędu oznaczania (od —27,5 do +27,5%) może być stosowana do określania zawartości sacharyny w napojach, dżemach i galaretkach niskosłodzonych, w środkach spożywczych dla diabetyków.

K. Лемешек-Ходоровска

ОБНАРУЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ СЛАДЯЩИХ ВЕЩЕСТВ В НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Ч. II. Определение сахарина

Резюме

Для количественного определения сахарина в фруктовых соках, безалкогольных напитках и малосладких джемах модифицировали колориметрический метод Фернандез-Флореса и сотр. (7) с применением фенола и серной кислоты. Измерения проводились с помощью спектрофотометра Specol в 1 см кювета при длине волны 557 нм.

При введении 10—40 мг кальциевой соли сахарина в 100 г продукта (что соответствует 4—16 мг имида), определили в среднем (85 проб) 96,7% вещества. Пограничные значения составляют 72,5%—127,5%.

K. Lemieszek-Chodorowska

DETECTION AND DETERMINATION OF ARTIFICIAL SWEETENERS IN FOODSTUFFS

II. Determination of saccharin

Summary

Determination of saccharin in fruit juices, soft drinks and low sugar jams was performed after adaptation and modification of the colorimetric method [7] with phenol and sulphuric acid. Measurements were accomplished at 557 nm using spectrophotometer Specol with 1 cm cell. 85 samples were fortified with calcium saccharin 10—40 mg/100 g (what corresponds 4—16 mg imide). Average recovery was 96,7% (range: 72,5—127,5%).

PIŚMIENNICTWO

1. *Belcher R.* i in.: Determination of saccharin in soft drinks by molecular emission cavity analysis — Analyst, 1976, 101, 562. — 2. *Conacher H. B. S., O'Brien R. C.:* Gas — liquid chromatographic determination of saccharin in soft drinks — J. AOAC, 1970, 53, 1117. — 3. *Coppini D., Albasini A.:* Determinazione della saccarina e dei ciclamati per mezzo della spectrofotometria infrarossa — Mitt. aus dem Gebiete der Lebensmittelunters. u. Hyg., 1968, 59, 239. — 4. *Daun R. J.:* Determination of saccharin in biological materials by gas-liquid chromatography — J. AOAC, 1971, 54, 1140. — 5. *Di Pasquale S., Corigliano F.:* Separazione saccarina — ciclamato e loro determinazione in preparati farmaceutici e bevande — Ann. Fac. Econ. Commer. Univ. Messina, 1968, 6, 151. — 6. *v. d. Dungen P. W. C. M.:* Polarographische Bestimmung von Saccharin in Getränken und festen Lebensmitteln — Z. Lebensmitt. Untersuch. u. Forsch., 1976, 161, 61. — 7. *Fernandez-Flores E.* i in.: Colorimetric determination of saccharin in foods — J. AOAC, 1973, 56, 1411. — 8. *Gerstl R., Ranfft K.:* Gas — chromatographische Bestimmung von Saccharin in Futter — und Lebensmitteln — Z. Anal. Chem., 1972, 258, 110. — 9. *Hussein M. M., Jacin H., Rodriguez F. B.:* Quantitative deter-

mination of saccharin in food products by ultraviolet spectrophotometry — J. Agric. Food Chem., 1976, 24, 36. — 10. *Krauze S., Miśkiewicz W., Bąk I.:* Sztuczne środki słodzące Cz. II Metody ilościowego oznaczania sacharyny w lemoniadzie — Roczn. PZH, 1965, 16, 39.

11. *König H.:* Trennung, Nachweis und Bestimmung der künstlichen Süssstoffe Cyclamat, Dulcin und Saccharin mittels Gas-Chromatographie — Z. Anal. Chem., 1971, 255, 123. — 12. *Lemieszek-Chodorowska K.:* Wykrywanie i oznaczanie sztucznych substancji słodzących w niektórych środkach spożywczych Cz. I. Wykrywanie sacharyny, cyklaminianu i dulcyny — Roczn. PZH — w druku. — 13. *Markus J. R.:* Gravimetric determination of saccharin in cider — J. AOAC, 1973, 56, 162. — 14. Official Methods of Analysis AOAC, 12 Wyd., Washington D. C., 20. 183. — 15. *Smyly D. S., Woodward B. B., Conrad E. C.:* Determination of saccharin, sodium benzoate and coffeine in beverages by reversa phase high- pressure liquid chromatography — J. AOAC, 1976, 59, 14. — 16. Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dn. 4.VI.1971 (Dz. Urz. Min. Zdr. i Op. Społ. z dn. 15.VIII.71 Nr 15, poz. 73).

Dn. 4.II.1978 r.
OO-791 Warszawa ul. Chocimska 24