

Benzoésav és szorbinsav egymás melletti meghatározása nagynyomású folyadékkromatográffal

Nagy Erzsébet és Gosztonyi Etelka

Hajdú-Bihar megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás,
Debrecen

Érkezett: 1992. szeptember 5.

Az élelmiszeriparban a legelterjedtebben alkalmazott tartósítószer a benzoésav és a szorbinsav. Nem toxikus hatásúak, mivel nem halmozódnak fel a szervezetben. A benzoésav hippursavvá alakulva ürül ki, míg a szorbinsav biológiai oxidáció során széndioxidra és vízre bomlik.

A benzoésavat általánosabban alkalmazzák, mint a szorbinsavat, mivel nincs kedvezőtlen izmódosító hatása, mely korlátozná felhasználási lehetőségeit. Ezért egyre gyakrabban a szorbinsav kisebb koncentrációja mellett benzoésavat is felhasznál az ipar az élelmiszer-termékek tartósítására. Ez a jelenség egyúttal magában hordozza a két tartósítószer egymás melletti meghatározásának problémáját. Ehhez kapcsolódik még az élelmiszereknek, mint mátrix anyagoknak az összetettsége (zsír, fehérje, szénhidrát, aroma és színezékek), melyek ugyancsak nehézséget okoznak a kvantitatív meghatározáskor. A tartósítószer egymástól és a termékekben lévő egyéb anyagoktól történő elválasztására legcélszerűbb a nagynyomású folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmazni. A korábbi mérések elsősorban titrimetrián, kolorimetrián és spektrofotometrián [1-6] alapultak. Az első próbálkozások az egymás melletti meghatározásra a derivatív spektrofotometriás módszerek voltak [7, 8]. Ezt követte a gázkromatográfia [6, 9], majd a nagynyomású folyadékkromatográfia. A HPLC-nek az élelmiszer-analitikában való térhódítása lehetővé teszi annak rutinszerű alkalmazását. Ezt több közlemény is igazolja [3, 11-16].

Intézetünkben HPLC-s módszert dolgoztunk ki benzoésav és szorbinsav egymás melletti meghatározására, mivel a rutinszerűen alkalmazott UV spektrofotometriás módszerek [4, 5, 10] az élelmiszer mátrixok zavaró hatásai miatt nem specifikusak.

Anyagok és módszerek

1. Készülék

A meghatározásokat Waters nagynyomású folyadékkromatográffal végeztük, Waters 490 E programozható, változtatható hullámhosszú UV detektorral. Az azonosítás Waters 994 típusú diódasoros UV detektorral történt az anyagok UV spektruma alapján. A kiértékelést Baseline 810-

es programmal, terület alatti integrálással végeztük. A benzooesavat 230 nm-en, a szorbinsavat 262 nm-en mértük.

Elválasztásra Radial Pak TM C₁₈ 8x100 mm-es, 4 µm-es szemcseméretű kolonnát használtunk. Az injektált mennyiség minden esetben 20 µl volt. Az eluens 0,0185 M nátrium-acetát pH 4,5 puffer : acetonitril 70:30 arányú elegye volt. A pH-t ecetsavval állítottuk be. A mobil fázist 0,45 µm pórusátmérőjű szűrőn szűrtük, majd ultrahangos készüléken 5 percig buborékmentesítettük. Az eluens áramlási sebessége 1 cm³/perc volt.

2. Anyagok és reagensek

A benzooesav, a szorbinsav és a nátrium-acetát MERCK minőségűek, a kénsav a foszforsav, a nátrium-hidroxid, a vízmentes nátrium-szulfát, a kálium-hexaciano-ferrát(II), a kristályos cink-szulfát Reanal alt. minőségűek, a petroléter 30-40 °C Carlo Erba, az acetonitril RS per HPLC Carlo Erba minőségűek voltak.

Desztillált vízként ioncserélés utáni üvegekészülékből desztillált vizet használtunk.

Carrez I. oldat: 15 g kálium-[hexaciano-ferrát(II)]-ot 100 cm³-es mérőlombikba deszt. vízben feloldunk, majd jelig töltjük.

Carrez II. oldat: 30 g kristályos cink-szulfátot oldunk fel 100 cm³-es mérőlombikba deszt. vízzel és jelig töltjük.

A folyadék-szilárd extrakcióhoz SPE C₁₈ (250 mg) BST mintaelőkészítő oszlopokat használtunk.

3. Standard oldatok készítése

Folyadék-folyadék extrakció

100 mg benzooesavnak megfelelő mennyiségű nátrium-benzoátot, illetve 100 mg szorbinsavat oldunk 100 cm³-es mérőlombikba desztillált vízzel és jelig töltjük. Rázótölcsérbe pipetázunk ebből a törzsoldatból 50 cm³-t, majd hozzáadunk 2 cm³ Carrez I. és 2 cm³ Carrez II. oldatot. Állni hagyjuk 30 percig, majd megsavanyítjuk 2 cm³ 20%-os foszforsavval és 2x40 cm³ dietil-éterrel extraháljuk. Az éteres extraktumokat összegyűjtjük kb. 10 g vízmentes nátrium-szulfáton megszáritjuk. Redős szűrőpapíron keresztül gömblombikba szűrjük. A vízmentes nátrium-szulfátot még 2x10 cm³ éterrel átmoszuk és azt is a gömblombikba szűrjük. Vákuumban, 40°-on 2-3 cm³-re bepároljuk. Kb. 5 cm³ acetonitrilt adunk hozzá és folytatjuk a bepárlást 2-3 cm³-re. A maradékot eluenssel 50 cm³-es mérőlombikba mossuk át és jelig töltjük. A kalibrációhoz ebből a törzsoldatból eluenssel hígítva készítjük az oldatokat benzooesav esetében 0-300 µg/cm³, szorbinsav esetében 0-75 µg/cm³ koncentráció-tartományban.

Szilárd-folyadék extrakció

100 cm³-es mérőlombikba bemérünk 100 mg benzoésavnak megfelelő mennyiségű nátrium-benzoátot vagy szorbinsavat, melyet 30 cm³ desztillált vízben feloldunk. Hozzáadunk 2 cm³ Carrez I. és 2 cm³ Carrez II. oldatot és jelig töltjük desztillált vízzel. Az SPE C₁₈ oszlopot aktiváljuk 5 cm³ acetonitrillel, majd 10 cm³ 1 v/v %-os foszforsavval. Az áramlás sebessége 1 cm³/perc legyen. Vigyázva, hogy a szorbens nedves állapotban maradjon ugyancsak 1 cm³/perc sebességgel átbocsátjuk a kolonnán 2 cm³ 1 mg/cm³ koncentrációjú standard törzsoldatot, melyet előbb 1-2 csepp 85%-os foszforsavval megsavanyítunk. Mossuk 5 cm³ 1%-os foszforsav oldattal, majd 0.25 cm³ 6 mM-os nátrium-hidroxiddal. Az organikus savakat 2 cm³ 6 mM-os nátrium-hidroxiddal eluáljuk egy 5 cm³-es mérőlombikba. Az eluátumot 2-3 csepp 85%-os foszforsavval megsavanyítjuk (pH 1-2), majd eluenssel jelig töltjük. Az így kapott standard törzsoldatból mobil fázissal hígítva készítjük a kalibrációs sor oldatait.

4. Mintaextrakciós eljárások

Folyadék-folyadék extrakció

10 g **mustár** vagy 10 g **légszáraz diabetikus kenyér** mintát desztillált vízzel elszuszpendálunk és 100 cm³-es mérőlombikba mosunk. Fenolftalein indikátor mellett 1 M-os nátrium-hidroxiddal enyhén meglúgosítjuk. Hozzáadunk 2 cm³ Carrez I. és 2 cm³ Carrez II. oldatot, majd jól összerázzuk és desztillált vízzel jelig töltjük.

Az oldatot állni hagyjuk 30 percig, majd Erlenmeyer lombikba szűrjük redős szűrőpapíron keresztül. 50 cm³ szűrletet egy rázótolcsérbe pipettázunk, megsavanyítjuk 2 cm³ 20%-os foszforsavval és extraháljuk kétszer 40 cm³ dietil-éterrel. Az éteres extraktokat összegyűjtjük, szárítjuk 10 g vízmentes nátrium-szulfáton. Redős szűrőpapíron keresztül gömblombikba szűrjük. A vízmentes nátrium-szulfátot még 2x10 cm³ éterrel átmoszuk és azt is a gömblombikba szűrjük. Vákuumban 40°C-on 2-3 cm³-re bepároljuk. Kb. 5 cm³ acetonitrilt adunk hozzá és folytatjuk a bepárlást 2-3 cm³-re. A maradékot eluenssel 10 cm³-es mérőlombikba mossuk és jelig töltjük. A savtartalomtól függően hígítást készítünk.

Szilárd-folyadék extrakció

10 g **mustár** vagy 10 g **légszáraz diabetikus kenyér** mintát desztillált vízzel elszuszpendálunk és 100 cm³-es mérőlombikba mosunk. Fenolftalein indikátor mellett 1 M-os nátrium-hidroxiddal enyhén meglúgosítjuk. Hozzáadunk 2 cm³ Carrez I. és 2 cm³ Carrez II. oldatot, majd jól összerázzuk és desztillált vízzel jelig töltjük. Az oldatot állni hagyjuk 30 percig, majd Erlenmeyer lombikba szűrjük redős szűrőpapíron keresztül. A szűrletből 0,45 µm szűrőn megszűrünk 3-4 cm³-t, mely-

ből 2 cm³-t 1-2 csepp 85 %-os foszforsavval megsavanyítunk és 5 cm³-re hígítunk desztillált vízzel. Ezután a teljes mennyiséget az előkészített oszlopra visszük. A szerves savak az oszlop felső részében kötődnek meg az adszorbensen.

Mossuk az oszlopot 5 cm³ 1 v/v %-os foszforsav oldattal, majd 0,25 cm³ 6 mM-os nátrium-hidroxiddal, melyeket előtünk.

Egyik oldat sem tartalmazott benzoésavat vagy szorbinsavat. A szerves savak eluálását 2 cm³ 6 mM-os nátrium-hidroxiddal végeztük. Az eluátumot 5 cm³-es mérőlombikba szedtük, savanyítottuk 1-2 csepp 85 %-os foszforsavval és eluenssel jelig töltöttük. Ebből az oldatból készítettük a hígítást, melyből injektáltunk a készülékbe.

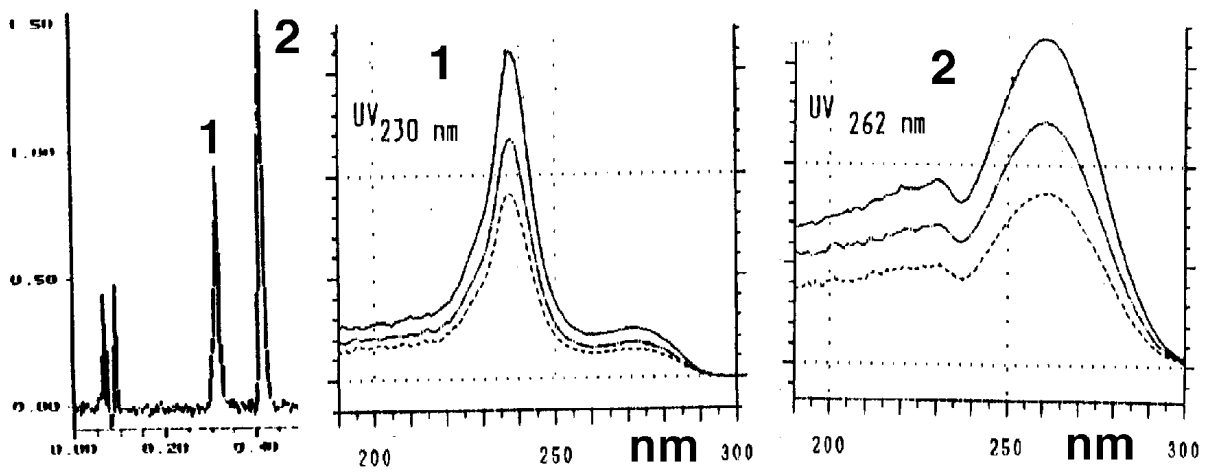
Az SPE C₁₈ oszlopot ismételten eluálva 2 cm³ 6 mM-os nátrium-hidroxiddal nem tartalmazott meghatározandó anyagot.

Eredmények

Az élelmiszerek tartósítására felhasznált benzoésav és szorbinsav egymás melletti meghatározását dolgoztuk ki nagynyomású folyadékkromatográfra.

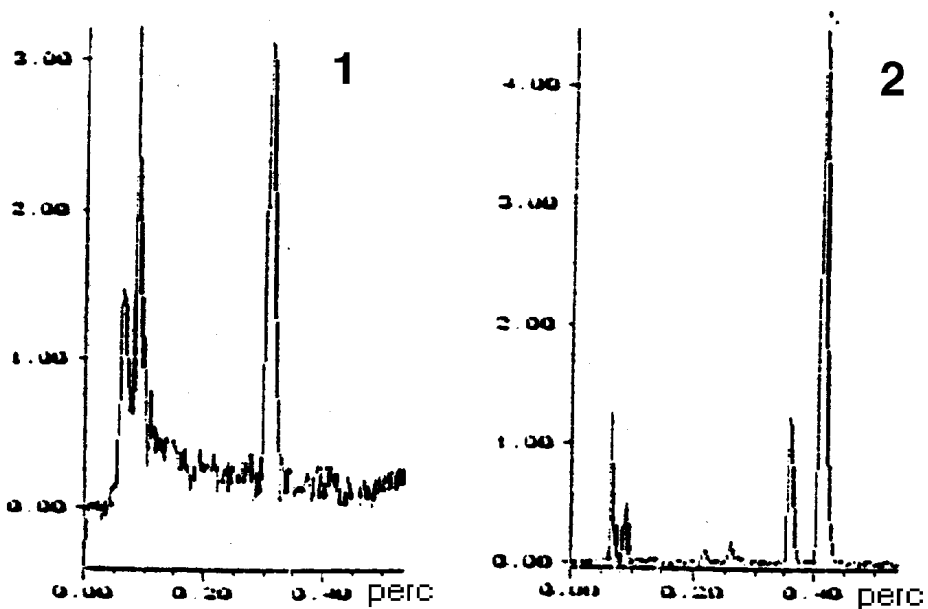
A módszer kifejlesztését az tette indokolttá, hogy új termékként bevezetésre kerülő mustár benzoésav és diabetikus kenyér szorbinsav tartalmát - az MSZ szabványok alapján spektrofotometriásan meghatározva - a maximálisan engedélyezett érték fölött találtuk, a szerves savakkal interferáló egyéb kísérő anyagok jelenléte miatt. Első lépésként a kromatográfiás szétválasztást tűztük ki célul, majd pedig a hosszú előkészítési műveletek lerövidítését. A kromatográfiás elválasztásra felhasznált eluens pH-jának, szerves oldószer tartalmának, valamint puffer koncentrációjának változtatásával a korábban már megadott mobil fázist találtuk a legmegfelelőbbnek.

Viszonylag rövid idő alatt kromatográfiásan szétválasztható volt a benzoésav és a szorbinsav. A benzoésav retenciós ideje 3,2 percnek, a szorbinsavé 4,2 percnek adódott. A benzoésavat 1 µg injektált mennyiség esetén (n=5) ±2,1 %, míg a szorbinsavat (n=5) ±3,4 % relatív standard deviációval tudtuk meghatározni. A benzoésav kalibrációs egyenese 0-300 µg/cm³, a szorbinsavé 0-75 µg/cm³ tartományban lineáris volt. A kimutatási határ benzoésav esetében 0,2 µg/cm³, szorbinsavnál 0,1 µg/cm³ volt 3:1 jel/zaj aránynál.



1. ábra: 1 µg injektált tartósítószer standardok HPLC-s kromatogramja és UV spektrumai. Jelölések: 1 - benzooesav, 2 - szorbinsav

Szilárd-folyadék extrakciónál, SPE C₁₈ oszlopot használva vizes minta tisztítására és dúsítására szükséges, hogy olyan vízzel elegyedő szerves oldószert használjunk, mely az eluens rendszerrel is kompatibilis. Esetünkben ez az acetonitril volt. Víz helyett 1 %-os foszforsav oldatot alkalmaztunk, mely segítette a benzooesav és a szorbinsav megkötődését az oszlopon és egyúttal eltávolította a savban oldódó interferáló anyagokat. A nátrium-hidroxid a benzooesavat és a szorbinsavat poláros sóikká alakította, melyek már könnyen eluálhatók voltak az oszlopról.



2. ábra: SPE C₁₈-as oszlopon előkészített mustár minta (1) és diabetikus kenyér minta (2) kromatogramjai
Jelölés: 1 - 0,54 µg benzooesav, 2 - 1,2 µg szorbinsav

Meghatároztuk a mintákból történő visszanyerést folyadék-folyadék extrakciók esetében. A vízzel elszuszpendált mustár mintához 50 és 100 µg mennyiségű benzooesav standardot, az ugyancsak elszuszpendált diabetikus kenyérmintákhoz szintén 50 és 100 µg szorbinsavat adtunk. A minták előkészítését n=5 esetben végeztük el a fent leírtaknak megfelelően. Az 1. táblázat a benzooesav a 2. táblázat a szorbinsav visszanyerését mutatja a hozzájuk tartozó relatív standard deviációkkal (SD), %-ban kifejezve.

1. táblázat:

Benzooesav visszanyerési határfoka mustár mintából folyadék-folyadék és szilárd-folyadék extrakció esetén.

Hozzáadott standard mennyiség µg	Visszanyerés határfoka ± SD (%)	
	folyadék-folyadék extrakció	szilárd-folyadék extrakció
50	89 ± 10	95 ± 3
100	92 ± 5	97 ± 2

2. táblázat:

Szorbinsav visszanyerési határfoka diabetikus kenyér mintából különböző extrakciós eljárásokkal.

Hozzáadott standard mennyiség µg	Visszanyerés határfoka ± SD (%)	
	folyadék-folyadék extrakció	szilárd-folyadék extrakció
50	89,7 ± 4,0	92,5 ± 1,5
100	90,3 ± 3,5	95,1 ± 2,0

A két előkészítési módszert összehasonlítva megállapítható, hogy a tartósítószeres nagyobb visszanyerési határfokkal és nagyobb pontossággal határozhatók meg szilárd-folyadék extrakció alkalmazása esetén. Ennek a módszernek az anyag, az idő és az energiafelhasználása is lényegesen alacsonyabb a hagyományos folyadék-folyadék extrakciónál. Az anyagfelhasználás tovább csökkenthető az előkészítő SPE C₁₈-as oszlopok regenerálásával. 8-10 ismételt felhasználás mellett még nem tapasztaltuk a kolonna hatékonyságának csökkenését. A regenerálást úgy végezzük, mint a kolonna aktiválását.

Az általunk javasolt kromatográfias rendszerben a benzooesav és a szorbinsav jól elválik egymástól, a kidolgozott módszer kvantitatív meghatározásra alkalmas. A mintaelőkészítés a kidolgozott szilárd-folyadék extrakciós eljárás alkalmazása esetén egyszerűen, gyorsan és nagy pontossággal megvalósítható, mely lehetővé teszi rutinszerű alkalmazását az élelmiszeralitikában.

Irodalom

1. Wilamowski G.: Collaborative Study of a Spectrophotometric Method for the Determination of Sorbic Acid in Fresh Dairy Products, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **57** (1974) 675-677
2. Caputi J.R.A. and Stafford: P.A. Ruggedness of Official Colorimetric Method for Sorbic Acid in Wine, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **60** (1977) 1044-1047
3. Sieber R., Bütikofer U., Bosset J. O. und Rüegg. M.: Benzoesäure als natürlicher Bestandteil von Lebensmitteln - eine Übersicht (Review/, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **80** (1989) 345-362
4. MSZ 1817-85. Tartósított élelmiszerek szorbinsavtartalmának meghatározása
5. MSZ 3636-86 Tartósított élelmiszerek benzoosavtartalmának meghatározása
6. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Inc. 1984. Arlington. Virginia, U.S.A.
7. Lopez J. and Simal J.: Determination of sorbic acid and benzoic acids by second derivative UV-Spectroscopy, *An. Bromatol*, **34** (1982) 113-121
8. Almela L. and Lopez-Roca J.M.: Simultaneous determination of sorbic and benzoic acid by differential ultraviolet spectrophotometry, Application to fruit juices, *Sci. Aliments*, **4** (1984) 37-44
9. Larson B. K.: Gas-Liquid Chromatographic Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Foods: NMKL Collaborative Study, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **66** (1983) 775-780
10. Kreutz Attiláné, Tóthné Aranyos Irén: Benzoesav és szorbinsav egymás melletti meghatározása UV-fotometriás módszerrel, *ÉVIK*, **37** (1991) 219-225
11. Leuenberger U., Gauch P. and Baumgartner E.: Determination of food preservatives and Saccharin by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr*, **173** (1979) 343-348
12. James F. Fisher: High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Sodium Benzoate when used as a tracer to detect pulp wash adulteration of Orange Juice, *J. Agric. Food Chem.*, **31** (1983) 66-68
13. Puttemans M. L., Branders C., Dryon L. and Massart D. L.: Extaction of organic acids by ion-pair formation with tri-n-octylamine. VI. Determination of sorbic acid, benzoic acid, and saccharin in yoghurt, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **68** (1985) 80-82
14. Küppers F. J. E. M. and Jaus, J. A.: Reverse-phase liquid chromatographic determination of benzoic acid and sorbic acid in fresh cheese, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **71** (1988) 1068-1071
15. Bütikofer U., Baumann E. und Bosset J. O.: Eine verbesserte HPLC-Methode zur Bestimmung von Sorbinsäure in Milchproducten unter spezieller Berücksichtigung von Artefakten, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **79** (1988) 392-405
16. Sieber R., Bütikofer E., Baumann E. und Bosset J. O.: Über die Benzoesäurebildung und -verteilung während der Herstellung und Reifung von geschmierten Käsen, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **81** (1990) 722-730

Benzoésav és szorbinsav egymás melletti meghatározása nagynyomású folyadékkromatográffal

Nagy Erzsébet és Gosztonyi Etelka

Módszert dolgoztak ki benzoésav és a szorbinsav egymás melletti meghatározására nagynyomású folyadékkromatográffal, programozható UV detektorral. A benzoésavat 230 nm-en, a szorbinsavat 262 nm-en mérték, diódasoros UV detektorral azonosították. Szilárd-folyadék előkészítési módszert dolgoztak ki mustárból és diabetikus kenyérből történő benzoésav és szorbinsav meghatározásokra, melyeket, összehasonlították a hagyományos folyadék-folyadék extrakciós módszerrel. A kidolgozott szilárd-folyadék extrakciós eljárás jól alkalmazható a gyakorlatban megfelelő pontossága, jó reprodukálhatósága és alacsony időigénye miatt. A javasolt HPLC-s eljárás lehetővé teszi a tartósítószernek egymás melletti pontos, kvantitatív meghatározását is.

Simultaneous determination of benzoic and sorbic acid by high pressure liquid chromatography

Nagy, E. and Gosztonyi, E.

A method was developed for simultaneous determination of benzoic and sorbic acid by high pressure liquid chromatography, using a programmable UV detector. Benzoic acid was measured at 230 nm, while sorbic acid at 262 nm and both were identified by diode array UV detector. A solid-liquid extractive sample preparation method was developed for the determination of benzoic and sorbic acid from mustard and diabetic bread, which was compared to the traditional liquid-liquid extraction method. The solid-liquid extraction procedure developed by us is useful in practice with a relevant precision, good reproducibility and low time demand. The HPLC procedure proposed allows the simultaneous and exact quantitative determination of conserving agents, too.

Bestimmung von Benzoe- und Sorbisäure nebeneinander mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Nagy, E. und Gosztonyi, E.

Eine Methode wurde für die Parallelbestimmung von Benzoe- und Sorbinsäure mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie unter Anwendung des programmierbaren UV-Detektors erarbeitet. Die Benzoésäure wurde bei 230 nm und die Sorbinsäure bei 262 nm gemessen sowie mit einem Diodenreihe - UV-Detektor identifiziert. Es wurde eine fest-flüssige Probenvorbereitungsmethode für die Bestimmung von Benzoe- und Sorbinsäure im Senf und Diabetikerbrot ausgearbeitet, die mit dem traditionellen flüssig-flüssig Extraktionsverfahren verglichen wurde. Das erarbeitete fest-flüssig Extraktionsverfahren kann in der Praxis wegen seiner ausreichenden Genauigkeit, guten Reproduzierbarkeit und seinem geringen Zeitbedarf gut verwendet werden. Das vorgeschlagene HPLC-Verfahren ermöglicht auch die quantitative Parallelbestimmung von Konservierungsmitteln.