

Zadanie 4.

Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii ciekowej do oznaczania benzoesu sodu w produktach przemysłowych

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

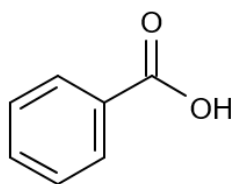
1. Wstęp

Sezonowe występowanie niektórych produktów spożywczych oraz ich mała trwałość, skłoniły człowieka do opracowania sposobów pozwalających na przedłużenia ich przydatności do spożycia. Od dawna w gospodarstwach domowych do utrwalania żywności stosowano: naturalne chłodzenie, suszenie, solenie, wędzenie czy też fermentację. Natomiast w miarę rozwoju cywilizacji doskonalono istniejące i wprowadzano nowe sposoby konserwacji żywności. Obecnie do najczęściej wykorzystywanych metod konserwacji żywności należą: metody termiczne (chłodzenie, zamrażanie, pasteryzacja, sterylizacja, tyndalizacja), metody osmoaktywne (zagęszczanie, cukrzenie, solenie, peklowanie), metody mikrobiologiczne, metody radiacyjne, oraz chemiczne utrwalanie żywności.

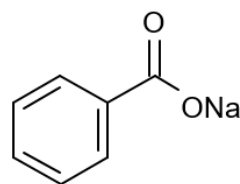
Chemiczne utrwalanie żywności polega na zastosowaniu substancji chemicznych, które wywołują efektywne utrwalenie żywności przy stosunkowo małych dawkach. Substancje te zwane konserwantami zmniejszają szybkość lub całkowicie zahamowują procesy mikrobiologiczne powodujące psucie żywności. Działanie konserwantów może powodować u drobnoustrojów uszkodzenie błon cytoplazmatycznych i ścian komórkowych, czy inaktywację pewnych enzymów lub metabolitów ważnych w ich procesach życiowych. Wśród substancji dozwolonych do konserwowania żywności można znaleźć antybiotyki, azotany (III) i (V), tlenek siarki (IV) i siarczany (IV) oraz kwasy benzoesowy, mrówkowy, propionowy jak i ich sole.

Kwas benzoesowy (E 210) oraz jego sole: sodu (E 211), potasu (E 212) lub wapnia (E 213), są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym do konserwacji żywności, gdyż hamują rozwój drożdży, pleśni i wielu gatunków bakterii. Działanie konserwujące benzoesanów polega na oddziaływaniu na błonę komórkową oraz hamowaniu reakcji enzymatycznych, zwłaszcza wywołanych przez dehydrogenazę glukozowo-fosforanową i L-mleczanową. Kwas benzoesowy jest drobnokrystalicznym, białym ciałem stałym, słabo rozpuszczalnym w wodzie, w przeciwieństwie do jego soli. Ze względu na rozpuszczalność w konserwacji żywności częściej stosuje się benzoesan sodu niż sam kwas benzoesowy.

Kwas benzoesowy i jego sole mogą być stosowane do utrwalania przetworów owocowych, warzywnych, rybnych jak również napojów. Stosowane są także jako konserwanty w różnego rodzaju wyrobach kosmetycznych.



kwas benzoesowy (E 210)



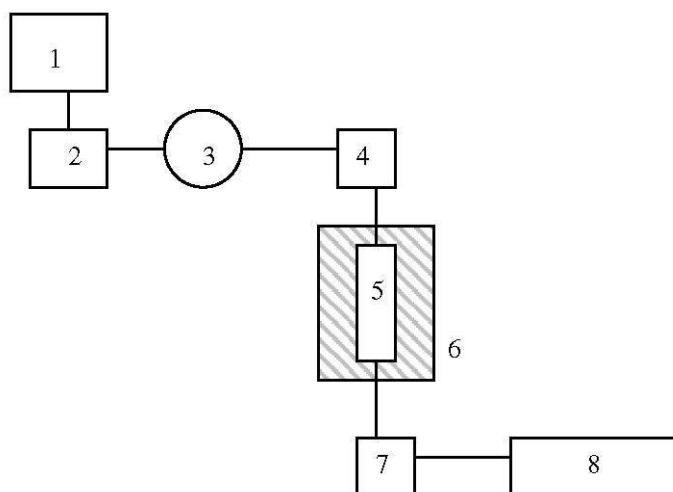
benzoesan sodu (E 211)

Szkodliwość substancji chemicznych, które zostały dopuszczone do stosowania w przemyśle chemicznym, jest określana poprzez podanie dawek dopuszczalnego dziennego spożycia. Dopuszczalne dzienne spożycie (ang. *Acceptable Daily Intake* – *ADI*) wyraża ile mg danej substancji, w przeliczeniu na 1 kg masy ciała może dziennie pobierać człowiek, przez całe życie, bez szkody dla organizmu. Dla benzoesu sodu ADI wynosi 0-5 mg/kg masy ciała. Spożywanie dużych ilości benzoesu może powodować uczulenia u astmatyków i alergików, a u osób wrażliwych na aspirynę zaburzenia przewodzenia pokarmowego. Organizm ludzki ma jednak zdolność wydalania kwasu benzoesowego i jego soli z moczem.

Do oznaczania benzoesanów w produktach spożywczych można wykorzystać technikę wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). Chromatografia jest metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku różnego ich podziału między fazę ruchomą i nieruchomą układu chromatograficznego. W chromatografii ciekowej fazą ruchomą jest ciecz, a fazą nieruchomą ciało stałe (chromatografia adsorpcyjna), rzadziej ciecz osadzona na nośniku (chromatografia podziałowa). Ten ogólny podział nie charakteryzuje jednak pewnych rodzajów chromatografii, w których zachodzą szczególne przypadki oddziaływania fazy nieruchomej z substancjami poddawanyymi chromatografii. Dlatego rozróżnia się jeszcze chromatografię jonowymienną, sitową (żelową) i powinowactwa.

Stosując chromatografię ciekową, można analizować znacznie więcej związków chemicznych niż za pomocą chromatografii gazowej - ok. 80%. Mogą to być ciecze i ciała stałe, w tym związki łatwo ulegające rozkładowi termicznemu, polimery i związki nieorganiczne. Warunkiem analizowania tych związków za pomocą chromatografii ciekowej jest ich rozpuszczalność w fazie ruchomej.

Do wykonania oznaczeń używa się chromatografów ciekowych, na wyposażeniu których musi znajdować się pompa oraz detektor (Rys 1).



Rys. 1. Schemat chromatografu ciekowego: 1 – zbiornik fazy ruchomej, 2 – pompa, 3 – manometr, 4 – dozownik próbek, 5 – kolumna, 6 – termostat, 7 – detektor, 8 – rejestrator

Zasada działania chromatografu cieczowego jest następująca: ze zbiornika lub zbiorników pompą zasysa się fazę ruchomą nazywaną też eluentem (rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników), która poprzez dozownik jest tłoczona do kolumny chromatograficznej wypełnionej fazą stacjonarną. Kolumna jest niekiedy umieszczana w termostacie. Za pomocą dozownika do strumienia cieczy wprowadza się próbkę, której składniki rozdzielają się w kolumnie i na wyjściu z niej są wykrywane przez detektor. Sygnał elektryczny z detektora po wzmocnieniu jest zapisywany na taśmie rejestratora lub rejestrowany za pomocą integratora albo komputera w postaci piku chromatograficznego. Przepływ cieczy przez układ może być kontrolowany manometrem i przepływomierzem. W niektórych przyrządach możliwe jest zbieranie rozdzielonych składników mieszanin w kolektorze frakcji.

2. Odczynniki i aparatura

- chromatograf cieczowy z pompą Series 200 firmy PerkinElmer;
- kolumna chromatograficzna z odwróconą fazą C-18;
- warunki chromatograficzne: faza ruchoma: 0,01% HCl (pH~3) /metanol (70/30), prędkość przepływu fazy ruchomej 1 ml/min, analityczna długość fali 255 nm,
- podstawowy roztwór benzoesu sodu o stężeniu 0,01 mol/L;
- kolby miarowe, pipety automatyczne;
- próbki badanych substancji (napoje zakupione w pobliskim supermarkecie).

Wymagane środki ostrożności

- W trakcie wykonywania ćwiczenia wymagane noszenie odzieży ochronnej.
- Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywą UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE).

Kwas benzoesowy – R40

Pierwsza pomoc*:

- w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody z mydłem.
- w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
- w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
- w przypadku połknięcia NIE prowokować wymiotów. Nieprzytomnej osobie nigdy nie podawać nic doustnie. Wypłukać usta wodą. Zasięgnąć porady medycznej.

3. Wykonanie oznaczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości benzoesanów w produktach spożywczych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją w ultrafiolecie**.

a) Wyznaczenie krzywej wzorcowej

Przygotować serie roztworów wzorcowych benzoesu sodu, po 2 próbki na każdą wartość stężenia. W tym celu do probówek typu falcon o objętości 15 ml wprowadzić odpowiednie objętości roztworu podstawowego benzoesu sodu, tak aby po rozcieńczeniu jego stężenie wynosiło: 0,02; 0,1; 0,5 mmol/L. Otrzymane roztwory poddać analizie chromatograficznej, wprowadzając za pomocą mikrostrzykawki na kolumnę chromatograficzną po 25 µl roztworu. Opis obsługi chromatografu w osobnej instrukcji. Przy programowaniu analizy zaznaczamy, że rozdziały będziemy wykonywali wg metody chromatograficznej BENZO.MTH, a wytworzone chromatogramy oznaczamy numerami próbek, jak na załączonej kontrolce Pro1, Pro2... Chromatogramy zapisujemy w katalogu C:\TC4\DANE\HPLC\B_SAD\ZespM-N, gdzie M oznacza nr grupy w kolejności odbywania ćwiczeń, a N nr zespołu w danej grupie. Z otrzymanych chromatogramów odczytać powierzchnię pików kwasu benzoesowego**, wyznaczyć krzywą wzorcową wg. której będziemy określać stężenie kwasu benzoesowego w próbkach.

b) Przygotowanie próbek i oznaczenie zawartości benzoesanów w wodach smakowych

Odgazować próbkę wody. Następnie 25 µl próbki nanieść na kolumnę chromatograficzną. W przypadku napoju Hellena próbkę 50 krotnie rozcieńczyć. Analizę każdego rodzaju napoju powtórzyć dwukrotnie. W celu identyfikacji pików benzoesu sodu próbkę można „zaszczepić” roztworem wzorcowym benzoesu sodu i poddać analizie.

4. Opracowanie wyników

- a) Wykreślić prostą kalibracyjną wykorzystując wysokości sygnałów (pików) benzoesu sodu odczytanych z chromatogramów uzyskanych podczas analizy HPLC.
- b) Wykorzystując równanie prostej kalibracyjnej wyznaczyć zawartość benzoesu sodu w badanych próbkach.
- c) Podać stężenie benzoesu sodu w badanych próbkach w [mmol/L] oraz [g/L].

5. Literatura

Z. Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, WNT, Warszawa 2005.

W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 2002.

**Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.*

***Analizy HPLC i odczytywanie powierzchni pików wykonywane są na podstawie osobnej instrukcji.*

Zadanie 4.**Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania benzoesu sodu w produktach przemysłowych**

| Imię i nazwisko | | Zespół nr | |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| 1. | | | |
| 2. | | | |
| 3. | | | |
| Nr próbki | Opis | Powierzchnia piku | Stężenie benzoesu |
| 1. Wzorzec 1 | - | | 0.02 mmola/l |
| 2. Wzorzec 2 | - | | 0.1 mmola/l |
| 3. Wzorzec 3 | - | | 0.5 mmola/l |
| 4. Próbką 1 | Woda smakowa Hellena | | |
| 5. Próbką 2 | Woda smakowa | | |
| | | | |
| Wnioski: | | | |