

Príspevok k spektrofotometrickým metódam stanovenia chinínu v tonizujúcich nápojoch

MILAN SUHAJ

Súhrn. V príspevku sa porovnáva priama spektrofotometrická fluorimetrická a extračno-spektrofotometrická metóda stanovenia chinínu v špeciálnych tonizujúcich nápojoch. Priama spektrofotometria pri vlnovej dĺžke 347,5 nm, odporúčaná pre bezfarebné nápoje, ukázala sa ako nespoľahlivá, pretože ignoruje vplyv absorbujúceho pozadia alebo iných rušivých vplyvov, čo sa výrazne prejavilo napr. v nápoji Mirinda, kde bola chyba stanovenia väčšia ako 20 %. Modifikácia tejto metódy pomocou derivačnej spektrofotometrie úplne eliminovala tieto nedostatky a viedla k štatistickej porovnateľnosti so štandardnou fluorimetrickou metódou.

Chinín, alkaloid z kôry chinínovníka (*Cinchoza succirubra*), ako modifikátor horkej chuti sa uplatňuje pri výrobe alkoholických a nealkoholických nápojov typu tonic. Používa sa aj ako chemoterapeutikum proti malárii. Má antipyretický a uterotonický účinok, preto jeho použitie obmedzujú hygienické predpisy [1]. Najvyššie prípustné množstvo chinínu v obyčajných nápojoch je 10 mg · kg⁻¹, v špeciálnych nápojoch, nevhodných pre tehotné ženy a deti, 50 mg · kg⁻¹. Na malospotrebitelskom balení musí byť prítomnosť chinínu vo výrobkoch deklarovaná.

Na stanovenie chinínu v bezfarebných nealkoholických nápojoch sa odporúča priama spektrofotometrická metóda pri vlnovej dĺžke 347,5 nm [2]. Pri farebných nápojoch treba chinín izolovať extrakčným spôsobom a stanoviť potom spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 251 nm alebo fluorimetricky pri vlnovej dĺžke 350 nm [2]. Zahraničné metódy na stanovenie chinínu v požívatinách uprednostňujú stanovenie v UV oblasti spektra [3]. Z progresívnejších metód chromatografického stanovenia v našich podmienkach možno uviesť metódu HPLC vypracovanú na spoločné stanovenie chinínu, kofeínu, kyseliny sorbovej a benzoovej v nealkoholických nápojoch, pričom stanovenie prebieha izokraticky na reverzných fázach SIC₁₈ [4]. Záväznou metódou je ČSN 56 0240

[5], podľa ktorej sa chinín stanovuje priamou fluorimetriou po príslušnom riedení kyselinou sírovou, resp. v prítomnosti rušivých látok (ióny Cl^- , farbivá a dispergujúce látky) stanoveniu predchádza extrakcia.

V tomto príspevku navzájom porovnávame odporúčané spektrofotometrické metódy v ultrafialovej, viditeľnej oblasti spektra a fluorimetrickú metódu priameho stanovenia alebo po extrakcii chinínu z tonizujúcich nápojov. Uvádzame tu aj výsledky efektu modifikácie spektrofotometrických metód pomocou derivačnej spektrofotometrie na odstránenie rušivých vplyvov a správnosť pôvodného stanovenia.

Materiál a metódy

Chinín v nealkoholických nápojoch sme pomocou dvojúčového spektrofotometra Specord M40 (Carl Zeiss, Jena) stanovovali týmito spektrofotometrickými a luminiscenčnými metódami:

1. priama spektrofotometria pri vlnovej dĺžke 347,5 nm [2] po 1,4-násobnom zriedení vzoriek zmesou kyseliny chlorovodíkovej ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a fosforečnej (25 %) v pomere 1 : 1, meranie v 1 cm kremennej kyvete oproti destilovanej vode pri spektrálnej šírke štrbiny 0 cm^{-1} , integračnom čase 1 s a zosilnení 1; analytická čiara pre referenčný roztok chinínu $y = 76,63x - 0,025$ (koeficient korelácie $r_{xy} = 0,999$), pričom y je koncentrácia chinínu v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a x absorbancia pri 347,5 nm;

2. extrakcia chloroformom a reextrakcia do roztoku kyseliny sírovej ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) [2] a

- a) spektrofotometrické stanovenie v ultrafialovej oblasti spektra proti kyseline sírovej ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); analytická čiara pre štandardný roztok chinínu $y = 13,95x - 0,006$ ($r_{xy} = 0,999$);

- b) fluorimetrické stanovenie excitovanej fluorescence pri vlnovej dĺžke 350 nm za podmienok: fluorescenčný nástavec k Specordu M40; filter excitačného žiarenia WK 38; porovnávací štandard GVD 37—79 (GG 17); fluorescenčná kremenná kyveta 1 cm; analytická čiara pre štandardný roztok chinínu v roztoku kyseliny sírovej ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) $y = 0,225x - 0,929$ ($r_{xy} = 0,993$), kde y je koncentrácia chinínu v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a x transmisia vzorky (%) pri vlnovej dĺžke excitačného žiarenia 350 nm;

3. derivačná spektrofotometria vzoriek upravených podľa postupu 1 a 2a pomocou programovej kazety Data Handling I za podmienok

- a) pri priamej spektrofotometrii: rozsah vlnových dĺžok 260—400 nm; spektrálna šírka štrbina 0 cm^{-1} ; integračný čas 1 s; zosilnenie 2 a rýchlosť zápisu $2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$; 2. derivácia a násobenie signálu derivácie konštantou 50; analytická

čiaru štandardného roztoku chinínu $y = 111,9x + 0,595$ ($r_{xy} = 0,999$), kde x je hodnota druhej derivácie pri 354 nm násobená hodnotou 50;

b) pri spektrofotometrii v UV oblasti spektra po extrakcii chloroformom; rozsah vlnových dĺžok 210—300 nm; spektrálna šírka štrbiny 0 cm^{-1} ; integračný čas 2 s; zosilnenie 1; rýchlosť zápisu $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$; 2. derivácia a násobenie derivovaného záznamu konštantou 20; analytická čiara štandardu $y = 24,32x + 0,015$ ($r_{xy} = 0,999$), kde x je hodnota 2. derivácie pri vlnovej dĺžke 253 nm, násobená hodnotou 20;

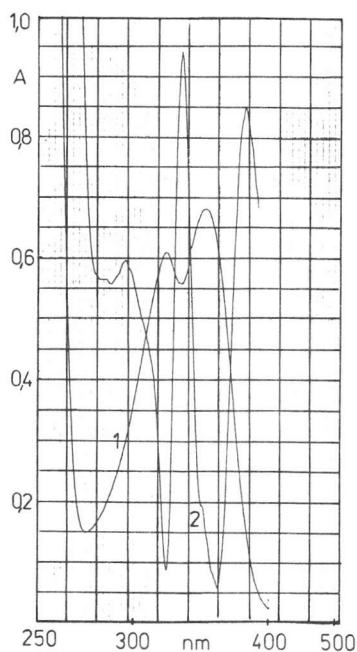
4. priama fluorimetria nealkoholických nápojov po 2—6-násobnom zriedení nápojov roztokom kyseliny sírovej ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) s podmienkami merania ako v 2b.

Na zhotovenie analytických čiar a na štandardný prídavok chinínu do niektorých vzoriek sme použili chinín podľa Čs. liekopisu. Korekcia pozadia pri spektrofotometrických meraniach sme realizovali programom Auto-Zero, resp. matematickým odčítaním spektra pozadia pomocou programovej kazety Data-Handling I.

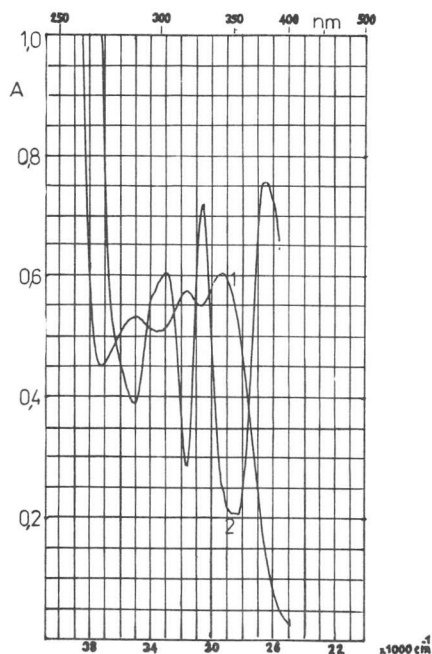
Chinín sme stanovili v týchto tonizujúcich nápojoch: Mirinda tonic (s povolením Pepsico Inc., N. Y., vyrába Frucona, závod Košice, resp. Slovlik, š. p., závod Malacky); Chito tonic (ON 56 7970, Slovslad Trnava); Aro tonic (Nealkoholické nápoje, k. p., Olomouc); Fruta tonic (pasterizovaný nápoj, ON 56 7874, Fruta, k. p., Brno, závod Modřice); Original River Indian Tonic Water (PN 1/81, Nealkoholické nápoje, s. p., Olomouc v spolupráci s firmou Dana Mirna, SFRJ, stabilizovaný benzoanom sodným). Výťažnosť stanovenia sme zisťovali v modelovom roztoku pozostávajúcom zo 6 % sacharózy (podľa hodnoty obsahu cukru v tonizujúcich nápojoch [6]) a 0,03 % kyseliny citrónovej (pH matrice 2,95), ako aj v bezchinínovom tonizujúcom nápoji Spreequell Bitter Tonic (VEB Getränkekombinat Berlin, PB Spreequell). Vzorky sme zbavili oxidu uhličitého pomocou ultrazvuku (1 min) na zariadení Ultrasonic Compact Cleaner UC 005AJ1 (Tesla, ČSFR).

Výsledky a diskusia

Výsledky stanovenia chinínu ultrafialovou, viditeľnou a luminiscenčnou spektroskopiou v niektorých tonizujúcich nápojoch dostupných na našom trhu uvádzame v tab. 1. Výsledky testovania správnosti týchto metód v modelových podmienkach a v nápojoch sú v tab. 2. Obrázok 1 znázorňuje absorpčné spektrum štandardného roztoku chinínu v zmesi kyselín a jeho 2. deriváciu, obr. 2 absorpčné spektrum a jeho 2. deriváciu nápoja Mirinda a obr. 3 excitačné

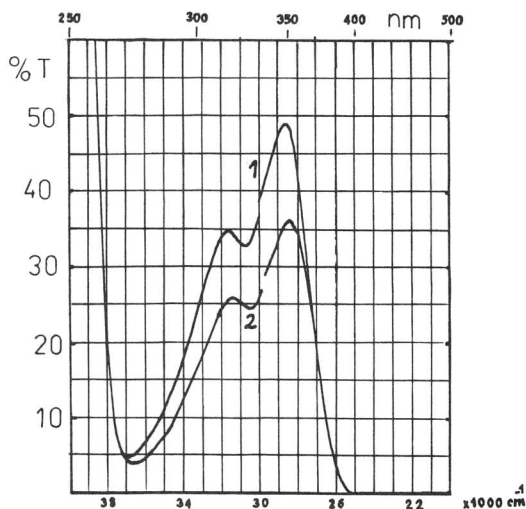


Obr. 1. 1 — absorpčné spektrum štandardného roztoku chinínu $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v zmesi kyseliny chlorovodíkovej ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 25 % kyseliny fosforečnej (1 : 1), merané proti destilovanej vode, 2 — druhá derivácia absorpčného spektra.
Fig. 1. 1 — Absorption spectrum of a standard quinine solution 50 mg l^{-1} in the mixture of both hydrochloric acid (1 mol l^{-1}) and 25% phosphoric acid (1 : 1) measured against distilled water, 2 — second-order derivative of absorption spectrum.



Obr. 2. 1 — absorpčné spektrum nápoja Mirinda, riedenie 1,4-krát zmesou kyseliny chlorovodíkovej ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 25 % kyseliny fosforečnej (1 : 1), merané proti destilovanej vode, 2 — druhá derivácia absorpčného spektra.

Fig. 2. 1 — Absorption spectrum of Mirinda beverage 1.4-fold diluted using the mixture of hydrochloric acid (1 mol l^{-1}) with 25% phosphoric acid (1 : 1), measured against distilled water, 2 — second-order derivative of absorption spectrum.



Obr. 3. Excitačné spektrum chinínu v roztoku kyseliny sírovej ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$). 1 — štandardný roztok chinínu $7,5 \text{ mg.l}^{-1}$, 2 — nápoj Chito tonic, riedenie 6,66-krát.

Fig. 3. Excitation spectrum of quinine in sulphuric acid solution ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$). 1 — standard quinine solution 1.5 mg.l^{-1} , 2 — Chito tonic beverage, 6.66-fold dilution.

spektrum chinínu a nápoja Chito tonic v roztoku kyseliny sírovej. Excitačné spektrá sme získali meraním závislosti celkovej intenzity fluorescencie chinínu od vlnovej dĺžky excitačného žiarenia.

Získané výsledky stanovenia chinínu v sledovaných nápojoch podľa uvedených metód (tab. 1) porovnávame s metódou priamej fluorimetrie, resp. fluorimetrickým stanovením po predchádzajúcej extrakcii, z ktorých vychádza aj ČSN 56 0240. Väčšina spektroskopických stanovení, ktorým predchádzala extrakcia, mala o niečo nižšie výsledky ako ostatné metódy v dôsledku strát pri extrakcii a reextrakcii chinínu do rozpúšťadla. V prípade stanovenia chinínu v nápoji Mirinda metódou priamej spektrofotometrie pri vlnovej dĺžke $347,5 \text{ nm}$, ktorá sa pre bezfarebné nápoje odporúča [2], zisťujeme v porovnaní s fluorimetrickou metódou vysokú chybu, ktorá zaťažuje výsledok o viac ako 20 %. Negatívny vplyv absorpcie pozadia, ktorý sa v menšej miere prejavil aj pri ostatných nápojoch, podarilo sa nám účinne potlačiť metódou derivačnej spektrofotometrie pri vlnovej dĺžke $347,5 \text{ nm}$, pričom sme získali hodnoty veľmi dobre porovnateľné s výsledkami luminiscenčnej analýzy (tab. 1). Vo väčšine tonizujúcich nápojov sa dajú zistené výsledky podľa tejto modifikácie štatisticky porovnať s metódou priamej fluorimetrie, pričom rozdiel testovaných priemerých výsledkov (Lordov test) bol štatisticky nevýznamný pri hladinách významnosti $\alpha = 0,05$ a $0,01$.

Tabuľka 1. Stanovenie chinínu v tonizujúcich nápojoch spektrofotometrickými metódami ($n = 3$)
 Table 1. The quinine determination in various tonic beverages using spectroscopic methods ($n = 3$)

Vzorka ¹	Priama spek- trofotometria pri 347,5 nm ⁷	Derivačná spek- trofotometria pri 347,5 nm ⁸	Extrakcia, spektrofotomet. pri 251 nm ⁹	Extrakcia, 2. derivácia pri 251 nm ¹⁰	Extrakcia, fluorimetria pri 350 nm ¹¹	Priama fluorimetria pri 350 nm ¹²
	chinín ¹³ [mg . l ⁻¹] (s_R)					
Chito ²	49,8 (0,18)	49,2 (0,47)	44,4 (0,21)	44,0 (0,02)	47,9 (0,17)	48,9 (0,30)
Aro ³	18,2 (0,14)	16,3 (0)	17,1 (0,43)	15,9 (0)	13,4 (0,12)	16,5 (0,12)
River Indian ⁴	46,6 (0,12)	44,5 (0,47)	37,5 (0,18)	37,3 (0)	39,1 (0,12)	43,9 (0,20)
Fruta ⁵	49,8 (0,08)	46,6 (0,47)	44,8 (0,14)	42,9 (0,24)	46,6 (0,65)	46,9 (0,18)
Mirinda ^{6*}	62,2 (0,38)	48,8 (1,06)	47,5 (0,15)	46,8 (0)	51,3 (0,45)	49,8 (0,12)

s_R = smerodajná odchýlka určená z rozpätia; Standard deviation determined from an interval.

* Vzorky Mirindy odobraté v rôznych časových intervaloch od 3. 5. do 18. 6. 1990; Mirinda samples collected within different time intervals from May 3 to June 18, 1990.

1 — Sample, 2 — 6 — marks of various tonic beverages, 7 — Direct spectrophotometry at 347.5 nm, 8 — Derivative spectrophotometry at 347.5 nm, 9 — Extraction, spectrophotometry at 251 nm, 10 — Extraction, second-order derivative at 251 nm, 11 — Extraction, fluorometry at 350 nm, 12 — Direct fluorometry at 350 nm, 13 — Quinine.

Tabuľka 2. Výťažnosť spektrofotometrických metód stanovenia chinínu v modelových a tonizujúcich nápojoch ($n = 3$)
Table 2. Efficiency of spectrophotometric methods of quinine determination in modelling beverages, as well as in tonics ($n = 3$)

Vzorka ¹	Priama spek- trofotometria pri 347,5 nm ⁸	Derivačná spek- trofotometria pri 347,5 nm ⁹	Extrakcia, spektrofotomet. pri 251 nm ¹⁰	Extrakcia, 2. derivácia pri 251 nm ¹¹	Extrakcia, fluorimetria pri 350 nm ¹²	Priama fluorimetria pri 350 nm ¹³
	chinín ¹⁴ [mg · l ⁻¹] (s_R) výťažnosť ¹⁵ [%]					
matrica ²	1,6 (0,09)	0	0,21 (0,01)	0	0	0
matrica + chinín ³ (51 mg · l ⁻¹)	<u>52,6 (0,14)</u> 103,1	<u>50,6 (0)</u> 99,2	<u>47,0 (0,17)</u> 92,1	<u>47,2 (0)</u> 92,5	<u>50,8 (0,18)</u> 99,6	<u>52,6 (0,11)</u> 103,1
Spreequell ⁴	1,96 (0,06)	0	1,41 (0,59)	0	0	0
Spreequell + chinín ⁵ (50 mg · l ⁻¹)	<u>51,1 (0,23)</u> 102,2	<u>49,9 (0,57)</u> 99,8	<u>46,4 (0,34)</u> 92,8	<u>45,3 (0,02)</u> 90,6	<u>47,0 (0,04)</u> 94,0	<u>49,3 (0,15)</u> 98,6
Fruta ⁶	49,8 (0,08)	46,6 (0,47)	44,8 (0,14)	42,9 (0,24)	46,6 (0,65)	46,9 (0,18)
	73,9 (0,07)	70,8 (0,18)				74,1 (0,34)

Správnosť overovaných spektrálnych metód stanovenia chinínu v nápojoch sme testovali v modelovom roztoku sacharózy a kyseliny citrónovej, bezchinínovom tonizujúcom nápoji Spreequell Bitter Tonic a v nápoji Fruta tonic po štandardnom prídavku (tab. 2). V modelových podmienkach dosiahnutá výťažnosť stanovenia derivačnou metódou bola 99,2 % v prípade matrice, 99,8 % v bezchinínovom nápoji a v nápoji Fruta dosiahnutá výťažnosť bola lepšia ako v prípade štandardnej metódy fluorimetrického stanovenia. Modifikácia derivačnej spektrofotometrie poskytuje štatisticky nevýznamné rozdiely medzi skutočným a stanoveným obsahom chinínu v modelových vzorkách pri $\alpha = 0,05$ a $0,01$, v nápoji Fruta pri $\alpha = 0,01$. Ako sme uviedli, veľkým prínosom tejto metódy je riešenie problému správnosti pri priamej spektrofotometrii v bezfarebných nápojoch typu Mirinda. Dobrý výsledok sa zistil aj v nápoji Original River Indian Tonic Water, hoci je stabilizovaný benzoanom sodným. Medzu stanovenia v nápoji Bitter Tonic pomocou derivačnej spektrofotometrie sme zistili pri $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, medzu dôkazu pri $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Analogická metóda derivačnej spektrofotometrie v UV oblasti spektra pri vlnovej dĺžke 253 nm po extrakcii chinínu zo vzoriek viedla k nižším výťažkom stanovenia, pretože výsledky sú zaťažené chybou samej extrakčnej metódy (stratami), pričom sám extrakčný postup nahrádza matematické „vyizolovanie“ sledovanej látky zo vzorky, v dôsledku čoho následné derivovanie už nemá zmysel a je zbytočné.

Záverom možno konštatovať, že zistené obsahy chinínu v sledovaných nápojoch typu tonic sú v súlade s požiadavkami na maximálne tolerovateľnú koncentráciu podľa hygienických predpisov [1]. Modifikácia priamej spektrofotometrickej metódy na stanovenie chinínu v tonizujúcich nápojoch pomocou derivačnej spektrofotometrie predstavuje veľmi jednoduchú a rýchlu metódu (čas analýzy niekoľko minút), ktorá skvalitňuje odporúčanú pôvodnú metódu stanovenia a umožňuje jej bezpečné použitie pre u nás vyrábané bezfarebné nápoje tonizujúceho charakteru najmä v prípade, keď nemáme k dispozícii luminiscenčnú analýzu. Preto môže dobre poslúžiť ako jedna z perspektívne využívaných metód v rámci programu monitorizácie cudzorodých látok v potravinách.

Literatúra

1. Záväzné opatrenia č. 35: Hygienické požiadavky na cudzorodé látky v potravinách. Vestník MZd SSR, č. 19—20, 1977.
2. DAVÍDEK, J. a kol.: Laboratórni príručka analýzy potravín. 2. vyd. Praha, SNTL; Bratislava, Alfa 1981. 718 s.
3. Official Methods of AOAC, 11th ed. Washington, AOAC 1970, 1094 s.
4. BARTKO, A.—KNISEL, L., Kvasný Prům., 34, 1988, č. 11, s. 325.

5. ČSN 56 0240. Metody zkoušení nealkoholických nápojů. 11. část. Stanovení chininu. Schválena 11. 1976.
6. STUDNICKÝ, J.: Přehľad potravinárskych technológií. Bratislava, Alfa; Praha, SNTL 1979. 337 s.

Do redakcie došlo 25. 6. 1990

К спектрофотометрическим методам определения хинина в тонизирующих напитках

Резюме

В статье сравниваются прямой спектрофотометрический, флуорометрический и экстракционно-спектрофотометрический метод определения хинина в специальных тонизирующих напитках. Прямая спектрофотометрия при длине волны 347,5 нм, рекомендована для безцветных напитков, оказалась ненадёжной потому, что она игнорирует влияние абсорбирующего фона или других посторонних влияний, что значительно проявлялось напр. в напитке Миринда, где ошибка определения была более 20 %. Модификация этого метода с помощью деривационной спектрофотометрии вполне элиминировала эти недостатки и привела к статистической сравнимости со стандартным флуорометрическим методом.

Contribution to spectrophotometric methods of quinine determination in tonic beverages

Summary

The direct spectrophotometric method and fluorometric method and extractive-spectrophotometric method of quinine determination in special tonic beverages are compared each other in this paper.

The direct spectrophotometry at the wave length of 347.5 nm which is recommended for colourless beverages, was found unreliable, because it ignores the effect of an absorbating background or some other disturbing effects. This fact has been highly marked in Mirinda beverage where the determination error was more than 20%. Drawbacks of this method have been completely eliminated using the modification by means of derivative spectrophotometry. Then this method could be compared with a standard fluorometric method.