

OPTIMALIZACE METODY QuEChERS PRO ANALÝZU POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV

Andrea Čížková, Martin Adam, Silvie Surmová a Karel Ventura

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická,
Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, +420466037398,
andrea.cizkova@seznam.cz*

Abstrakt

Metoda QuEChERS byla aplikována na extrakci syntetických potravinářských barviv ze vzorku cukrovinek. Podmínky extrakce byly optimalizovány z hlediska vhodného extrakčního rozpouštědla, jeho množství, úpravy pH a přidavku solí. Jako vhodné bylo pro 5 ml vzorku vyhodnoceno systém, 2 ml propan-1-olu jako extrakčního rozpouštědla s přidavkem 0,6 g NaCl, 2,4 g MgSO₄ a 0,75 ml 35 % HCl. Optimalizované podmínky extrakce byly statisticky vyhodnoceny na základě analýzy extraktů kapalinovou chromatografií se spektrofotometrickou detekcí ve viditelné oblasti.

***Klíčová slova:** QuEChERS, syntetická potravinářská barviva, cukrovinky*

Úvod

Barviva jsou látky udělující potravině barvu, kterou by bez jejich použití neměla, nebo rekonstruuje barvu, která byla poškozena či zeslabena během technologického procesu. Takováto barviva lze dle vyhlášky získat chemickou syntézou nebo z potravin a dalších složek přírodního původu extrakcí fyzikální či chemické povahy, která má za následek selektivní oddělení barevné látky [1, 2].

Psychologie barevnosti byla dlouhou dobu zkoumána, neboť má významný vliv i z hlediska výběru a hodnocení potravin. Člověk vnímá očima potravinu nejen pod vlivem očekávání, ale je i důležitým klíčem k rozpoznávání stavu potravin – zda je ještě vhodné ji konzumovat. Příkladem může být hodnocení zralosti ovoce a zeleniny na základě barvy (např. oranžovo-červená broskev je zralá a zelená je nezralá) nebo stáří (např. hnědý jahodový džem je starý). Pro technologii má barevnost význam z několika hledisek. Jedním z nich je potřeba udržet barevnou jednotnost ve všech šaržích výrobků. Druhým je zamezení barevné změny způsobené chemickými reakcemi, které působí během zpracování nebo po dobu trvanlivosti. Jedním z nelegálních důvodů přidavku barviv do potravin je také jejich falšování s cílem ošidit spotřebitele nebo stát nebo maskování případných vad potravin [3].

Extrakční metoda QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe – rychlá, jednoduchá, levná, efektivní, robustní a bezpečná) byla publikována v roce 2003 jako nový přístup k extrakci široké škály pesticidů z různých potravinových matic s vysokým obsahem vody. Přestože výše uvedené vlastnosti by měly vykazovat všechny analytické metody, zkratka QuEChERS je vžitým a v publikacích často užívaným názvem pro metodu využívající systém dvou původně mísitelných rozpouštědel. Základním principem je převedení analytu z vodného vzorku do organické fáze acetonitrilu a její následné oddělení, které je realizováno přidavkem solí (NaCl a MgSO₄). V původní metodě pro analýzu vzorků, jejichž matrice je bohatá na tuky, následuje krok přečištění extraktů na tuhou fázi (SPE) pomocí směsi primárních a sekundárních aminů (PSA). Pro analýzu jiných matic (např. půd) je krok SPE vypuštěn a analyzován čistý extrakt. Takto získaný extrakt je použit pro stanovení analytu ve vzorku [4].

Materiál a metody

Do 13 ml uzavíratelných plastových zkumavek bylo odměřeno 5 ml vodného roztoku směsi 6 syntetických barviv (E102, E104, E124, E129, E131 a E133) a příslušný objem propan-1-olu. Ke směsi bylo přidáno dané množství solí a 35 % HCl. Se směsí bylo 5 minut intenzivně třepáno a poté byla zkumavka uložena na tmavé místo minimálně na 10 minut. Po uplynutí této doby se ve zkumavce vytvořily dvě oddělené fáze. Horní organická fáze byla dále analyzována kapalinovou chromatografií, kdy bylo použito 20 μ l neředěného extraktu. Současně byla provedena i spektrální analýza ve viditelné oblasti, avšak pro tento účel bylo třeba extrakty naředit z důvodu příliš koncentrovaných roztoků (absorbance přesahující hodnotu 3 již nebyla v lineární oblasti Lambert-Beerova zákona). Pro tento účel byly vzorky ředěny 10x, v případě potřeby i vícekrát.

Experiment navržený dle centrálního kompozitního plánu byl vyhodnocen metodou odezvové plochy (RSM) a data byla statisticky zpracována pomocí programu Statistica cz, verze 10.0 od firmy Stat Soft ČR, s.r.o. (Praha, ČR).

Ze získaných extraktů bylo pro analýzu kapalinovou chromatografií dávkováno 20 μ l na kolonu LiChrospher 100 CN. Složení mobilní fáze bylo následující: acetonitril (mobilní fáze A) a 10 mM octan sodný (mobilní fáze B) v redestilované vodě o pH upraveném pomocí HCl na hodnotu 6,0. Roztok octanu sodného byl zfiltrován přes membránový filtr 0,45 μ m (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Protože v sestavě kapalinového chromatografu byl zařazen dvoukanálový detektor a pro analýzu byla nutná detekce při třech vlnových délkách (žlutá, červená, modrá), docházelo na kanále A k přepnutí vlnové délky detekce v průběhu analýzy. Přepnutí bylo zvoleno dle eluce barviv po extrakci.

Vzorek lentilek byl zvážen na analytických vahách a barevná poleva opláchnuta destilovanou vodou a získaný roztok doplněn na objem 10 ml. Pro extrakci bylo odebráno 5 ml roztoku vzorku, ke kterému byly přidány 2 ml extrakčního rozpouštědla propan-1-olu, 3 g solí (0,6 g NaCl a 2,4 g MgSO₄) a 0,75 ml 35 % HCl. Po 5 minutách intenzivního třepání směsi v uzavíratelné zkumavce byl vzorek uložena na 10 minut na tmavé místo. Získaný extrakt byl analyzován kapalinovou chromatografií s detekcí ve viditelné oblasti.

Výsledky a diskuse

Původní metoda QuEChERS aplikovaná na rezidua pesticidů využívá jako extrakční rozpouštědlo acetonitril. Ten se však nejevil jako vhodný pro extrakci syntetických potravinářských barviv z důvodu příliš malé účinnosti extrakce. Dále byla testována homologická řada alkoholů. Methanol nebyl vhodný, protože v průběhu extrakce nedošlo k oddělení fází. Také ethanol nebyl vhodný, protože kvůli jeho dobré mísitelnosti s vodou došlo k výraznému zředění organické fáze. Jako vhodně extrakční činidlo byl vyhodnocen propan-1-ol.

Všechna testovaná barviva obsahují ve své molekule navázané sulfonové skupiny. Díky přítomnosti těchto skupin reagují při extrakci na změnu pH. Z tohoto důvodu byl testován vliv přídavku 35 % HCl při extrakci. Při vyhodnocení experimentu se prokázalo, že přídavkem kyseliny došlo u žlutých a červených barviv ke zlepšení výtěžnosti, u modrých nebylo třeba okyselení (výtěžnost byla dostatečná).

Množství přidávaných solí pro extrakci bylo na počátku experimentu odvozeno od publikovaného originálního postupu [4]. Empiricky však bylo nutné ověřit, jak se celkové množství přidávaných solí podílí na účinnosti extrakce potravinářských barviv do propan-1-olu. Proto byla připravena sada extrakcí pro pracovní vodné roztoky červených barviv E124 a E129 (4 ml) s přidávanými 4 ml propan-1-olu, 0,5 ml 35 % HCl a odstupňovaným

množstvím přidaných solí (avšak při zachování jejich vzájemného poměru 1 díl NaCl: 4 dílům MgSO₄). S přidaným množstvím solí se pozvolna zvyšuje odezva (absorbance při vlnové délce absorpčního maxima) a současně se mírně zmenšuje objem extrakční fáze. Tento objem se v proměřené škále již přibližně od přídatku solí 0,5 g NaCl: 2,0 g MgSO₄ zásadně nemění.

Pro optimalizaci byl připraven pracovní vodný roztok směsi 6 syntetických barviv, který byl dále extrahován za různých podmínek dle navrženého experimentálního uspořádání dle centrálního kompozitního plánu. Na základě předběžných analýz byly vybrány 3 parametry, tj. pH (přídavek 35 % HCl), přídavek solí (se zachováním jejich poměru 1 díl NaCl: 4 dílům MgSO₄) a množství extrakčního rozpouštědla. Pro zajištění maximálního zakoncentrování bylo pro extrakci odebráno 5 ml pracovního vodného roztoku směsi barviv. Z hlediska objemu extrakčního rozpouštědla byl zvolen nejnižší objem na 2 ml propan-1-olu. Při menším objemu již nedochází k oddělení organické fáze. Maximální přídavek 5 ml propan-1-olu by neměl být překročen, protože poté by nedocházelo k zakoncentrování barviva. Maximální přídavek solí byl nastaven na 3 g (0,6 g NaCl a 2,4 g MgSO₄), v tomto případě po 5 minutách intenzivního třepání zůstalo malé množství soli nerozpuštěno. Pro zhodnocení vlivu přídatku kyseliny byla extrakce sledována bez přídatku kyseliny (byl použit 1 ml vody), s přídatkem 0,5 ml HCl + 0,5 ml vody a nakonec 1 ml 35 % HCl. Získané odezvy byly vyhodnoceny metodou odezvové plochy (RSM) a statisticky vyhodnoceny softwarem Statistica cz, verze 10.0.

Optimalizace extrakčních podmínek pro metodu QuEChERS byla vyhodnocena jak na základě analýzy extraktů kapalinovou chromatografií, tak i spektrofotometrickým měřením. Zjištěné hodnoty optimálního složení extrakčního systému pro jednotlivá barviva dle barevnosti jsou téměř shodné, pouze u žlutých barviv vychází jako nejlepší přídavek 1 ml 35 % HCl. Zjištěný rozdíl může být způsoben nižší citlivostí vyhodnocovaných absorpčních spekter, protože absorpční maxima byla vyhodnocena při charakteristické vlnové délce daného barviva, avšak ne ze spektra samotného barviva, ale ze spekter směsi po extrakci.

Jako optimální podmínky extrakce byly vyhodnoceny 2 ml propan-1-olu jako extrakčního činidla, přídavek 3 g solí (0,6 g NaCl a 2,4 g MgSO₄) a 0,75 ml 35 % HCl.

Aplikace na reálné vzorky

Při analýze obsahu barviv ve vzorcích červených lentilek bylo zjištěno, že obsah barviva v různých kusech stejné barvy se prakticky neliší. Určení obsahu příslušných barviv v lentilkách udává tab. 1.

Tabulka 1: Zjištěné hodnoty obsahu syntetických potravinářských barviv ve vzorcích při zohlednění výtěžnosti každého barviva

vzorek	stanovená barviva	množství (µg/ks)	RSD (%)
lentilka červená	E129	317,66	0,86
	E102	28,25	6,67
lentilka hnědá	E129	134,80	0,49
	E133	11,38	3,12
lentilka modrá	E133	23,71	0,55
lentilka žlutá	E102	141,72	5,45
lentilka zelená	E102	120,82	2,95
	E133	9,80	0,36

Z hlediska obsahu syntetických barviv ve vzorcích lentilek by pro překročení hodnoty ADI muselo být zkonsumováno velké množství lentilek (viz tab. 2).

Tabulka 2: Překročené hodnoty ADI syntetických barviv ve vzorcích lentilek denně osobou vážící 70 kg:

vzorek	ADI (mg/kg tělesné váhy/den)	překročeny hodnoty ADI
lentilka žlutá (E102)	7,5	zkonsumováno přes 3700 ks
lentilka červená (E129)	7	zkonsumováno přes 1500 ks
lentilka modrá (E133)	10	zkonsumováno přes 17500 ks

Závěr

Byly zjištěny optimální podmínky extrakce syntetických potravinářských barviv metodou QuEChERS. Pro optimalizaci bylo vybráno 6 barviv – dvě žlutá (E102 a E104), dvě červená (E124 a E129) a dvě modrá (E131 a E133).

Optimalizace s plánováním experimentu dle principů centrálního kompozitního plánu (CCD) byla provedena z hlediska objemu extrakčního rozpouštědla, přidaných solí a objemu přidané 35 % HCl. Na základě statistického vyhodnocení odezvové plochy (RSM) všech barviv v extraktech kapalinovou chromatografií byly jako nejvhodnější určeny 2 ml extrakčního činidla propan-1-olu, 3 g solí (0,6 g NaCl, 2,4 g MgSO₄) a přídavek 0,75 ml 35 % HCl. Optimalizace provedená na základě spektrofotometrických dat se liší pouze v objemu přidané kyseliny (dle spektrofotometrie je optimální přídavek 0,25 ml 35 % HCl). Tento rozdíl může být způsoben vyhodnocením absorbancí při charakteristické vlnové délce ze spekter směsi po extrakci. Navržená metoda může být vhodnou alternativou pro extrakční metodu vybarvování vlněného vlákna.

Literatura

- [1.] Vyhláška č. 304/2004 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. Sbírka zákonů č. 304/2004, částka 100, 6326.
- [2.] VELÍŠEK J. , HAJŠLOVÁ J. : *Chemie potravin 3*. 2009, OSSIS, Tábor , s.1-66 ISBN 80-86659-02-3.
- [3.] FRANCIS F. J. : *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*, 1999, Wiley, ISBN 0471192856.
- [4.] PINTO C. G. , LEASPALA M. E. , MARTIN S. H. , FERREIRA A. M. , PAVÓN J. L. : *Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples*. Talanta 2010, roč. 81, s. 385.

Abstract

QuEChERS method was applied for the extraction of synthetic food dyes from confectionery samples. Extraction conditions were optimized in terms of a suitable extraction solvent, its amount, a pH adjustment and an addition of salts. As the suitable system for 5 mL of sample, 2 mL of propan-1-ol as the extraction solvent with addition of 0.6 g NaCl, 2.4 g MgSO₄, and 0.75 mL of 35 % HCl was found. The optimized extraction conditions were statistically evaluated by analysis of extracts by liquid chromatography with detection in the visible region.