

Využitie kapilárnej izotachofórézy na stanovenie niektorých syntetických farbív

JOLANA KAROVIČOVÁ—JOZEF POLONSKÝ—ALEXANDER PRÍBELA—
—PETER ŠIMKO

Súhrn. V odporúčanom elektrolytickom systéme ES I boli rozdelené a identifikované niektoré syntetické farbivá (napr. tartrazín, žltá SY, azorubín), ktoré sa najčastejšie vyskytujú v prifarbovaných potravinárskych výrobkoch. Dobré výsledky izolácie syntetických farbív sa dosiahli adsorpciou na polyamidové granuly.

Prifarbovanie potravín prirodzenými a syntetickými farbivami má svoje opodstatnenie tak z hľadiska estetického, ako aj fyziologického. Atraktívny vzhľad potraviny má za následok zvýšenú sekréciu žalúdočných štiav a tým i lepšie využitie konzumovanej potraviny [1].

Syntetické farbivá majú oproti prirodzeným veľa výhod. Sú odolnejšie proti zmenám pH a kyselinám, proti tepelným a svetelným vplyvom, oxidácii a enzymatickej činnosti a proti niektorým chemickým konzervačným prostriedkom. Nemenia významne farbu v komplexoch s kovmi, možno ich vyrobiť v rovnomernej kvalite, vysokej koncentrácii, s veľkou farbiacou mohutnosťou a čistotou, sú vo väčšine prípadov podstatne lacnejšie ako prirodzené farbivá. Pre uvedené výhody sa syntetické farbivá rozšírili veľmi rýchlo aj v potravinárskom priemysle [1].

Zdravotnými aspektmi používania syntetických farbív sa zaoberajú práce Riazuddina a kol. [2], Combesa [3], Vargovej [4]. Dokázalo sa, že väčšina syntetických farbív, ktorých kancerogénna vlastnosť sa dokázala v pokusoch, je rozpustná v tukoch. Väčšina štátov v rámci legislatívnych opatrení prijala koncepciu tzv. pozitívnych zoznamov povolených farbív. V nich sa vyskytujú len presne definované farbivá a ich počet je obmedzený podľa najnovších hygienicko-toxikologických poznatkov. Takýto postup znižuje na minimum

Ing. Jolana Karovičová, CSc., prof. Ing. Alexander Príbela, DrSc., Ing. Peter Šimko, CSc., Katedra sacharidov a konzervácie potravín; doc. Ing. Jozef Polonský, CSc., Katedra analytickej chémie. Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

zdravotné riziko a súčasne uľahčuje prácu hygienickej kontroly a potravinárskych analytikov.

Na analýzu syntetických farbív sa využíva najmä papierová a tenkovrstvová chromatografia. Na oddelenie syntetických farbív sa používajú univerzálne alebo špecifické vyvíjacie sústavy [5, 6]. Na identifikáciu farbív sa využívajú spektrálne metódy v UV a viditeľnej oblasti, charakteristika čiarových spektier a fluorescencia. Niektorí autori [7—9] stanovili syntetické farbivá metódou HPLC aj použitím diode-array detektora.

Cieľom práce bolo zistiť vhodný elektrolytický systém kapilárnej izotachofórézy, v ktorom by sa dosiahla separácia čo najväčšieho počtu syntetických farbív a preskúšať spôsoby izolácie syntetických farbív z rôznych typov vzoriek, najmä na modelových vzorkách štandardných roztokov syntetických farbív.

Materiál a metódy

Izotachoforetické merania sa robili na izotachoforetickom analyzátore s technikou spájania kolón ZKI 01 (ÚRVJT Spišská N. Ves). Signál z vodivostného detektora bol po zosilnení registrovaný dvojliniovým zapisovačom TZ 4200 (Laboratorní přístroje, k. p., Praha). Vzorky sa analyzovali pri hnacom prúde 300 μA v predseparačnej kolóne a 50 μA v analytickej kolóne. Vzorky sa riedili vodou a do kolóny dávkovali dávkovacím kohútom prístroja.

Pracovali sme so štandardmi syntetických farbív (tatrazín, žltá SY, patentná modrá, erytrozín, brilantná čierna BN, košenilová červená, indigotín, amarant, azorubín) koncentrácie 100 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Výsledky a diskusia

Zistiť, preskúšať a zároveň odporučiť vhodný elektrolytický systém (ES), pomocou ktorého by sa dosiahla separácia čo najväčšieho počtu syntetických farbív sme robili so štandardnými roztokmi syntetických farbív koncentrácie 100 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, čo zaručovalo, že neprekračujeme separačnú kapacitu kolóny. Analýzy sa najprv robili v predseparačnej kolóne, čo bolo pri daných koncentráciách postačujúce, pretože sa vylúčila možnosť tvorby nestacionárnej zóny. Tieto tvrdenia sa overili pri niektorých štandardných zmesiach, ktoré sa oddelili v predseparačnej kolóne a neoddelili sa ani v analytickej kolóne. Ide teda o stabilné zmesné zóny, ktorých separáciu nedosiahneme zvyšovaním separačnej kapacity kolóny, ale iba zmenou elektrolytického systému [10, 11]. V práci sa preskúšali štyri elektrolytické systémy ES (tab. 1), v ktorých sa zmenilo zloženie vodiaceho elektrolytu (zmena pH, zmena protiiónu) i zloženie zakonču-

Tabuľka 1. Zloženie použitých elektrolytických systémov ES pre kapilárnu izotachofórezu
Table 1. Composition of used electrolyte systems ES for capillary isotachopheresis

	ES I	ES II	ES III	ES IV
vodiaci elektrolyt HCL ¹ [mol . dm ⁻³] Protiión ²	10 ⁻² β -alanín ⁵	10 ⁻² kyselina ϵ -aminokaprónová ⁷	10 ⁻² histidín ⁹	10 ⁻² histidín ⁹
pH	3,5	4,5	6,0	6,0
Aditívum MHEC ³ [%]	0,1	0,1	0,1	0,1
Zakončujúci elektrolyt ⁴	kyselina octová ⁶	kyselina kaprónová ⁸	kyselina kaprónová ⁸	kyselina morfo- línétánsulfónová ¹⁰
<i>c</i> [mol . dm ⁻³]	5 . 10 ⁻³	5 . 10 ⁻³	5 . 10 ⁻³	5 . 10 ⁻³ mol . dm ⁻³ histidín ⁹ pH 5—6

MHEC — metylhydroxyetylcelulóza; Methylhydroxyethylcellulose.

¹Leading electrolyte; ²Counterion; ³Additive MHEC; ⁴Terminating electrolyte; ⁵ β -Alanine; ⁶Acetic acid; ⁷ ϵ -Aminocaproic acid; ⁸Caproic acid; ⁹Histidine; ¹⁰Morpholineethanesulphonic acid.

júceho elektrolytu. Pri posudzovaní možnosti separácie jednotlivých štandardov bolo výhodné ich vizuálne pozorovanie priamo v kolóne, čo pomáhalo pri určovaní poradia farebne odlišných farbív. V elektrolytických systémoch ES I až ES IV sa namerali hodnoty charakteristických konštánt k_x syntetických farbív, uvedených v tab. 2. Z pozorovania charakteristických konštánt jednotlivých štandardov syntetických farbív je zrejmé, že patentná modrá a azorubín majú tieto konštanty dostatočne rozdielne a môžu sa potencionálne oddeľovať od všetkých ostatných farbív, pri ktorých bude ich rozdelenie vzhľadom na veľmi blízke k_x problematickejšie a bude musieť byť doplnené ešte inými metódami (napr. papierovou chromatografiou).

Počas meraní sme pozorovali, že zóna zakončujúceho elektrolytu bola zafarbená mierne do červena. Ďalšími meraniami sme zistili, že to spôsobuje erytrozín, ktorý má menšiu pohyblivosť ako použitý zakončujúci elektrolyt.

Tieto merania a pozorovania viedli k zisťovaniu možnosti separácie jednotlivých farbív v zmesiach po dvoch, každé s každým, s cieľom získať čo najviac informácií o oddelení jednotlivých syntetických farbív a s konečným cieľom zostaviť modelovú zmes čo najväčšieho počtu takých farbív, ktoré sa od seba v jednotlivých elektrolytických systémoch oddeľujú.

V tab. 3 sú uvedené výsledky iba v elektrolytickom systéme ES I, kde sú oddeliteľné farbivá označené znamienkom +, farbivá, ktoré za daných podmienok vytvárajú zmesnú zónu, znamienkom —.

Pri práci so syntetickými farbivami sme zistili prípady, kedy sme vizuálne v kolóne prístroja pozorovali dokonalú separáciu dvojice farbív, avšak detektor

Tabuľka 2. Hodnoty charakteristických konštánt k_x syntetických farbív v ES I—ES IV
Table 2. Relative step height values k_x for synthetic dyes in ES I—ES IV

Syntetické farbivá ¹	k_x			
	ES I	ES II	ES III	ES IV
Tartrazín ²	0,184	0,270	0,572	0,285
Žltá SY ³	0,200	0,285	0,560	0,290
Košenilová červená ⁴	0,196	0,272	0,565	0,283
Amarant ⁵	0,191	0,266	0,554	0,262
Azorubín ⁶	0,268	0,309	0,756	0,423
Patentná modrá ⁷	0,320	0,434	0,825	0,464
Brilantná čierna BN ⁸	0,190	0,269	0,585	0,273
Indigotín ⁹	0,202	0,276	0,562	0,284
Erytrozín ¹⁰	—	—	—	—

k_x = r.s.h. = relatívna výška skoku; Relative step height.

$k_x = h_x/h$

h_x — vzdialenosť meraná od línie vodiaceho iónu po líniu prislúchajúcej látke x ; Distance measured from the leading ion line to the line representing the zone of sample x .

h — vzdialenosť od línie vodiaceho iónu po líniu zakončujúceho iónu; Distance between leading ion line and terminating ion line.

¹Synthetic dyes; ²Tartrazine; ³Yellow SY; ⁴Cochineal Red; ⁵Amaranth; ⁶Azorubin; ⁷Patent Blue;

⁸Brilliant Black BN; ⁹Indigotin; ¹⁰Erythrosin.

Tabuľka 3. Možnosti separácie dvojíc syntetických farbív v ES I
Table 3. Separation possibilities for couples of synthetic dyes in ES I

	Tartrazín ¹	Košene- lová červená ²	Ama- rant ³	Žltá SY ⁴	Patentná modrá ⁵	Azoru- bín ⁵	Indigo- tín ⁷	Brilantná čierna BN ⁸
Tartrazín ¹		—	—	+	+	+	x	—
Košeneľová červená ²	—		—	+	+	+	x	—
Amarant ³	—	—		x	+	+	x	—
Žltá SY ⁴	+	+	x		+	x	—	+
Patentná modrá ⁵	+	+	+	+		+	+	+
Azorubín ⁶	+	+	+	x	+		+	+
Indigotín ⁷	x	x	x	—	+	+		+
Brilantná čierna BN ⁸	—	—	—	+	+	+	+	

¹Tartrazine; ²Cochineal Red; ³Amaranth; ⁴Yellow SY; ⁵Patent Blue; ⁶Azorubin; ⁷Indigotin; ⁸Brilliant Black BN.

túto skutočnosť nezachytil; zistilo sa to najmä v zmesiach s indigotínom. Diferenciálny ani lineárny zapisovač nezachytí, že idú za sebou dve zóny, najmä pri nižších koncentráciách. Je to spôsobené tým, že rozdiel pohyblivosti jednotlivých farbív je veľmi malý, postačujúci síce na separáciu farbív, ale pod prahom citlivosti detektora. Zmesi, pri ktorých dochádza k uvedenému javu boli označené x. Aj z tohto dôvodu by bol pri analýze syntetických farbív logicky oveľa výhodnejší selektívny fotometrický detektor vo viditeľnej oblasti spektra.

V ES I možno rozdeliť zmes farbív, pozostávajúcich maximálne zo štyroch farbív, ktorých jednotlivé kombinácie sú uvedené v tab. 4.

Tabuľka 4. Rozseparovateľná štvorica syntetických farbív v ES I
Table 4. Separable tetrads of synthetic dyes in ES I

azorubín—patentná modrá—žltá SY—tartrazín ¹
azorubín—patentná modrá—žltá SY—košenilová červená ²
azorubín—patentná modrá—žltá SY—brilantná čierna BN ³
azorubín—patentná modrá—žltá SY—amarant ⁴
azorubín—patentná modrá—aramant—indigotín ⁵
indigotín—patentná modrá—azorubín—brilantná čierna BN ⁶

¹Azorubin—Patent Blue—Yellow SY—tartrazine;

²Azorubin—Patent Blue—Yellow SY—Cochineal Red;

³Azorubin—Patent Blue—Yellow SY—Brilliant Black BN;

⁴Azorubin—Patent Blue—Yellow SY—Amaranth;

⁵Azorubin—Patent Blue—Amaranth—Indigotin;

⁶Indigotin—Patent Blue—Azorubin—Brilliant Black BN.

Meraniami sa zistilo, že pomocou vodivostného detektora možno zaznamenať len jednu štvoricu syntetických farbív (indigotín—patentná modrá—azorubín—brilantná čierna BN), pretože dvojice azorubín—žltá SY a indigotín—amarant zapisovač nezachytí a sú označené x.

V ES II sa zistili podobné výsledky s tým rozdielom, že dvojice azorubín—žltá SY a indigotín—amarant tvoria zmesné zóny, dvojica brilantná čierna BN—indigotín je označená x, čiže možno od seba oddeliť maximálne zmesi pozostávajúce z troch farbív. ES III je od ES II odlišný iba tým, že zmesnú zónu tvoria aj brilantná čierna—indigotín, dvojicu košenilová červená—indigotín zachytí aj zapisovač a dvojice indigotín—amarant a indigotín—azorubín sa síce rozdeľia, ale detektor ich nezaregistruje. V ES IV sa dajú tiež vedľa seba stanoviť maximálne zmesi troch syntetických farbív.

Preto sa na analýzu vzoriek, v ktorých sú syntetické farbivá, odporúča elektrolytický systém ES I, ktorého zloženie je uvedené v tab. 1. Aj vzhľadom na to, že na väčšinu prifarbovaných vzoriek (napr. pudigrové prášky, práškové nápoje) sa používajú jedno až tri rôzne syntetické farbivá, ktoré sú v danom

elektrolytickom systéme rozdelené a identifikované. Najpoužívanejšie sú zrejme farbivá tartrazín, amarant, azorubín, žltá SY a košenilová červená.

Je známe, že sa prifarbujú rôzne potravinárske výrobky (kvapalné, práškové), ale nie každý takto upravený výrobok možno ihneď analyzovať kapilárnou izotachoforézou. Takmer z každého prifarbovaného potravinárskeho výrobku treba najprv syntetické farbivá izolovať. Preto sme preskúšali rôzne metódy izolácie syntetických farbív:

- Syntetické farbivá z práškových pudingov sa extrahovali zmesou metanol — NH_4OH (95 : 5). Spojené extrakty sa zahustili na vodnom kúpeli a doplnili redestilovanou vodou na objem 10 až 25 cm^3 . Bol to najjednoduchší a najrýchlejší spôsob priamej extrakcie, ktorá sa dá použiť iba pri tuhých vzorkách, pretože metanol a amoniak sú dobre miešateľné s vodou. Takto získané extrakty môžeme priamo použiť jednak na papierovú chromatografiu, jednak na kapilárnu izotachoforézu. Takýto postup nie je úplne kvantitatívny, straty vznikajú extrakciou a filtráciou. Na elimináciu tejto nepresnosti sa použila metóda štandardného prídavku. Do paralelného stanovenia sa pridal štandardný prídavok syntetického farbiva a skutočné množstvo farbiva vo vzorke sa potom vypočíta podľa vzorca, ktorý odporúča Park [12]:

$$m_s = m_1 \frac{m_3}{m_2 - m_1},$$

kde m_s je skutočné množstvo syntetického farbiva vo vzorke, m_1 je množstvo syntetického farbiva vo vzorke bez štandardného prídavku, m_2 je množstvo syntetického farbiva vo vzorke so štandardným prídavkom, m_3 je množstvo štandardného prídavku.

- Na izoláciu syntetických farbív z kvapalných vzoriek je vhodná extrakcia do *n*-amylalkoholu. Takto získané extrakty sú vhodné pre papierovú chromatografiu, avšak použitie extraktov na izotachoforetickú analýzu je problematické. Pri extrakcii sa totiž používa kyselina chlorovodíková a keďže chloridy sa nachádzajú aj vo všetkých vodiacich elektrolytoch, ich nadbytok sa prejaví tým, že kolónou budú tiecť chloridové ióny zo vzorky, zatiaľ čo vzorka sama ostane v dávkovacom kohúte.
- Adsorpcia syntetických farbív na odtučnené vlnené vlákno bola metóda časovo veľmi náročná a ako sme sa presvedčili, nie je kvantitatívna. Preto sme touto metódou ďalej syntetické farbivá zo vzoriek neizolovali.
- Lepšie výsledky izolácie syntetických farbív sme získali pri použití adsorpcie na polyamidové granuly. Pri práci so štandardnými roztokmi jednotlivých farbív sme zistili, že polyamidové granuly sú za určitých podmienok schopné kvantitatívne adsorbovať syntetické farbivá. Množstvo neadsorbovaného farbiva sa dá zvyšovať najmä zvýšením množstva adsorpčného materiálu. Do banky

sme k 50 cm³ vzorky pridávali 2,5 cm³ kyseliny octovej a 25 g presne odvážených polyamidových granúl. Banka bola na trepačke 20 minút. Ak roztok nad granulami nebol číry, pridalo sa ďalšie množstvo (1 až 5 g) granúl. Postup sa opakoval dovtedy, kým sa nedosiahla kvantitatívna adsorpcia syntetických farbív na granuly. Potom sa granuly premyli redestilovanou vodou a preskúšali rôzne spôsoby extrakcie farbív z granúl. Vyskúšali sa rôzne množstvá týchto extrakčných zmesí: 2 % roztok amoniaku vo vode, etanol — NH₄OH (95 : 5), metanol — NH₄OH (90 : 10), ale ani v jednom prípade sa nepodarilo úplne odstrániť farbivo z absorpčného materiálu. Preto sme sa rozhodli zistiť, aké množstvo farbiva ostane za štandardných podmienok naadsorbovaných na jednotkovej hmotnosti adsorbenta. Pracovali sme so štandardmi syntetických farbív, extrakčné činidlo bola zmes metanol — NH₄ (95 : 5). Množstvo pevne naadsorbovaného farbiva sme zistili izotachoforeticky z rozdielu množstva farbiva pred adsorpciou a po jeho elúcii z adsorbenta. Sledovali sme kvantitatívnu adsorpciu farbív pri laboratórnej teplote, zvyšovaním množstva adsorbenta a následným prepočítaním množstva nevyextrahovaného farbiva na jednotkovú hmotnosť adsorbenta. V tab. 5 je uvedený výsledok merania a množstvo nevyextrahovaného farbiva — tartrazínu. Z meraní vybraných syntetických farbív sa zistilo, že množstvo nevyextrahovaného farbiva z polyamidových granúl bolo napr. 7,3 % tartrazínu, 13,6 % amarantu a 7,5 % košenilovej červenej.

Tabuľka 5. Množstvo nevyextrahovaného tartrazínu z polyamidových granúl
Table 5. Unextracted tartrazine amount coming from polyamide granules

Koncentrácia štandardného roztoku ¹ [mg · dm ⁻³]	Hmotnosť adsorbenta ² [g]	Množstvo extrakčného činidla ³ [cm ³]	Množstvo nevyextrahovaného farbiva <i>F</i> [mg · 10 g ⁻¹ absorb.]
25	25	150	0,084
25	25	150	0,077
25	25	150	0,089
25	25	150	0,082
25	35	250	0,079

$\bar{F} = (0,082 \pm 0,006) \text{ mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \text{ adsorbenta}$,

$l(\%) = (K_n R / \bar{x}) 100$ [13],

kde $R = x_{\max} - x_{\min}$, $l(\%)$ — relatívna šírka intervalu; Relative width of confidence interval, K_n tabelovaná hodnota (0,51), $l = 7,3 \%$.

¹Standard solution concentration; ²Adsorbent weight; ³Extractant quantity; ⁴Unextracted dye *F* quantity.

Pri analýze reálnych vzoriek, kde sú prítomné syntetické i prírodné farbivá, musíme najprv odstrániť zo vzorky prírodné farbivá, napr. vyzrážaním octanom olovnatým, aby vzorka neostávala zafarbená prírodnými farbivami. Na stanovenie syntetických farbív v potravinárskych výrobkoch kapilárnou izotachofo-

rézou treba najprv stanoviť kvalitatívne zloženie vzorky napr. papierovou chromatografiou, prípadne použiť niektorú z uvedených metód izolácie syntetických farbív zo vzorky. V takýchto prípadoch by kapilárna izotachoforéza pomohla ich rýchlemu stanoveniu, kde by čas analýzy bol 30 až 40 minút.

Literatúra

1. ROSIVAL, L.—SZOKOLAY, A.: Cudzorodé látky v požívatinách. Martin, Osveta 1983.
2. RIAZUDDIN, Y.—SHAKOORI, A. R.—NAWAZ, Z., Pak, J. Zool., 18, 1986, s. 317.
3. COMBES, R. D., Arch. Toxicol., 59, 1986, s. 67.
4. VARGOVÁ, M., Česk. Hyg., 31, 1986, s. 36.
5. DAVÍDEK, J.: Laboratórní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1977.
6. SPEARS, K.—MARSHALL, J., J. Assoc. Public. Anal., 25, 1987, s. 47.
7. REYNOLDS, S. L.—SCOTTER, M. J.—WOOD, R., J. Assoc. Public. Anal., 26, 1988, s. 7.
8. KARANY, K.—GASZTONYI, K., Elelm.-Vizsg. Közlem., 33, 1987, s. 108.
9. YE, S.—HAN, H.—CHEM, Y., Shipin Kexue, 67, 1985, s. 48.
10. BOČEK, P.—DEML, M.—GEBAUER, P.—DOLNÍK, V.: Analytická kapilární izotachoforéza. Brno, ČSAV 1986.
11. HJALMARSSON, S. G.—BALDESTEN, A.: A critical review of capillary isotachopheresis, reprint from CRS Critical Reviews in Analytical Chemistry. Bromma 1981, s. 261.
12. PARK, H. K., Han'guk Nogхва Hakhoechi, 30, 1987, s. 201.
13. ECKSCHLAGER, K.—HORSÁK, I.—KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha, SNTL 1980.

Do redakcie došlo 10. 2. 1992

Capillary isotachopheresis utilization for the determination of some synthetic dyestuffs

Summary

In recommended electrolyte system (ES I) some synthetic dyes (e.g. Tartrazine, Yellow SY, Azorubin) most frequently present in bedyed food product, were separated and subsequently identified. Good results in synthetic dyestuffs isolation were achieved by adsorption on polyamide granules.

Использование капиллярной изотахофорези для определения некоторых синтетических пигментов

Резюме

В рекомендованной электролитической системе ES I были распределены и идентифицированы некоторые синтетические пигменты (например татразин, желтая SY, азорудин), которые больше всего встречаются в подкрашенных пищевых продуктах. Хорошие результаты изоляции синтетических пигментов были достигнуты адсорбцией на полиамидных гранулах.