

ANNA STASIAK

OZNACZANIE ESTRÓW KWASU P-HYDROKSYBENZOESOWEGO W SOKACH OWOCOWYCH I WARZYWNYCH METODĄ KOLORYMETRYCZNA

Streszczenie

Estry kwasu p-hydroksybenzoesowego (parabeny) charakteryzują się, w porównaniu z większością środków konserwujących, wyższą i prawie niezależną od kwasowości środowiska aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Celem badań było opracowanie prostej, wygodnej i dostępnej do wykorzystania w większości laboratoriów metody oznaczania parabenów w sokach owocowych i warzywnych. Wystarczająco dokładną i czułą okazała się metoda kolorymetryczna polegająca na reakcji barwnej kwasu p-hydroksybenzoesowego (produkcie hydrolizy parabenów) z aminoantypyriną. W badaniach ustalono optymalne warunki przygotowania próby badanej i prowadzenia reakcji barwnej. Stosując proponowany sposób analizy oznaczono parabeny w sokach: jabłkowym, z czarnych porzeczek i pomidorowym wzbogaconych w ten antyseptyk dawkami 0,02%, 0,05% i 0,1%.

Wstęp

Polskie ustawodawstwo dopuszcza do konserwowania żywności dwa estry kwasu p-hydroksybenzoesowego oraz ich sole sodowe: ester etylowy (E 214, E 215) i ester propylowy (E 216, E 217). Antyseptyki te (parabeny) hamują rozwój pleśni, drożdży i bakterii, przy czym są szczególnie efektywne w przypadku pleśni. Parabeny są odporne na działanie tlenu oraz wysokich temperatur procesów przetwórczych, ze sterylizacją włącznie. W porównaniu z kwasem benzoesowym czy sorbowym substancje te działają na mikroorganizmy kilkakrotnie silniej, a w odróżnieniu od większości środków konserwujących ich efektywność przeciwdrobnoustrojowa jest w małym stopniu zależna od pH, stąd parabeny mogą być stosowane do konserwowania żywności w środowisku kwaśnym i obojętnym (zakres pH 3–8). ADI wszystkich estrów i soli sodowych wynosi 0–10 mg/kg masy ciała, zaś typowa dawka to 0,05–0,1% [7]. Do ozna-

czania zawartości parabenów w żywności stosowane są najczęściej metody: kolorymetryczna [3] oraz chromatografii GC [4, 5, 6] i HPLC [1, 2]. Stosunkowo prostą metodą oznaczania parabenów jest metoda kolorymetryczna [3]. Zasada metody oparta jest na reakcji barwnej kwasu p-hydroksybenzoesowego (produkcie hydrolizy parabenów) z aminoantypyriną. Reakcja przebiega w środowisku o pH 9–9,5 w obecności czynnika utleniającego, dodatek niewielkiej ilości sorbinianu potasu zwiększa blisko cztery razy czułość oznaczenia.

Celem podjętych badań było zaadaptowanie tej właśnie metody do oznaczania parabenów w sokach.

W pierwszej części badań opracowano sposób przygotowania próbki i ustalono optymalne warunki prowadzenia reakcji barwnej. Uzyskane rezultaty przedstawiono jako opis „wykonania oznaczenia”.

W drugiej części, stosując opracowany sposób analizy, oznaczono parabeny w trzech produktach: w soku jabłkowym, w zawierającym barwniki antocyjanowe soku z czarnych porzeczek i w zawierającym barwniki karotenoidowe soku pomidorowym.

Materialy i metody badań

Materialy; soki: jabłkowy, z czarnych porzeczek i pomidorowy „Fortuna”, nie zawierające konserwantów. Do badanych soków dodano sól sodową estru etylowego kwasu p-hydroksybenzoesowego (ester PHB, Na) w dawkach 20, 50 i 100 mg/100 cm³.

Wykonanie oznaczenia

A. Przygotowanie próbki

10 cm³ analizowanego soku zakwasić 2 cm³ 25% H₂SO₄ i ekstrahować dwa razy eterem dietylowym (20 cm³ i 10 cm³). Ekstrakt eterowy przemyć wodą destylowaną (20 cm³) i ekstrahować trzy razy 2 N NaOH (po 10 cm³). Ekstrakt alkaliczny ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej w ciągu 5 minut, po ochłodzeniu zobojętnić stęż. HCl wobec fenoloftaleiny i uzupełnić próbkę wodą destylowaną do objętości 40 cm³.

B. Przygotowanie roztworu wzorcowego

Naważkę 10 mg estru PHB, Na rozpuścić w minimalnej ilości wody destylowanej, dodać 30 cm³ 2N NaOH i dalej postępować jak z ekstraktem alkalicznym próbki. Uzyskany roztwór wzorcowy posiada stężenie 250 µg estru PHB, Na. Krzywą wzorcową wykreślić w zakresie stężeń 50–300 µg/cm³ (0,2–1,2 cm³ roztworu wzorcowego).

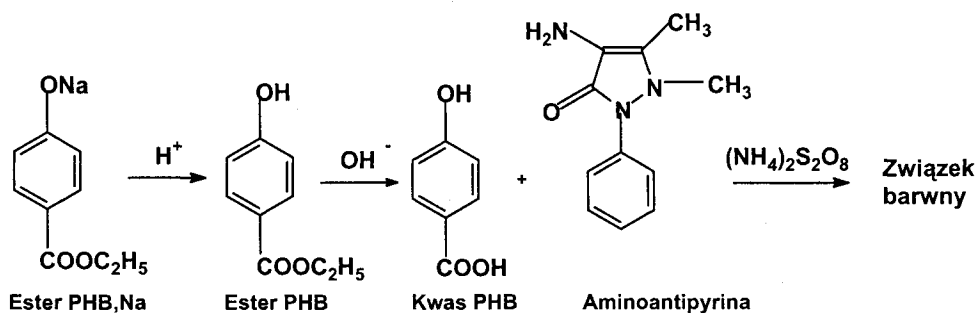
C. Reakcja barwna

1÷2,5 cm³ próbki oraz 0,2÷1,2 cm³ roztworu wzorcowego uzupełnione do 2,5 cm³ wodą destylowaną, 0,5 cm³ roztworu sorbinianu potasu (0,5% r-r wodny), 2 cm³ buforu o pH 9,5 (5 cm³ 25% amoniaku, 6 g NH₄Cl uzupełnione do 100 cm³ wodą

destylowaną), 0,1 cm³ roztworu aminoantypiryny (2% r-r wodny), 0,5 cm³ roztworu nadtlenodisiarczynu amonu (2% r-r wodny).

Po 15 minutach przeprowadzić pomiary absorbancji przy $\lambda = 510$ nm wobec próby kontrolnej zawierającej w miejsce próbki wodę destylowaną.

Przemiany parabenu podczas analizy



Wyniki badań i dyskusja

Wydzielanie parabenów z analizowanych produktów prowadzone jest zazwyczaj metodą ekstrakcji w dwóch etapach. W pierwszym etapie parabeny, po zakwaszeniu próbki, ekstrahowane są do rozpuszczalnika lipofilnego, najczęściej w tym celu stosowane są eter dietylowy lub chloroform. W drugim etapie związki te z warstwy organicznej ekstrahowane są do wodnego roztworu wodorotlenku sodu.

Na podstawie wyników badań wstępnych do ekstrakcji parabenów z soków wyciopyano eter dietylowy, a do ich reekstrakcji z eteru 2 N NaOH. Zastosowanie tych odczynników zapewniło dobry odzysk parabenu przy minimalnych ilościach ekstrakcji i objętościach czynników ekstrahujących. Podczas ekstrakcji alkalicznej zachodziła częściowa hydroliza estru PHB do kwasu p-hydroksybenzoesowego, ogrzanie roztworu zasadowego w ciągu 5 minut we wrzącej łaźni wodnej zapewniało całkowitą jego hydrolizę. Konieczne okazało się zobojętnienie ekstraktu zasadowego, aby uzyskać odpowiednią alkaliczność w reakcji barwnej. W rezultacie w próbce przygotowanej do reakcji barwnej stężenia parabenu były cztery razy niższe w porównaniu do jego stężeń w sokach, ale mieściły się w granicach czułości proponowanej metody.

Obecność barwników antocyjanowych i karotenoidowych w badanych sokach okazała się nieistotna i nie miała wpływu na przebieg oznaczeń. W tabeli 1. przedstawiono uzyskane wyniki analiz oraz odpowiadające im współczynniki statystyczne.

Tabela 1

Wyniki oznaczania estru etylowego kwasu p-hydroksybenzoesowego w sokach.
The results of p-hydroxybenzoic acid determination in the juices.

Sok Juice	Ilość powtórzeń Number of repeated determinations	Dawka parabenu Dose of paraben	Oznaczona zawartość parabenu Determined content of paraben		Odchylenie standardowe Standard S	Współczynnik zmienności Coefficient of variations v
		mg/100cm ³	mg/100cm ³	%	mg/100cm ³	%
Jabłkowy Apple juice	10	20	18,0	90,0	2,00	11,1
	10	50	48,4	96,8	1,36	2,8
	10	100	99,8	99,8	0,31	0,3
Z czarnych porzeczek Blackcurrant juice	8	100	99,7	99,7	0,57	0,6
Pomidorowy Tomato juice	8	100	99,3	99,3	0,62	0,6

Otrzymane wyniki upoważniają do pozytywnej oceny proponowanej metody kolorymetrycznej oznaczania parabenów. Metoda ta charakteryzuje się prostotą, dokładnością oraz wysokim odzyskiem parabenów i może być stosowana do badań rutynowych w laboratoriach o podstawowym wyposażeniu.

Wnioski

1. Dobrym i skutecznym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji parabenów z soków owocowych i warzywnych jest eter dietylowy. Ilościowe wydzielenie konserwanta z soków uzyskuje się prowadząc ekstrakcję dwa razy przy użyciu kolejno dwóch i jednej objętości rozpuszczalnika w stosunku do objętości soku.
2. Reekstrakcję parabenu z eteru dietylowego należy prowadzić trzy razy, każdorazowo przy użyciu trzykrotnie mniejszej objętości 2 N NaOH w stosunku do objętości ekstraktu etylowego.
3. W celu uzyskania powtarzalnych wyników oznaczeń kolorymetrycznych ważne jest zachowanie odpowiedniej alkaliczności roztworu podczas prowadzenia reakcji barwnej (pH 9.0 ÷ 9.5).
4. Błędy proponowanej metody oznaczania parabenów zależą od ich poziomu w produktach i wynoszą :
 - dla dawki 20 mg/100 cm³ ~ 10%,
 - dla dawki 50 mg/100 cm³ ~ 3%,
 - dla dawki 100 mg/100 cm³ < 1%.

LITERATURA

- [1] Clarke G., Rashio I.A.: Quantitative determination of methyl and propyl p-hydroxybenzoates by high-performance liquid chromatography, *Analyst*, **102**, 1977, 685-687.
- [2] Collinge A., Noirfalise A.: Dosage de sept agents conservateurs dans les denrees alimentaires par chromatographie liquide a haute perfomance, *Analitica Chimica Acta*, **132**, 1981, 201-204.
- [3] Gertz Ch., Hild J.: Möglichkeiten der analytischen Erfassung von Konservierungsstoffen in Lebensmitteln. I. Extraktion und spektralphotometrische Bestimmungsverfahren, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **170**, 1980, 103-109.
- [4] Gossele J.: Gas chromatographic determination of preservatives in food, *J. Chromatogr.*, **63**, 1971, 429-43.
- [5] Hild J., Gertz Ch.: Möglichkeiten der analytischen Erfassung von Konservierungsstoffen in Lebensmitteln. II. Gaschromatographie, Hochdruckflüssigkeitchromatographie, TAS – Verfahren, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **170**, 1980, 110-114.
- [6] Luca C., Passi S, Quattrucci E : Simultaneous determination of sorbic acid, benzoic acid and parabens in foods: a new gas chromatography-mass spectrometry technique adapted in survey on Italian foods and beverages, *Food Additives and Contaminants*, **12** (1), 1995, 1-7.
- [7] Rutkowski A., Gwiazda S.: Dodatki funkcjonalne do żywności, *Agro Food Technology*, Katowice, 1993.

DETERMINATION OF P-HYDROXYBENZOIC ACID ESTERS IN FRUIT AND VEGETABLE JUICES USING A COLORIMETRIC METHOD

S u m m a r y

p-Hydroxybenzoic acid esters (parabens) exhibit antimicrobial activity higher than the majority of conservants, and almost independent on pH. Our studies aimed at development of a simple , convenient and easy to use in most laboratories method of parabens determination in fruit and vegetable juices. A colorimetric method based on a formation of a light-absorbing dye, as a product of reaction of p-hydroxybenzoic acid released from parabens with aminoantipyrine, occured to be sufficiently precise and sensitive. Optimal conditions of sample preparation and performance of an assay were also established. This developed procedure was applied for parabens determination in apple, blackcurrant and tomato juices, fortified with these antiseptics at concetration of 0.02%, 0.05% and 0.1%. ❖