

S. KRAUZE, L. PIEKARSKI, T. WŁODARCZYK

ROZDZIELANIE BARWNIKÓW ŻYWNOŚCIOWYCH ORAZ ICH OZNACZANIE ZA POMOCĄ BEZPOŚREDNIEGO FOTOMETROWANIA NA BIBULE

Z Zakładu Badania Środków Spożywczych Akademii Medycznej w Warszawie

Barwienie artykułów żywności barwnikami syntetycznymi, chociaż z punktu widzenia higieny nie jest wskazane, stosuje się jednak prawie we wszystkich krajach. Regulowane jest ono odpowiednimi przepisami, dopuszczającymi niektóre barwniki uznane w danym kraju za nieszkodliwe. Ostatnio opracowany projekt polskiego rozporządzenia (7) dopuszcza dziewięć barwników rozpuszczalnych w wodzie i dwa barwniki tłuszczowe (do barwienia skórek serów). Zagadnienie identyfikacji i ilościowego oznaczania barwników w artykułach żywności, jak również w mieszkankach barwników jest bardzo ważne. Projekt rozporządzenia nie podaje dopuszczalnych ilości barwników w artykułach żywności ze względu na brak zarówno metod oznaczania, jak i ścisłych danych dotyczących szkodliwości poszczególnych barwników. Pomimo tego istnieje obecnie konieczność zajęcia się ilościowym oznaczaniem barwników, na co zwracano już uwagę (4).

Identyfikację barwników dokonuje się obecnie przeważnie po ich chromatograficznym rozdzielaniu na bibule przy użyciu różnych rozpuszczalników. W Polsce pierwsze badania nad rozdzielaniem chromatograficznym na bibule barwników przeprowadzała *Siedlecka* (6), posługując się metodą krążkową, opisaną przez *Ruttera* (5).

Ilościowym oznaczaniem barwników żywnościowych w mieszkankach zajmowali się w Polsce *Krauze* i *PiekarSKI* (4, 1) uważając, że zagadnienie to dojrzało do tego, aby po opracowaniu znalazło wyraz w praktyce laboratoryjnej.

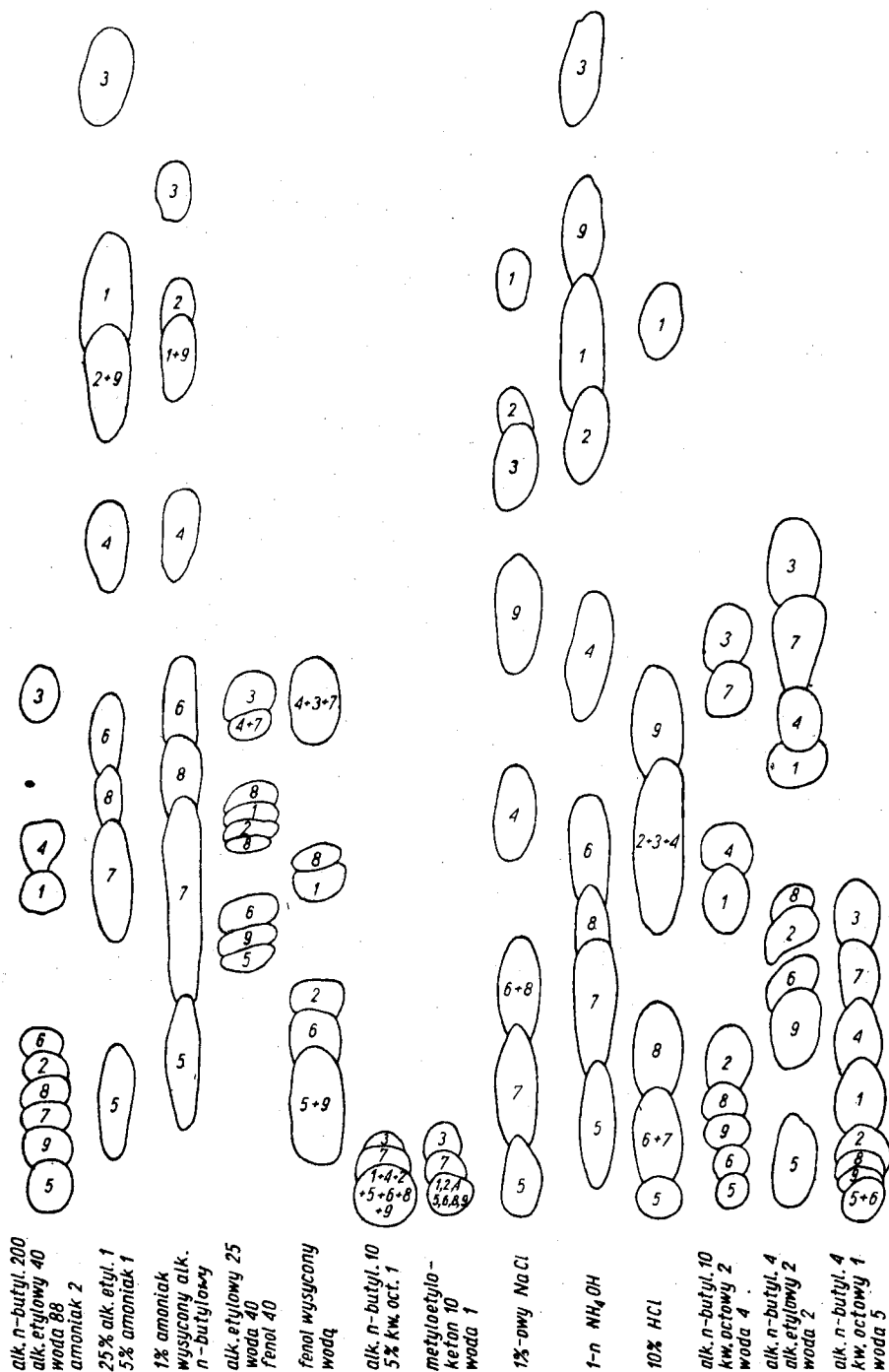
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Rozdzielanie chromatograficzne barwników przy użyciu różnych rozpuszczalników

Przeprowadzono rozdzielanie mieszaniny barwników złożonej z: szkarłatu GN, azorubiny, kokcyny nowej, amarantu, żółcieni kwaśnej, indygotyny, żółcieni pomarańczowej, tatrazyny, czerni brylantowej BN, stosując metodę chromatografii bibułowej wstępującej.

1.1. Rozpuszczalniki: Do rozdzielania użyto następujących rozpuszczalników:

- 1%owy roztwór chlorku sodowego (6);
- alkohol n- butylowy, kwas octowy, woda (10 : 2 : 4),
- metyloetyloketon, woda (10 : 1),



Ryc. 1. Oznaczenie barwników: 1 — żółcień kwaśna, 2 — kokcyzna nowa, 3 — szkarłat GN, 4 — żółcień pomarańczowa, 5 — czerni brylantowa BN, 6 — amarant, 7 — azorubina, 8 — indygotyna, 9 — tartrazyna

L.p.	Barwniki	R o z p u s z c z a l n i k i												
		1% NaCl	InNH ₄ OH	10% HCl	butanol 10 kw. oct. 2 woda 4	butanol 4 etanol 2 woda 2	butanol 4 kw. oct. 1 woda 5	butanol 200 etanol 40 woda 88 amoniak 2	25% etanol 1 5% amoniak 1	1% amoniak wysycony butanolem	fenol 40 woda 40 alkohol etylowy 25	fenol wysy- cony wodą	butanol 10 5% kw. oct. 1	metyloetylo- keton 10 woda 1
1	Żółcień kwaśna R	0,552	0,583	0,630	0,202	0,318	0,057	0,185	0,616	0,743	0,229	0,140	0,0	0,0
2	Koksyna nowa	0,454	0,509	0,256	0,103	0,191	0,028	0,082	0,562	0,746	0,296	0,115	0,0	0,0
3	Szkarłat GN	0,383	0,774	0,228	0,376	0,446	0,160	0,328	0,790	0,874	0,354	0,343	0,04	0,032
4	Żółcień pomarańcz. S	0,267	0,339	0,228	0,250	0,349	0,078	0,222	0,421	0,557	0,307	0,286	0,0	0,0
5	Czerni brylantowa BN	0,014	0,554	0,100	0,009	0,038	0,0	0,034	0,066	0,091	0,152	0,035	0,0	0,0
6	Amarant	0,102	0,246	0,356	0,033	0,149	0,0	0,114	0,263	0,426	0,186	0,075	0,0	0,0
7	Azorubina	0,064	0,103	0,356	0,336	0,405	0,137	0,052	0,156	0,201	0,293	0,289	0,034	0,025
8	Indygotyna	0,112	0,136	0,998	0,079	0,217	0,019	0,124	0,206	0,350	0,230	0,158	0,0	0,0
9	Tartrazyna	0,347	0,680	0,337	0,040	0,111	0,0	0,037	0,598	0,768	0,197	0,030	0,0	0,0

- d) 10%owy kwas solny (9),
- e) 25%owy alkohol etylowy, 5%owy wodorotlenek amonowy (1:1),
- f) fenol wysycony wodą,
- g) alkohol n- butylowy, 5%owy kwas octowy (10:1),
- h) alkohol n- butylowy, alkohol etylowy, woda (2:1:1) (2),
- i) 1%owy wodorotlenek amonowy wysycony alkoholem n- butylowym,
- j) alkohol n-butylowy, alkohol etylowy, woda, amoniak (200:40:88:2) (3),
- k) l-n wodorotlenek amonowy (2),
- l) fenol, woda, alkohol etylowy (40:40:25) (9),
- ł) alkohol n-butylowy, kwas octowy, woda (4:1:5).

1.2. Sposób przeprowadzenia chromatografii. Na arkusz bibuły Whatman Nr 4 o wymiarach 15×40 cm, nanoszono po 0,005—0,01 ml roztworu mieszaniny wszystkich dziewięciu barwników oraz dziewięć roztworów pojedynczych barwników znajdujących się w mieszaninie. Następnie arkusz umieszczano w komorze, zanurzając jego dolną część w rozpuszczalniku, znajdującym się w naczynku na dnie komory, na głębokość ok. 0,5 cm. Po zakończonym rozdzielaniu arkusz wyjmowano z komory i suszono.

1.3. Wyniki rozdzielania mieszaniny barwników. Chromatogramy z rozdzielonymi barwnikami przy zastosowaniu wszystkich wymienionych w p. 1.1. rozpuszczalników przedstawione są na ryc. 1.

Wartości R_f dla poszczególnych barwników i rozpuszczalników przedstawione są w tabeli 1.

2. Oznaczanie ilościowe

Próby ilościowego oznaczania barwników przez bezpośrednie fotometryczne na bibule wykonano na przykładzie oznaczenia tartrazyny w mieszaninach złożonych z indygotyny i tartrazyny w stosunku 1:9,16; 1:8,31; 1:14,79.

2.1. Wzorce barwników. Przed przystąpieniem do oznaczania wykonano badania z wzorcami zarówno pojedynczych barwników, jak i ich mieszanin.

Roztwory pojedynczych barwników zawierały w 1 ml tartrazyny po 3132 μg i 626,4 μg , indygotyny 27,6 μg . Oprócz powyższych trzech wzorców posługiwano się roztworami mieszanin o następujących zawartościach barwników:

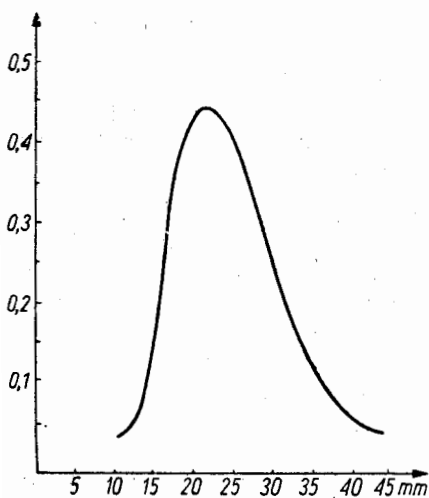
a)	192,80 μg tartrazyny i	23,20 μg indygotyny
b)	199,25	21,75
c)	578,40	69,60
d)	797,00	87,00
e)	1594,00	174,00
f)	2249,00	270,00
g)	3213,00	386,70
h)	4820,00	580,00

2.2. Rozdzielanie chromatograficzne roztworów wzorcowych. Na paski bibuły Whatman Nr 1 nanoszono po 0,005—0,015 ml roztworów wzorcowych zawierających pojedyncze

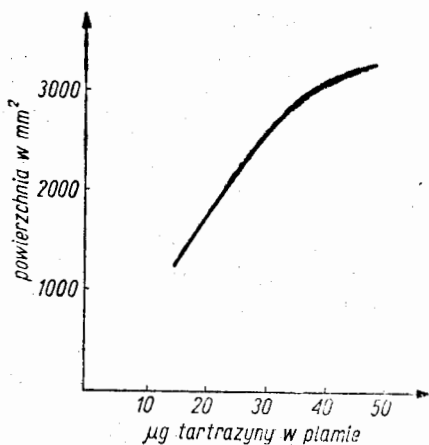
barwniki jak i mieszaniny tartrazyny i indygotyny. Barwniki nanoszono w odległości 4 cm od siebie. Następnie paski bibuły umieszczano w komorze chromatograficznej i przeprowadzano rozdzielanie używając jako rozpuszczalnika 1 n- NH_4OH . 1 n- wodorotlenek amonowy dawał w tym przypadku szybkie i pełne rozdzielanie w ciągu 45—50 minut. Po zakończonym rozdzielaniu bibulę suszono i cięto wzdłuż na paski szerokości 4 cm (tak aby plamy barwników znajdowały się w środku).

2.3. Fotometrowanie pasków bibuły z wzorcami. Paski bibuły z rozdzielonymi barwnikami analizowano w fotometrze Pulfricha z wstawką do bezpośredniego fotometrowania na bibule produkowaną seryjnie przez f-mę C. Zeiss Jena przy użyciu filtra L-3 dla tartrazyny i K-57, dla indygotyny.

Pasek bibuły przesuwano co 1 mm, notując odległość od miejsca startu i odczytując ekstynkcję. Dla każdego stężenia barwnika wykonywano dwa chromatogramy, które analizowano w fotometrze, wykonując zawsze po cztery odczyty.



Ryc. 2



Ryc. 3

Z otrzymanych wyników obliczano średnie. Zależności między odległościami od miejsca startu i odczytanymi wartościami ekstynkcji przedstawiono następnie w postaci wykresu, odkładając na osi x — odległość, a na osi y — ekstynkcję. Otrzymana w ten sposób krzywa dla tartrazyny, przedstawiona jest na ryc. 2. Po skorygowaniu krzywych, obliczano powierzchnie w mm^2 zawarte między ramionami krzywej wykreślonej na papierze milimetrowym. Poszczególne powierzchnie odpowiadały pojedynczym planom barwnika fotometrowanego na bibule.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że istnieje zależność między zawartością barwnika w plamie, a otrzymaną w wyniku fotometrowania tej plamy powierzchnią (ryc. 3). Było to podstawą do oznaczania ilościowego barwników w mieszaninie, w naszym przypadku, jak już wspomniano, tartrazyny.

2.4. Wykonanie ilościowego oznaczenia tartrazyny w mieszaninie tartrazyny i indygotyny.

Z mieszaniny indygotyny i tartrazyny przygotowano roztwory o następującej zawartości poszczególnych barwników w 1 ml:

tartrazyna	indygotyna
199,25 μg	21,75 μg
192,80 „	23,20 „
343,12 „	23,20 „

W mieszkankach tych oznaczano ilości tartrazyny na podstawie oznaczeń przeprowadzonych poprzednio z roztworami wzorcowymi tych dwóch barwników. Badania mieszaniny tartrazyny i indygotyny przeprowadzano, jak w p. 2.2 i 2.3,

Z otrzymanych powierzchni dla tartrazyny obliczano na podstawie powierzchni barwników wzorcowych ilości tartrazyny w mieszkankach, przeprowadzając wyliczenia z prostej zależności liniowej. Oznaczenia przeprowadzano dla ilości 15 do 39 μg tartrazyny w plamie, gdyż jak wynika z wykresu umieszczonego na ryc. 3 tylko w powyższych granicach zawartości barwnika w plamie istniała ścisła zależność liniowa pomiędzy powierzchnią otrzymaną w wyniku fotometrowania a ilością tartrazyny.

Np. powierzchnia obliczona dla oznaczanej tartrazyny wynosi 2242 mm^2 , powierzchnia obliczona dla znanej ilości tartrazyny (18,79 μg) wynosi 1772 mm^2 . Ilość tartrazyny w plamie barwnej fotometrowanej na bibule po rozdzielaniu chromatograficznym wynosi:

$$x = \frac{2242 \cdot 18,79}{1772} = 23,78 \mu\text{g}$$

Na podstawie oznaczonej ilości tartrazyny w plamie, po uwzględnieniu ml roztworu mieszaniny barwników wziętych do badania oraz zawartości mieszaniny w roztworze, obliczano procentową zawartość tartrazyny w mieszance.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Przeprowadzone rozdzielanie chromatograficzne barwników na bibule metodą wstępującą jest procesem na ogół dłuższym niż stosowane przez Siedlecką (6) rozdzielanie na krążkach. Zaletą jednak rozdzielania na paskach jest możliwość zastosowania otrzymanego chromatogramu do oznaczania ilościowego barwników przez bezpośrednie fotometrowanie na bibule.

Pełnego rozdzielania mieszaniny dziewięciu barwników nie udaje się uzyskać przy zastosowaniu wyłącznie jednego z trzynastu rozpuszczalników użytych w pracy. Zupełnie nie nadawały się do chromatografii ze względu na zbyt małą szybkość wędrówki barwników rozpuszczalniki takie, jak metyloetyloketon + woda (10:1), n-butanol + 5%-owy kwas octowy (10:1), niekorzystne wyniki otrzymano stosując n-butanol kwas octowy, wodę (4:1:5). Pozostałe rozpuszczalniki mogą być stosowane z mniejszym lub większym powodzeniem, w zależności od składników rozdzielanej mieszaniny. W praktyce najczęściej stosowane są do barwienia artykułów żywności mieszanki złożone z 2—4 pojedynczych barwników, których rozdzielanie jest możliwe przy zastosowaniu jednego z użytych rozpuszczalników, dobranych na podstawie wyników przedstawionych na ryc. 1 i w tabeli 1.

Ilościowe oznaczanie barwników przez bezpośrednie fotometrowanie, wykonane w naszym przykładzie dla tartrazyny, jest metodą niewątpliwie szybszą i mniej kłopotliwą niż oznaczanie barwników po eluacji (4). Przy metodzie bezpośredniego fotometrowania unika się całego szeregu kłopotliwych czynności dokonywanych po rozdzielaniu barwników na bibule, jak wycinanie bibuły pokrytej barwnikiem oraz eluacja barwnika z bibuły. Wadą metody bezpośredniego fotometrowania jest wąski zakres zawartości barwnika w płamie, przy którym można prowadzić oznaczenia. Z przeprowadzonych badań wynika, że najkorzystniejsze warunki oznaczania tartrazyny zawierają się w wąskich granicach zawartości barwnika w płamie, gdyż tylko w zakresie 15 do 30 μg tartrazyny stwierdzono zależność liniową pomiędzy ilością barwnika w płamie a powierzchnią otrzymaną w wyniku bezpośredniego fotometrowania tego barwnika na bibule.

WNIOSKI

1. Z trzynastu rozpuszczalników zastosowanych do rozdzielania mieszanin złożonych z barwników umieszczonych w projekcie rozporządzenia o barwieniu artykułów żywności nie nadawały się do tego celu metyloetyloketon z wodą (10 : 1), n-butanol z 5% -owym kwasem octowym (10 : 1) oraz bardzo słabe zdolności rozdzielcze wykazywał rozpuszczalnik złożony z n-butanolu, kwasu octowego i wody (4 : 1 : 5).

2. Pełne rozdzielenie każdej 2—4 składnikowej mieszaniny jest możliwe przy zastosowaniu jednego z dziesięciu rozpuszczalników opisanych w pracy.

3. Oznaczanie ilościowe barwników za pomocą bezpośredniego fotometrowania na bibule przy użyciu specjalnej wstawki do fotometru Pulfricha jest metodą mniej kłopotliwą niż metoda eluacji. Jednak możliwość oznaczania jest ograniczona do bardzo wąskiego zakresu zawartości barwnika w płamie uzyskanej po chromatograficznym rozdzielaniu.

С. Краузэ, Л. Пекарски, Т. Влодарчик

РАЗДЕЛЕНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ КРАСОК УПОТРЕБЛЯЕМЫХ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ПРИ ПОМОЩИ НЕПОСРЕДСТВЕННОГО ФОТОМЕТРИРОВАНИЯ

Содержание

В предложенном труде применено тринадцать различных растворителей с целью разделения смеси составленной из девяти красящих веществ предложенных для окрашивания пищевых продуктов по проекту польского распоряжения.

Десять из применяемых растворителей пригодны для разделения смеси 2 — 4 элементов.

Предпринято пробы определения красящих веществ при помощи непосредственного фотометрирования на бумаго употребляя фотометр Пульфриха. Работа при применении этого метода идет быстро, но она менее точная нежели метод элюации.

S. Krauze, L. Piekarski, T. Włodarczyk

SEPARATION OF FOOD DYES AND THEIR DIRECT PHOTOMETRIC
DETERMINATION ON THE PAPER

Summary

Thirteen different solvents have been used to separate a mixture of nine dyes propounded for food coloring in the project of new Polish food-dyeing act.

Ten of these solvents can be used to separate the mixtures of 2 to 4 ingredients.

The method of photometric determination of dyes on the paper has been tested with the use of Pulfrich's photometer with a special insertion. This method is quick but less precise than the method of elution.

PIŚMIENNICTWO

1. Krauze S., Piekarski L.: praca oddana do druku do Acta Pol. Pharm. —
2. Loest W.: J. Pharm. Belg., 8, 260, 1953 wg Anal. Abstr., 1, 988 1954. —
3. Panapoulos G., Megalidoikomos J.: Chem. Anal., 36, 68, 1954 wg Anal. Abstr., 1, 1681, 1954. — 4. Piekarski L., Krauze S.: praca oddana do druku do Roczn. PZH. — 5. Rutter L.: Analyst, 75, 37, 1950. — 6. Siedlecka J.: Roczniki PZH, 2, 33, 1951. — 7. Siedlecka J.: Roczniki PZH, 8, 297, 1957. — 8. Siedlecka J., Gilewska C.: Roczniki PZH, 4, 81, 1953. — 9. Yokio Ishida, Naoki Inagaki, Akihiko Shtota, Reiko Watanable: J. Pharm. Soc. Jap., 73, 736 (1953) wg Chem. Abstr., 10141, 1953.