ZASTOSOWANIE WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ DO OZNACZANIA BENZOESANU SODU W PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

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

PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ

1. Przeczytaj uważnie instrukcję – zapoznaj się ze wstępem teoretycznym dotyczącym danej metody pomiarowej oraz dokładnie przeanalizuj czynności, które będą wykonywane na zajęciach.
2. Zwróć uwagę na zagrożenia związane ze stosowaniem odczynników chemicznych niezbędnych do wykonania ćwiczenia (karty charakterystyk).
3. Zastanów się:

- czy potrafisz wyjaśnić podstawowe pojęcia dla stosowanej metody pomiarowej;
- czy znasz nazewnictwo oraz wzory związków używanych podczas ćwiczenia;
- czy potrafisz omówić budowę i działanie stosowanej aparatury pomiarowej;
- czy umiesz dokonać obliczeń (w tym przeliczeń stężeń) koniecznych do prawidłowego wykonania ćwiczenia?

1. WSTĘP TEORETYCZNY

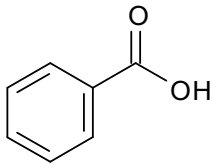
Sezonowe występowanie niektórych produktów spożywczych oraz ich mała trwałość, skłoniły człowieka do opracowania sposobów pozwalających na przedłużenia ich przydatności do spożycia. Od dawna w gospodarstwach domowych do utrwalania żywności stosowano: naturalne chłodzenie, suszenie, solenie, wędzenie 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

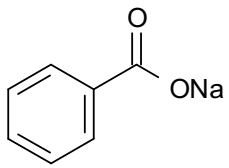
dozwolonych do konserwowania żywności można znaleźć antybiotyki, azotany (III) i (V), tlenek siarki (IV) i siarczany (IV) oraz kwasy benzoesowy, mrówkowy, propionowy jak i ich sole.

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.



kwas benzoesowy (E 210)



benzoesan sodu (E 211)

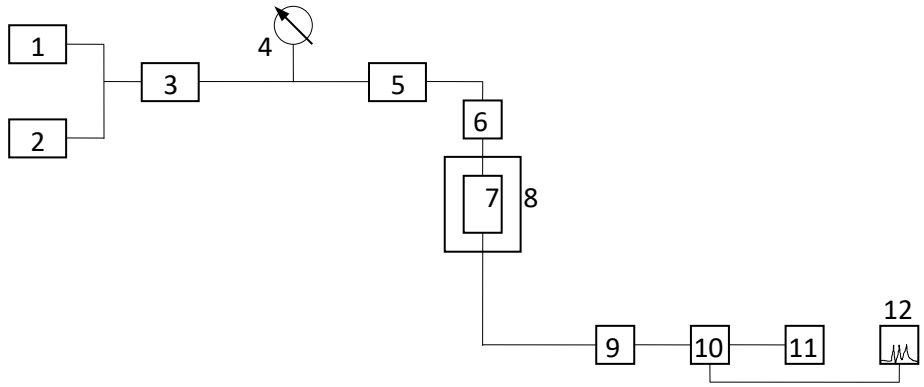
Szkodliwość substancji chemicznych, które zostały dopuszczone do stosowania w przemyśle chemicznym, jest określana poprzez podanie dawek dopuszczalnego dziennego spożycia. Dopuszczalne dzienne spożycie (ang. *Acceptabe Daily Intake – ADI*) wyraża ile mg danej substancji, w przeliczeniu na 1 kg masy ciała może dziennie pobierać człowiek, przez całe życie, bez szkody dla organizmu. Dla 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 przewodu 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 cieczowej (HPLC). Chromatografia jest metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku różnego ich podziału między fazę ruchomą i nieruchomą układu chromatograficznego. W chromatografii cieczowej 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 chromatografowanymi. Dlatego rozróżnia się jeszcze chromatografię jonowymienną, sitową (żelową) i powinowactwa.

Stosując chromatografię cieczową, 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 cieczowej jest ich rozpuszczalność w fazie ruchomej.

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



Rys. 1. Schemat blokowy chromatografu cieczowego.

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.

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 rozdzielenia (dodatkowe objętości martwe, brak powtarzalności procesu rozdzielenia, zapowietrzenie układu), jak i detekcję. Właściwy proces rozdzielenia 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 rozdzielenia 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 złoża chromatograficznego. W niektórych chromatografach możliwe jest zbieranie rozdzielonych składników mieszanin w kolektorze frakcji.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2. Odczynniki i aparatura

- wysokosprawnychromatograf cieczowy HP 1050 (firmy Hewlett Packard);
- kolumna chromatograficzna Zorbax SB C-18;
- warunki chromatograficzne:
    - faza ruchoma: 0,1% kwas octowy / acetonitryl (60% / 40% v/v),
    - objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 mL/min,
    - objętość wprowadzanej próbki na kolumnę: 20 μL,
    - analityczna długość fali: 255 nm;
- podstawowy roztwór benzoesanu sodu o stężeniu 1,5 g/L;
- kolby miarowe o objętości 10 mL;
- naczynka chromatograficzne o objętości 1,5 mL;
- probówki typu Eppendorf o objętości 1,5 mL;
- pipety automatyczne;
- próbki produktów spożywczych.

3. Wykonanie oznaczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości soli kwasu benzoesowego w produktach spożywczych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją w ultrafiolecie.

a) Wyznaczenie krzywej wzorcowej

Przygotować serie roztworów wzorcowych benzoesanu sodu, po 2 próbki na każdą wartość stężenia, w naczynkach chromatograficznych. W tym celu wprowadzić odpowiednie objętości roztworu podstawowego benzoesanu sodu, tak aby po rozcieńczeniu jego stężenie wynosiło: 30 mg/l; 60 mg/l; 90 mg/l; 120 mg/l; 150 mg/l.

Zarejestrować chromatogram każdego wzorca, zanotować czas retencji i wysokość uzyskanego sygnału (piku).

b) Przygotowanie próbek i oznaczenie zawartości benzoesanów w wodach smakowych

Odgazować próbkę wody. 500 µl roztworu odpipetować do naczynka chromatograficznego – w razie konieczności odpowiednio rozcieńczyć. Zarejestrować chromatogram substancji badanej. Analizę każdej próbki wody powtórzyć dwukrotnie. W celu identyfikacji piku benzoesanu próbkę zaszczepić roztworem wzorcowym benzoesanu sodu i poddać analizie.

4. Opracowanie wyników

W sprawozdania należy:

a) sprecyzować cele ćwiczenia

b) opisać dokładnie czynności wykonywane na zajęciach z uwzględnieniem ilości stosowanych odczynników,

c) czytelnie przedstawić otrzymane wyniki (w formie tabel, rysunków, wykresów – tytuł tabeli umieszczamy nad tabelą, z kolei tytuł rysunku lub wykresu umieszczamy pod rysunkiem);

d) wykreślić krzywą kalibracyjną wykorzystując średnią wysokość z dwóch sygnałów (pików) roztworu benzoesanu sodu o danym stężeniu odczytanych z chromatogramów uzyskanych podczas analizy HPLC;

e) podać równanie krzywej kalibracyjnej i wartość współczynnika korelacji;

f) wykorzystując równanie krzywej kalibracyjnej wyznaczyć zawartość soli kwasu benzoesowego w badanych próbkach, wynik podać w [mmol/l] oraz [g/l];

g) omówić wyniki i wyciągnąć wnioski z przeprowadzonych eksperymentów.

5. Literatura

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

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

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