

УДК 543.6

\*Е. Сайлауханулы, А.С. Бокарева, А.А. Казбекова

Центр физико-химических методов исследования и анализа,  
Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы  
\*E-mail: s.erbolat@mail.ru

### **Оптимизация методики определения пищевых добавок бензоата натрия и сорбата калия в молоке и безалкогольных напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Оптимизирован метод определения пищевых добавок бензоата натрия (Е 211) и сорбата калия (Е 202) в молоке и безалкогольных напитках с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 75 x 4,6 мм размером частиц 3 мкм. Детектирование проводили при длине волны 235 нм с одновременной регистрацией спектра в диапазоне 190-900 нм. Время анализа составило 3,5 мин. Предел обнаружения для бензоата натрия составил 0,07 мг/л, а для сорбата калия – 0,06 мг/л.

**Ключевые слова:** консерванты, бензоат натрия, сорбат калия, жидкостная хроматография.

Е. Сайлауханулы, А.С. Бокарева, А.А. Казбекова

### **Жоғары эффективті сұйық хроматография әдісімен тағам қоспалары натрий бензоаты мен калий сорбатының сүт және сусындарда анықтау әдістемесін оңтайландыру**

Жоғары эффективті сұйық хроматография әдісімен тағам қоспалары натрий бензоаты (Е 211) мен калий сорбатының (Е 202) сүт және сусындарда анықтау әдістемесін оңтайландырылды. Хроматографиялық бөлу ұзындығы 75 мм, ішкі диаметрі 4,6 мм және бөлшектерінің өлшемі – 3 мкм болатын Zorbax Eclipse XDB-C18 колонкасының көмегімен іске асырылды. Детектірлеу толқын ұзындығы 235 нм жүзеге асырылды және спектр 190-900 нм диапазонында тіркелді. Анализ уақыты 3,5 мин құрады. Әдістің анықтау шегі натрий бензоаты үшін 0,07 мг/л, ал калий сорбаты үшін 0,06 мг/л құрады.

**Түйін сөздер:** консерванттар, натрий бензоаты, калий сорбаты, сұйық хроматографиясы.

Ye. Sailaukhanuly, A.S. Bokareva, A.A. Kazbekova

### **Optimization of determination method of food preservatives sodium benzoate and potassium sorbate in milk and beverages by high performance liquid chromatography**

Determination method of food preservatives sodium benzoate (E 211) and potassium sorbate (E 202) in milk and beverages by high performance liquid chromatography was optimized. Chromatographic separation was performed on a column Zorbax Eclipse XDB-C18 with 75 mm length, 4.6 mm internal diameter and particle size – 3 microns. Detection was performed at 235 nm wavelength with simultaneous recording of the spectrum in the range 190-900 nm. The time of analysis was 3.5 min. The detection limit for sodium benzoate was 0.07 mg/L for potassium sorbate and 0.06 mg/L.

**Key words:** preservatives, sodium benzoate, potassium sorbate, liquid chromatography.

## **Введение**

По определению Комиссии ФАО-ВОЗ «Кодекс Алиментариус» (Codex Alimentarius) к пищевым добавкам относят «любые вещества, в нормальных условиях не употребляемые как пища и не используемые как типичные ингре-

диенты пищи, независимо от наличия у них пищевой ценности, преднамеренно добавляемые в пищу для технологических целей (включая улучшение органолептических свойств) в процессе производства, обработки, упаковки, транспортировки или хранения пищевых продуктов» [1]. В настоящее время число применяемых для

производства пищевых продуктов добавок достигает более 500 наименований. Основными причинами столь широкого использования пищевых добавок можно считать:

- 1) развитие торговли и необходимость перевозки продуктов питания (в том числе скоропортящихся) на большие расстояния;
- 2) повышение требования современного потребителя к качеству и ассортименту продуктов питания;
- 3) создание новых видов пищи, отвечающей требованиям науки о питании (низкокалорийные продукты, имитаторы мясных, молочных и рыбных продуктов) [2].

Однако в определенных условиях добавки пищи могут стать причиной интоксикации организма человека. Так по данным Международной организации пищевых продуктов и сельского хозяйства ФАО многие из современных используемых пищевых добавок (Е 100 – Е 900) способны вызывать злокачественные опухоли, заболевания печени, почек и желудочно-кишечного тракта, а также различные аллергии. Вследствие этого, большое внимание в вопросах безопасности продуктов питания уделяется научным исследованиям, поскольку новые современные методы анализа безопасности пищевой продукции позволяют выявить ранее неизвестные риски.

С каждым годом увеличивается список запрещенных Е-добавок, опасность потребления которых уже научно доказана [2]. Однако существует категория вредных пищевых добавок разрешенных в ряде стран Европы, США и на территории Таможенного Союза [3-4], но их регулярное употребление также приводит к нежелательным побочным эффектам.

К одним из таких разрешенным, но вредным пищевым добавкам относятся бензоат натрия (Е 211) и в меньшей степени сорбат калия (Е 202), основным действием которых является подавление развития микроорганизмов, и, тем самым, предотвращение микробиологической порчи пищевых продуктов. В частности бензоат натрия (бензойная кислота) блокирует ферменты, замедляя обмен веществ в одноклеточных организмах [2]. Однако чрезмерное потребление бензоата натрия представляет реальную угрозу для здоровья в отличие от сорбата калия, вызывающего лишь редкие аллергические реакции.

В 2007 г. профессором Питером Пайпером из Шеффилдского университета (Великобритания)

сделано предположение о возможном влиянии бензоата натрия на митохондриальные ДНК клеток живых организмов, что может приводить к нарушению обмена веществ, циррозу печени, а также к дегенеративным заболеваниям. Кроме того, установлено, что бензоат натрия при взаимодействии с витамином С (аскорбиновой кислотой) образует бензол, который обладает канцерогенными свойствами и приводит к раковым заболеваниям [5].

Таким образом, существует необходимость в оптимизации существующих методик по определению бензоата натрия и сорбата калия, поскольку они не удовлетворяют требованиям простоты исполнения и экспрессности результатов.

### Результаты и обсуждения

Анализ имеющихся методик по определению бензоата натрия и сорбата калия в молоке и напитках, а также результаты предварительных экспериментов дали возможность оптимизации методики определения бензоата натрия и сорбата калия методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для эффективного определения бензоата натрия и сорбата калия методом ВЭЖХ необходимо в первую очередь подобрать неподвижную фазу, показывающую наибольшую эффективность удерживания. Вторых, для подбора оптимальных параметров хроматографирования, в том числе сорбента, нужно выявить зависимость времени удерживания от полярности подвижной фазы, которая регулируется изменением соотношения ацетонитрила (ACN) к буферному раствору с учетом специфики неподвижной фазы.

Нами было исследовано три колонки, имеющие длину 75 см, внутренний диаметр 4,6 мм, и размер частиц 3 мкм, с различной привитой фазой: октилсилан (Zorbax Eclipse XDB-C8), октадецилсилан (Zorbax Eclipse XDB-C18) и фенил (Zorbax Eclipse XDB-Phenyl). Как известно, все колонки с фазой Zorbax Eclipse XDB (Extra Densely Bonded) используются для разделения при средних значениях pH, так как остаточные силанолы более активны и способны принимать участие во вторичных процессах, что ухудшает форму пиков и разделение веществ. Для предотвращения этих процессов в колонке Zorbax Eclipse XDB эти силанолы метилированы и дважды защищены метильными группами. Эти

модификации позволяют работать в интервале рН 2-9 в отличие от колонок на основе немодифицированной привитой фазы, для которой рабочий интервал рН составляет 2-7. Кроме того, частички данных сорбентов имеют правильную сферическую форму, что обеспечивает большое время жизни сорбента.

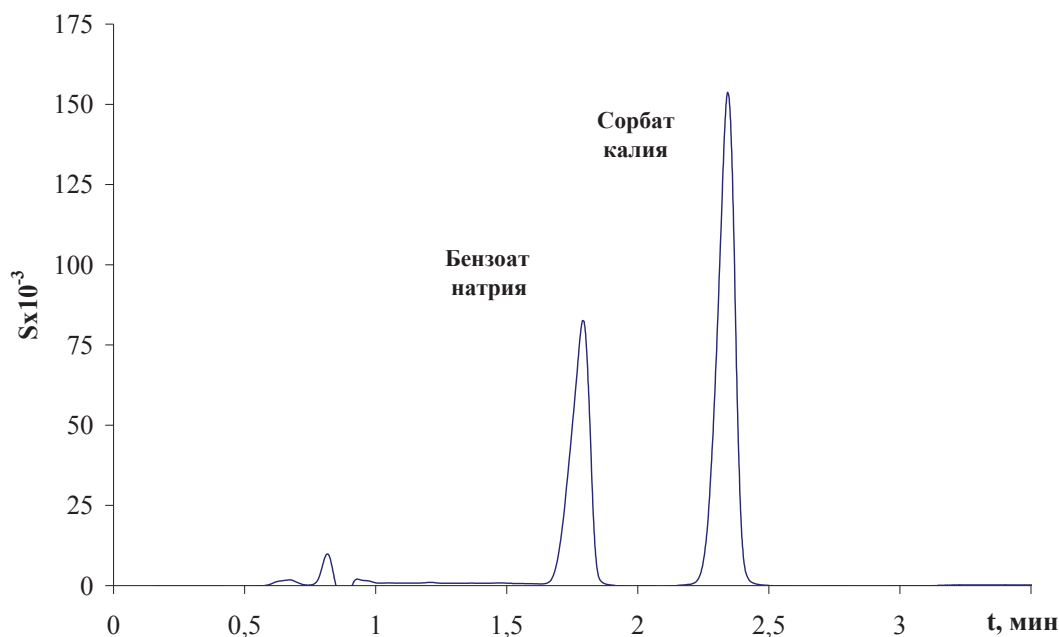
В качестве буферного раствора использовали фосфатный буфер со значением рН 4,66, с учетом специфики исследуемых неподвижных фаз.

Для решения поставленных задач был приготовлен водный раствор смеси бензоата натрия и сорбата калия с концентрацией 20 мг/л. На основе результатов предварительных экспериментов хроматографирование вели при постоянной скорости потока подвижной фазы – 1 мл/мин и объема вводимой пробы – 20 мкл, что соответствует объему установленной «петли».

По данным литературных источников, детектирование проводили при длине волны 235 нм (максимум поглощения), одновременно ре-

гистрируя спектр в диапазоне 190-900 нм (УФ и видимая область). Концентрация ацетонитрила в составе подвижной фазы варьировалась от 10 до 40%, что позволило оценить возможное влияние ее полярности на разделение компонентов модельного раствора.

В результате данного эксперимента установлено, что состав подвижной фазы существенно влияет на разделение и удерживание компонентов модельного раствора. Максимального удерживания и эффективного хроматографического разделения, а также симметричности пиков бензоата натрия и сорбата калия позволяет достичь колонка Zorbax Eclipse XDB-C18, при концентрации ацетонитрила 20% (рисунок 1), что можно объяснить большим сродством привитых октадецильных групп стационарной фазы. Последующее увеличение концентрации ацетонитрила в подвижной фазе сокращает времена удерживания, но приводит к наложению пиков, что затрудняет обработку результатов хроматографирования.



**Рисунок 1** – Хроматограмма разделения бензоата натрия и сорбата калия на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 при 20 % концентрации ацетонитрила в подвижной фазе

Колонка Zorbax Eclipse XDB-C8 показывает хорошее разрешение пиков исследуемых веществ в аналогичных условиях хроматографирования, что делает возможным дальнейшее использование

колонок для разделения бензоата натрия и сорбата калия. Однако увеличение времен удерживания и плохая симметричность пиков веществ делает этап хроматографирования затруднительным.

По результатам исследования фенильной колонки Zorbax Eclipse XDB-Phenyl установлена ее непригодность, для разделения и определения бензоата натрия и сорбата калия при данных условиях.

Таким образом, по ряду объективных причин для дальнейшего определения бензоата натрия и сорбата калия была выбрана колонка Zorbax Eclipse XDB-C18, так как она обеспечивает наилучшие хроматографические показатели. Оптимальным составом подвижной фазы при выбранных параметрах хроматографирования бензоата натрия и сорбата калия на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 является 20% ацетонитрила и 80% буферного раствора. Стоит также отметить времена удерживания исследуемых веществ на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 в выбранных условиях, которые составили для бензоата натрия и сорбата калия – 1,7 мин и 2,3 мин соответственно, что позволяет говорить об экспрессности метода определения.

#### Построение градуировочной зависимости площади пика бензоата натрия и сорбата калия от их концентрации в воде

Выявление градуировочных зависимостей площадей пиков исследуемых веществ от их концентрации в растворе дало возможность дальнейшего анализа реальных образцов. Для этого были приготовлены 10 стандартных растворов

бензоата натрия и сорбата калия при совместном присутствии с концентрацией: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 40; 60; 80; 100 мг/л из рабочего раствора с концентрацией компонентов 100 мг/л.

Полученные зависимости площадей пиков бензоата натрия и сорбата калия от концентрации в растворе описываются уравнениями (1) и (2) в интервале 0,5-100 мг/л и, соответственно:

$$S = 17,573 \times C_{\text{бенз}} \quad (R^2 = 0,9980) \quad (1)$$

$$S = 28,449 \times C_{\text{сорб}} \quad (R^2 = 0,9975) \quad (2),$$

где  $S$  – площадь пика, мЕОП (единица оптической плотности) · с;

$C$  – концентрация вещества, мг/л.

Рассчитанные коэффициенты аппроксимации показывают линейность градуировочных зависимостей в исследуемых диапазонах концентраций.

Расчет предела обнаружения бензоата натрия и сорбата калия осуществлялся по результатам многократного (более 15 раз) хроматографирования раствора с минимальным содержанием компонентов 0,5 мг/л. Параметры хроматографирования оставались неизменными.

В результате статистической обработки выборки из 10 значений были установлены следующие величины (Таблица).

Таблица – Данные статистических расчетов

Наименование параметра	Бензоата натрия	Сорбата калия
Среднее значение определяемой концентрации	0,48	0,53
Стандартное отклонение	0,02	0,02
Среднеквадратическое отклонение	4,98	3,93

где  $n$  – размер выборки,  
 $x$  – случайная переменная.

Исходя из величин стандартных отклонений, можно судить о минимальных пределах обнаружения концентраций (LOD) бензоата натрия и сорбата калия, которые соответственно составили:

$$\text{LOD} = S_{\text{бенз}} \times tr = 0,07 \text{ (мг/л)} \quad (6)$$

$$\text{LOD} = S_{\text{сорб}} \times tr = 0,06 \text{ (мг/л)} \quad (7)$$

где  $S$  – стандартное отклонение.

$tr$  – коэффициент Стьюдента 2,896 при 95%.

Достаточно низкий предел обнаружения для исследуемых веществ, позволяет определять в образцах молока и безалкогольных напитков минимальные количества бензоата натрия и сорбата калия.

#### **Количественное определение бензоата натрия и сорбата калия в образцах молока и безалкогольных напитках**

##### *Напитки*

В качестве объектов для исследования было выборочно закуплено 10 образцов безалкогольных напитков, находящихся в свободном доступе в точках розничной торговли города Алматы.

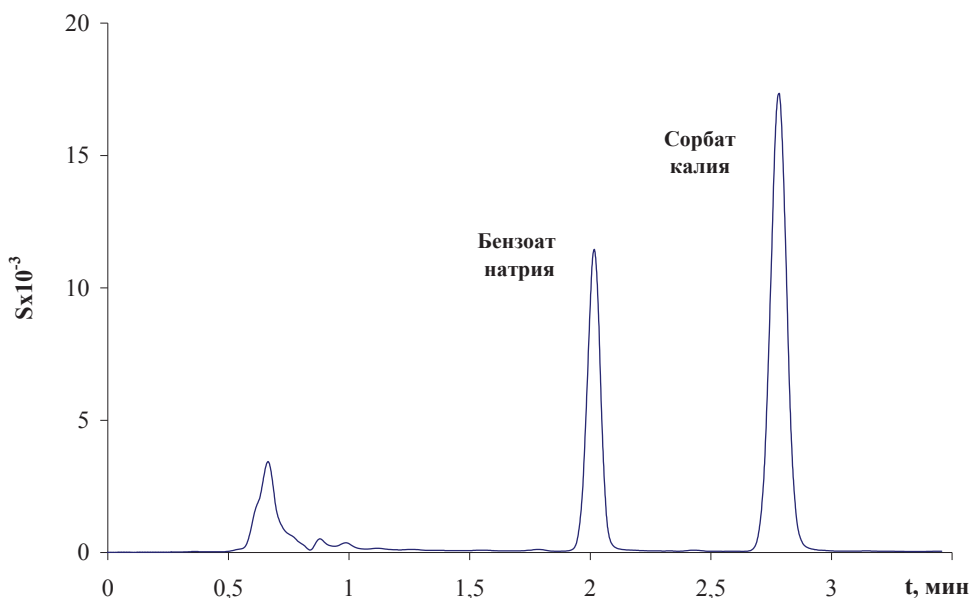
Подготовку напитков к анализу проводили по модифицированной нами ГОСТ методике (ГОСТ Р 52052-2003), с учетом особенностей приборного оснащения.

*Методика определения.* В мерную колбу

объемом 50 мл поместили 2 мл исследуемого образца, экстракцию проводили 20 мл фосфатного буферного раствора на водяной бане при 40°C в течение 5 мин. Далее, к смеси добавили по 1 мл 15% водного раствора гексацианоферата калия (II) и 30% водного раствора ацетата цинка, перемешали и довели до метки дистиллированной водой. Полученный раствор профильтровали через складчатый бумажный фильтр.

Непосредственно для анализа отбирали по 1 мл полученного фильтрата, разбавляли в 10 раз подвижной фазой (20:80) и, пропуская через мембранный фильтр, вводили в хроматограф. Образцы хроматографировали дважды.

На рисунке 2 представлена хроматограмма безалкогольного напитка (сок), где наблюдается некоторое смещение пиков веществ вправо по оси абсцисс, что может быть обусловлено кислой средой самого исследуемого образца.



**Рисунок 2** – Хроматограмма безалкогольного напитка

По результатам обработки полученных хроматограмм всех образцов установлено присутствие в их составе исследуемых консервантов – бензоата натрия в количестве от 7,04 до 46,23 мг/л и сорбата калия от 16,70 до 54,06 мг/л, превышение содержания данных пищевых добавок не обнаружено [3].

##### *Молоко*

Для испытания молока произвольно были отобраны 8 образцов как импортируемого, так и отечественного производства.

##### *Методика:*

Экстракцию проводили в мерной колбе объемом 50 мл, из 2-х мл исследуемого образца

молока 20 мл фосфатного буферного раствора на водяной бане при температуре 40° С. После 5 мин к полученной смеси добавили 1 мл 15% водного раствора гексацианоферата калия (II) и 30% водного раствора ацетата цинка, перемешали и доводили до метки дистиллированной водой. Полученный раствор пропускали через бумажный фильтр.

Для анализа в мерную колбу на 10 мл поме-

щали 1 мл полученного фильтрата, и доводили до метки подвижной фазой (20:80). Готовый к анализу образец через мембранный фильтр вводили в хроматограф.

Полученные в ходе эксперимента хроматограммы подтверждают наличие исследуемых добавок в образцах молока (Рисунок 3), что, согласно техническому регламенту на молоко, недопустимо.

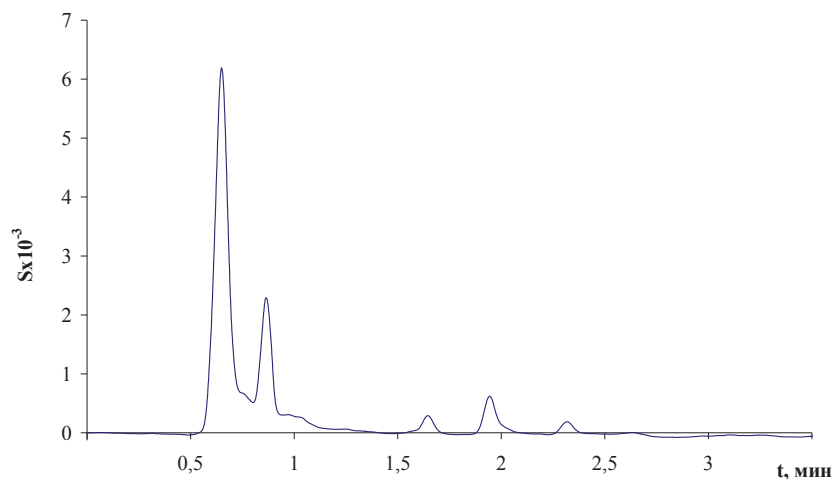


Рисунок 3 – Хроматограмма образца молока

По результатам мониторинга установлено, что применение бензоата натрия в качестве консерванта молока превалирует и колеблется от 4,91 до 42,68 мг/л в зависимости от сроков хранения продукта.

### Заключение

Таким образом, в ходе работы получены следующие результаты:

1. Установлено, что наиболее эффективное удерживание и разделение бензоата натрия и сорбата калия достигается с использованием колонки Zorbax Eclipse XDB-C18 с привитыми октадецильными группами, а также подвижная фаза ацетонитрил:буфер 20:80 и при pH фосфатного буферного раствора 4,66;

2. Максимум поглощения для бензоата натрия и сорбата калия составляет 235 нм и обе-

спечивает наибольшую чувствительность для их определения;

3. На основании полученных результатов разработана методика экспрессного прямого определения бензоата натрия и сорбата калия в образцах напитков и молока методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием.

4. Диапазон определяемых концентраций разработанной методики составил 0,5-100 мг/л при пределе обнаружения для бензоата натрия 0,07 мг/л и для сорбата калия 0,06 мг/л. Время анализа составило 3,5 мин.

5. Оптимизированная методика апробирована на образцах молока и напитков для проведения мониторинга на наличие консервантов. Мониторинг выявил наличие в образцах молока и напитков остаточного содержания бензоата натрия и сорбата калия, не превышающего их ПДК.



---

**Литература**

- 1 Codex Alimentarius Food Hygiene Basic Texts. Food and Agricultural Organization (FAO) of the United Nations – World Health Organization (WHO). Rome, 1997.
- 2 Сарафанова Л. А. Пищевые добавки: Энциклопедия, 2-е изд., испр. и доп. – СПб: ГИОРД, 2004. – 808 с.
- 3 ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств».
- 4 ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».
- 5 Piper P.W. Resistance of Yeasts to Weak Organic Acid Food Preservatives // Laskin A., Gadd G., Sariaslani S. Advances in applied microbiology. – Elsevier. – Vol.77. – 2011. – P. 97–113.

**References**

- 1 Codex Alimentarius Food Hygiene Basic Texts. Food and Agricultural Organization (FAO) of the United Nations – World Health Organization (WHO). Rome, 1997.
- 2 Sarafanova L. A. Food additives: encyclopedia [*Pishhevye dobavki: Jenciklopedija*], 2<sup>nd</sup> edition, – SP:GIOED, 2004. 808 p.
- 3 TR TS 029/2012 “Safety requirements of food additives, flavorings, and processing aids” [*Trebovanija bezopasnosti pishhevyh dobavok, aromatizatorov i tehnologicheskikh vspomogatel'nyh sredstv*].
- 4 TR TS 021/2011 “Food Safety” [*O bezopasnosti pishhevoj produkcii*].
- 5 Piper P.W. Resistance of Yeasts to Weak Organic Acid Food Preservatives // Laskin A., Gadd G., Sariaslani S. Advances in applied microbiology. Elsevier. Vol.77, 2011. P. 97–113.