

OZNACZANIE STĘŻENIA KONSERWANTU W PRODUKTACH KOSMETYCZNYCH I SPOŻYWCZYCH TECHNIKĄ HPLC-UV Z WYKORZYSTANIEM METODY DODATKU WZORCA

Instrukcja opracowana w Katedrze Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

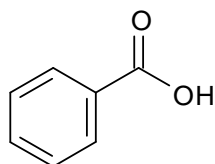
1. Wprowadzenie

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. 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.

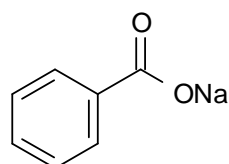
Chemiczne utrwalanie żywności polega na zastosowaniu substancji chemicznych, które wywołują efektywne utrwalenie żywności przy stosunkowo małych dawkach. Substancje te zwane konserwantami zmniejszają szybkość lub całkowicie zahamowują procesy mikrobiologiczne powodujące psucie żywności. Działanie konserwantów 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 soli kwasu benzoesowego 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 benzoosan sodu niż sam kwas benzoesowy.

Kwas benzoesowy i jego sole mogą być stosowane do utrwalania przetworów owocowych, warzywnych, rybnych jak również napojów.



kwas benzoesowy (E 210)



benzoesan sodu (E 211)

Podobnie jak produkty żywnościowe również w przypadku produktów kosmetycznych, może dojść do ich skażenia bakteriami i grzybami, dlatego też konieczna jest ich konserwacja. Konserwanty potrzebne są do zapewnienia bezpieczeństwa produktu przez cały termin jego trwałości i przydatności do użytku. Większość produktów kosmetycznych zawiera wodę i składniki, takie jak: wyciągi z roślin czy oleje roślinne, które mogą być pożywką dla mikroorganizmów rozwijających się w niekonserwowanym produkcie zaledwie po kilku dniach.

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*) określa ile mg danej substancji, w przeliczeniu na 1 kg masy ciała może dziennie pobierać człowiek, przez całe życie, bez szkody dla organizmu. Dla benzoesanu sodu ADI wynosi 0-5 mg/kg masy ciała. Spożywanie dużych ilości benzoesanu może powodować uczulenia u astmatyków i alergików, a u osób wrażliwych na aspirynę zaburzenia przewodzenia pokarmowego. Organizm ludzki posiada zdolność wydalania kwasu benzoesowego i jego soli z moczem.

W przypadku kosmetyków stosowanie substancji konserwujących jest ściśle regulowane przepisami prawa i dozwolone są tylko konserwanty wymienione w załączniku V do Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady Wspólnoty Europejskiej nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych. Każdy konserwant przed dopuszczeniem do użytku zostaje poddany rygorystycznej ocenie bezpieczeństwa przez Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów, będący organem doradczym przy Komisji Europejskiej. Dopuszczalne maksymalne stężenie soli kwasu benzoesowego w kosmetykach to: 0,5% w produktach niespłukiwanych; 1,7% w produktach do jamy ustnej; 2,5% w produktach spłukiwanych.

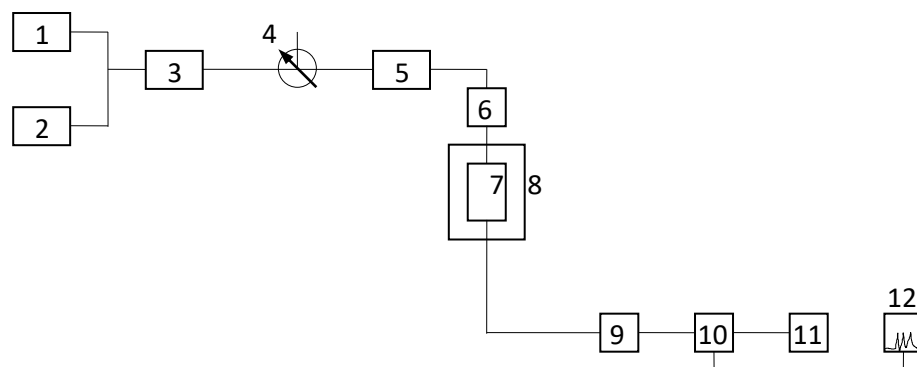
Do oznaczania soli kwasu benzoesowego w różnego rodzaju produktach (spożywczych, kosmetycznych) często wykorzystuje się technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*).

Chromatografia jest metodą rozdzielania mieszanin, których składniki ulegają różnicowanemu, wielokrotnemu podziałowi między dwie fazy: nieruchomą (stacjonarną) i

ruchomą, poruszającą się w określonym kierunku; w wyniku tego poszczególne składniki migrują przez złożę chromatograficzne z różną prędkością liniową. Rozdzielone składniki mogą być identyfikowane i oznaczane ilościowo (chromatografia analityczna) lub wydzielane i zbierane (chromatografia preparatywna). Ze względu na dominujący mechanizm procesu rozdzielania chromatografię możemy podzielić na: (i) adsorpcyjną – fazą ruchomą jest ciecz lub gaz, a fazą nieruchomą ciało stałe o właściwościach adsorbujących i odpowiednim rozdrobieniu (np.: żel krzemionkowy, tlenek glinu, węgiel aktywny); (ii) podziałową – fazą ruchomą jest ciecz lub gaz, a stacjonarną ciecz zatrzymana na odpowiednim nośniku (np.: bibuła, ziemia okrzemkowa, kulki szklane); (iii) jonowymienną – fazą ruchomą jest ciecz, a stacjonarną wymienniczkę jonową; (iv) żelową (wykluczenia) – fazą ruchomą jest ciecz, a nieruchomą granulowany, jednorodny spęczniały żel.

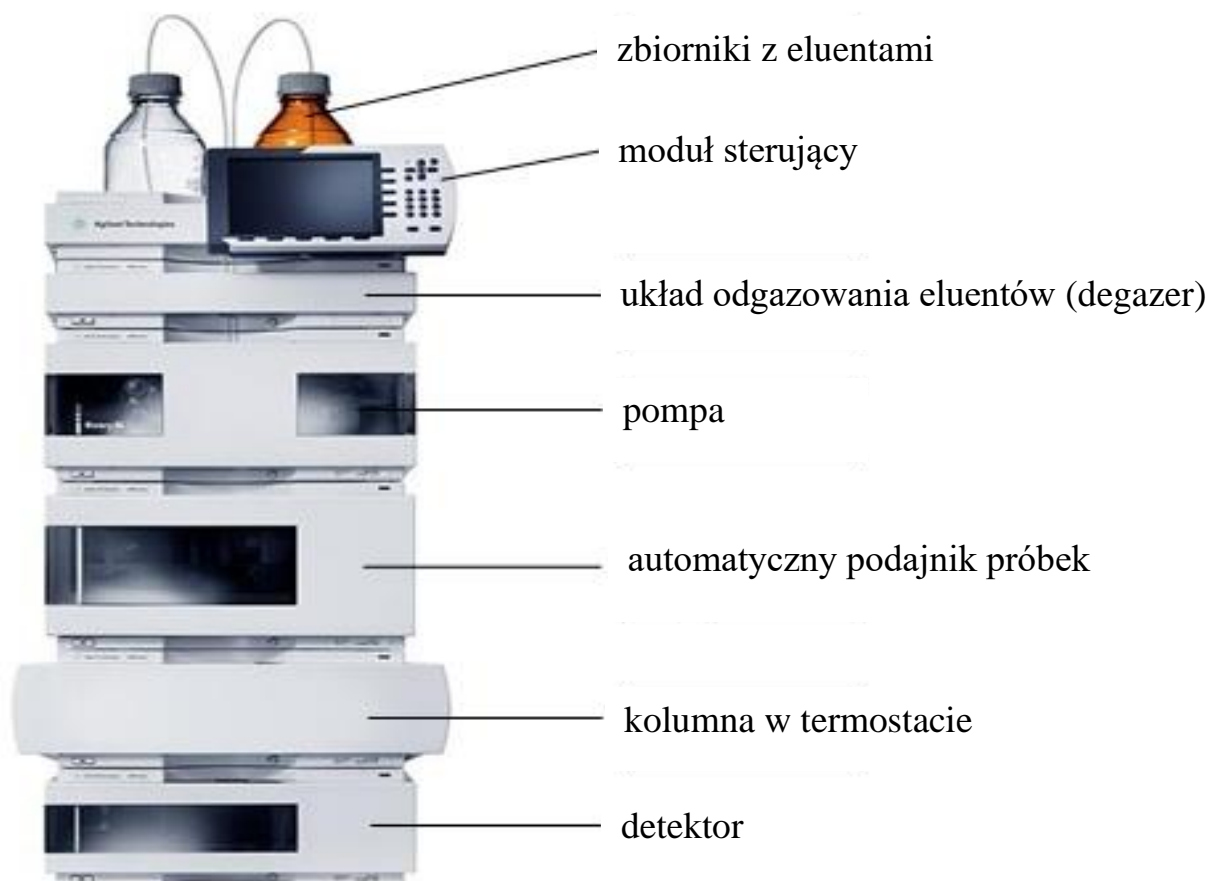
Stosując chromatografię ciekową, można analizować znacznie więcej związków chemicznych niż za pomocą chromatografii gazowej - ok. 80%. Mogą to być ciecze i ciała stałe, w tym związki łatwo ulegające rozkładowi termicznemu, polimery i związki nieorganiczne. Warunkiem analizowania tych związków za pomocą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

Na Rys. 1. przedstawiono schemat blokowy, a na Rys. 2. przykładową budowę układu chromatograficznego.



Rys. 1. Schemat blokowy układu chromatograficznego.

1, 2 - zbiorniki eluentów, 3 - pompa, 4 - manometr, 5 - dozownik, 6 - przedkolumna, 7 - kolumna chromatograficzna, 8 - termostat kolumny, 9 - przepływomierz, 10 - detektor, 11 - kolektor frakcji, 12 - rejestrator lub komputer.



Rys. 2. Budowa układu chromatograficznego.

Zasada działania chromatografu cieczowego jest następująca: ze zbiornika lub zbiorników pompowana jest faza ruchoma nazywana też eluentem (rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników), która poprzez dozownik jest tłoczona do kolumny chromatograficznej wypełnionej fazą stacjonarną. Często w układzie chromatograficznym umieszczany jest układ odgazowywania fazy ruchomej w celu usunięcia z niej rozpuszczonego gazu, czyli powietrza. Jest to ważne ze względu zarówno na możliwość zakłócenia procesu rozdzielania (dodatkowe objętości martwe, brak powtarzalności procesu rozdzielania, zapowietrzenie układu), jak i detekcję. Właściwy proces rozdzielania odbywa się w kolumnie chromatograficznej. Kolumna chromatograficzna to rurka wykonana ze stali, szkła lub polimeru. Kolumna wypełniona jest złożem, najczęściej w formie ziaren o określonej średnicy. Na końcach znajdują się spieki utrzymujące ziarna wewnątrz kolumny, a za spiekami gwinty pozwalające na połączenie kolumny z układem chromatograficznym. Kolumna może być umieszczona w termostacie. Jest to szczególnie ważne w przypadku chromatografii, gdzie proces rozdzielania zależy od temperatury (np.: szybkość wymiany jonowej). Dzięki zastosowaniu termostatu eliminuje się brak

odtwarzalności czasu retencji wraz ze zmianą temperatury w kolejnych rozdzieleniach. Za pomocą dozownika do strumienia cieczy wprowadza się próbkę, której składniki rozdzielane są w kolumnie i na wyjściu z niej są wykrywane przez detektor. Sygnał elektryczny z detektora po wzmocnieniu jest rejestrowany za pomocą komputera w postaci piku chromatograficznego. Przepływ cieczy przez układ może być kontrolowany manometrem (układy stałociśnieniowe – właściwie już niespotykane) lub przepływomierzem (układy stałoprzepływowe). W układach stałoprzepływowych manometr służy do uzyskania informacji o ciśnieniu występującym na wejściu na kolumnę chromatograficzną. Zbyt wysokie ciśnienie może być powodem uszkodzenia ciągłości złoza chromatograficznego. W niektórych chromatografach możliwe jest zbieranie rozdzielonych składników mieszanin w kolektorze frakcji.

2. Aparatura i odczynniki

- wysokosprawny chromatograf cieczowy;
- kolumna chromatograficzna ZorbaxSB C-18;
- warunki rozdzielania chromatograficznego:
 - faza ruchoma: 0,1% kwas octowy / acetonitryl (70% / 30% v/v),
 - objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 mL/min,
 - objętość wprowadzanej próbki na kolumnę: 20 μ L,
 - analityczna długość fali: 255 nm;
- podstawowy roztwór benzoesu sodu o stężeniu 1,5 g/L;
- kolby miarowe o objętości 10 mL;
- naczynka chromatograficzne o objętości 1,5 mL;
- próbki typu Eppendorf o objętości 1,5 mL;
- pipety automatyczne;
- próbki produktów kosmetycznych/spożywczych.

Wymagane środki ostrożności

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i zasysać ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami 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. Wyplukać usta wodą. Zasięgnąć porady medycznej.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

3. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości benzoesu sodu w produktach kosmetycznych i spożywczych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczonej z detekcją w ultrafiolecie (HPLC-UV) z wykorzystaniem metody dodatku wzorca.

Metoda dodatku wzorca stosowana jest do oznaczania analizowanej substancji w obecności rzeczywistej matrycy próbki. Metoda ta polega na dodaniu do próbki znanych ilości substancji oznaczanej. Na podstawie uzyskanych chromatogramów możliwe jest wykreślenie krzywej dodatku wzorca, tj. zależności wysokości (powierzchni) sygnału (piku) analitu w funkcji stężenia wzorca dodanego do próbki. Następnie przeprowadza się graficzną ekstrapolację krzywej do punktu przecięcia z osią odciętych i odczytuje zawartość oznaczanej substancji C_x lub też oblicza się stężenie analitu w próbce bez dodatku substancji oznaczanej z równania krzywej dodatku wzorca $S = aC + b$ z następującego równania: $C_x = S/a$, gdzie S to sygnał analityczny równy b dla stężenia dodanego wzorca $C = 0$.

4. Procedura wykonania ćwiczenia

- 4.1. przygotować wzorzec benzoesu sodu o stężeniu 50 mg/L bezpośrednio w naczynku chromatograficznym;
- 4.2. zarejestrować chromatogram wzorca, zanotować czas retencji i wysokość uzyskanego sygnału (piku);
- 4.3. próbkę produktu spożywczego – woda smakowa 1 i woda smakowa 2 – przenieść do naczynka chromatograficznego, a próbkę produktu kosmetycznego – płyn do płukania ust – rozcieńczyć 100 razy bezpośrednio w naczynku chromatograficznym;
- 4.4. zarejestrować chromatogram badanej próbki, odczytać i zanotować czas retencji oraz wysokość uzyskanego sygnału (piku);
- 4.5. porównać wysokości uzyskanych sygnałów (pików): wzorca benzoesu sodu o stężeniu 50 mg/L i badanej próbki;

- 4.6. rozcieńczyć odpowiednio badaną próbkę bezpośrednio w naczynku chromatograficznym;
- 4.7. zarejestrować chromatogram badanej próbki, odczytać i zanotować czas retencji oraz wysokość uzyskanego sygnału (piku) – pomiar powtórzyć trzykrotnie;
- 4.8. rozcieńczyć i przygotować bezpośrednio w jednym naczynku chromatograficznym badaną próbkę razem z dodatkiem wzorca benzoesu sodu, tak aby jego stężenie wynosiło 50 mg/L;
- 4.9. zarejestrować chromatogram badanej próbki z dodatkiem wzorca 50 mg/L benzoesu sodu, odczytać i zanotować czas retencji oraz wysokość uzyskanego sygnału (piku) – pomiar powtórzyć trzykrotnie;
- 4.10. rozcieńczyć i przygotować bezpośrednio w jednym naczynku chromatograficznym badaną próbkę razem z dodatkiem wzorca benzoesu sodu, tak aby jego stężenie wynosiło 75 mg/L;
- 4.11. zarejestrować chromatogram badanej próbki z dodatkiem wzorca 75 mg/L benzoesu sodu, odczytać i zanotować czas retencji oraz wysokość uzyskanego sygnału (piku) – pomiar powtórzyć trzykrotnie;
- 4.12. rozcieńczyć i przygotować bezpośrednio w jednym naczynku chromatograficznym badaną próbkę razem z dodatkiem wzorca benzoesu sodu, tak aby jego stężenie wynosiło 100 mg/L;
- 4.13. zarejestrować chromatogram badanej próbki z dodatkiem wzorca 100 mg/L benzoesu sodu, odczytać i zanotować czas retencji oraz wysokość uzyskanego sygnału (piku) – pomiar powtórzyć trzykrotnie.

5. Opracowanie wyników

- 5.1. Wstęp teoretyczny.
- 5.2. Na podstawie uzyskanych chromatogramów wykreślić krzywą dodatku wzorca – zależność wysokości sygnału (piku) analitu w funkcji stężenia wzorca dodanego do próbki.
- 5.3. Obliczyć zawartość benzoesu sodu w badanych próbkach – wyznaczyć średnią z 3 powtórzeń, obliczyć odchylenie standardowe i względne odchylenie standardowe. Proszę pamiętać o współczynnikach rozcieńczenia badanych próbek.
- 5.4. Podać stężenie benzoesu sodu w badanych próbkach w [g/L].
- 5.5. Wnioski końcowe.

6. Literatura

M. Zina, *Utrwalanie i przechowywanie żywności*, Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2008.

A. Witczak, Z. E. Sikorski, *Szkodliwe substancje w żywności*, PWN, Warszawa, 2020.

M. Deska, T. Girek, B. Herman, *Środki konserwujące w preparatach kosmetycznych i bezpieczeństwo ich stosowania*, Prace Naukowe AJD w Częstochowie, 2016.

K. Miranowicz-Dzierżawska, *Substancje konserwujące stosowane w przemyśle kosmetycznym*, Bezpieczeństwo Pracy 11, 2017.

W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 2012.

Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*, WNT, Warszawa, 2012.

Z. Witkiewicz, W. Wardencki, I. Malinowska, *Chromatografia cieczowa – teoria i praktyka*, PWN, Warszawa, 2020.