

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. В. Н. Каразіна

Кафедра хімічної метрології

УДК 543.544

До захисту допускаю

_____ Завідувач кафедри
«___» ____ 2024 р. д.х.н., проф. О. І. Юрченко

**РОЗДІЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ РЯДУ СИНТЕТИЧНИХ ХАРЧОВИХ БАРВНИКІВ
МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

Кваліфікаційна робота магістра
II курсу хімічного факультету
групи ХМ-23

**БАКУМЕНКО ОЛЕКСАНДРИ
ВЛАДИСЛАВІВНИ**

Науковий керівник

к.х.н, доцент

Ольга КОНОВАЛОВА

ХАРКІВ 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота складається з 2 розділів, 60 сторінок, 20 рисунків, 41 таблиць, 6 формул та 67 використаних джерел літератури.

Об'єкти дослідження: синтетичні харчові барвники E 122 (Азорубін), E 124 (Понсо 4R), E 131 (Синій патентований V), E 133 (Діамантовий синій FCF).

Мета роботи: підбір оптимальних умов для розділення та визначення ряду синтетичних харчових барвників методом тонкошарової хроматографії з використанням рухомих фаз на основі поверхнево-активної речовини (цетилпіридиній хлориду).

Методи дослідження та апаратура: тонкошарова хроматографія, ультразвукова ванна Jeken (Codyson) PS-20; потенціометрія (рН-метр-іономер "Експерт-001" з комбінованим скляним електродом ЕСК-10603;), аналітичні ваги ВЛА-200 г. з допустимою похибкою не нижче 0,25 мг.

Результати та їх новизна: провели оптимізацію умов розділення синтетичних харчових барвників, отримали значення фактору затримування (R_f), ступеню розділення (R_s) та коефіцієнта селективності (α) для кожного барвника в залежності від складу рухомої фази. Дослідили, що при додаванні органічних модифікаторів, таких як пронанол-1 та пентанол-1 до рухомої фази, яка містить поверхнево-активну речовину, відбувається поліпшення ефективності розділення синтетичних харчових барвників. Результати дослідження метрологічних характеристик напівкількісного візуального аналізу демонструють придатність запропонованого методу для визначення синтетичних харчових барвників. Новизна даної роботи заключається в тому, що застосували нову методику тонкошарової хроматографії з «зеленими» рухомими фазами для розділення та напівкількісного визначення синтетичних харчових барвників. В якості нерухомої фази використовували пластини Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ-254, які є дуже дешевими.

Область застосування: дана методика розділення та визначення синтетичних харчових барвників може використовуватися для контролю якості харчових продуктів в матеріалознавчій криміналістичній криміналістиці, а також для дотримання законодавчих вимог щодо вмісту барвників.

Ключові слова: ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ, СИНТЕТИЧНІ ХАРЧОВІ БАРВНИКИ, ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНА РЕЧОВИНА, ОРГАНІЧНІ МОДИФІКАТОРИ, НАПІВКІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ, ІНТЕРВАЛ НЕНАДІЙНОСТІ, МЕЖА ВИЗНАЧЕННЯ

ABSTRACT

The qualification work consists of 2 chapters, 60 pages, 20 figures, 41 tables, 6 formulas and 67 used literature sources.

Research objects: synthetic food dyes E 122 (Azorubin), E 124 (Ponceau 4R), E 131 (Blue patent V), E 133 (Diamond blue FCF).

The purpose of the work: selection of optimal conditions for the separation and determination of a number of synthetic food dyes by the method of thin-layer chromatography using mobile phases based on a surface-active substance (cetylpyridinium chloride).

Research methods and equipment: thin-layer chromatography, ultrasonic bath Jeken (Codyson) PS-20; potentiometry (pH-meter-ionometer "Expert-001" with a combined glass electrode ESK-10603;), analytical scales VLA-200 g. with an acceptable error of not less than 0.25 mg.

Results: optimized the separation conditions of synthetic food dyes, obtained the values of the retention factor (R_f), degree of separation (R_s) and selectivity coefficient (α) for each dye depending on the composition of the mobile phase. It was found that adding organic modifiers such as pronanol-1 and pentanol-1 to the mobile phase, which contains a surfactant, improves the separation efficiency of synthetic food dyes. The results of the study of metrological characteristics of semi-quantitative visual analysis demonstrate the suitability of the proposed method for the determination of synthetic food dyes. The novelty of this work lies in the fact that a new technique of thin-layer chromatography with "green" mobile phases was used for the separation and semi-quantitative determination of synthetic food dyes. Sorbfil PTSH-P-A-UF-254 plates, which are very cheap, were used as the stationary phase.

Field of application: this method of separation and determination of synthetic food dyes can be used to control the quality of food products in material science and forensic forensics, as well as to comply with legal requirements regarding the content of dyes.

Keywords: THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY, SYNTHETIC FOOD DYES, SURFACTANT, ORGANIC MODIFIERS, SEMI-QUANTITATIVE ANALYSIS, UNCERTAINTY INTERVAL, DETERMINATION LIMIT

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	9
1.1 Синтетичні харчові барвники	9
1.1.1. Азобарвники	11
1.1.1.1 Динатрій 4-гідрокси-3- (4-сульфонато-1-нафтілазо-)1-нафталінсульфонат (E122).....	12
1.1.1.2 2-гідрокси -1-(4-сульфонато-1'-нафтілазо)-6,8-нафталендисульфонат натрію (E 124).....	13
1.1.2 Триарилметанові барвники	14
1.1.2.1 Кальцієва сіль [4, 4'-біс (N, N-діетиламіно) (5'' - гідрокси- 2'', 4''-дисульфонато)] трифенілкарбенію (E 131).....	15
1.1.2.2 Динатрієва сіль {4,4' - біс [N-(м-сульфонатобензил)- N-етиламіно] (2'' - сульфонато)} трифенілкарбенію (E 133).....	17
1.2 Методи аналізу харчових синтетичних барвників	19
1.2.1 Хроматографічні методи аналізу	19
1.2.2 Оптичні методи аналізу	23
1.2.3 Електрохімічні методи аналізу	23
1.3 Основні параметри ТШХ.....	24
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	26
2.1 Обладнання та реактиви	26
2.2 Методики приготування експериментальних розчинів	27
2.2.1 Методика приготування буферних розчинів	27
2.2.2 Методика приготування розчинів синтетичних харчових барвників	27
2.2.3 Методика приготування розчинів цетилпіридиній хлориду	28
2.2.4 Методика проведення ТШХ - розділення.....	28
2.3 Результати та їх обговорення	31
2.3.1 Оптимізація умов розділення синтетичних харчових барвників	31

2.3.1.1 Вплив концентрації цетилпіридиній хлориду та рН на розділення харчових синтетичних барвників	31
2.3.1.2 Оптимізація типу та вмісту органічного модифікатора	37
2.4 Метрологічні характеристики напівкількісного аналізу харчових барвників.....	41
2.4.1 Інтервал ненадійності	41
2.4.2 Межа визначення	44
ВИСНОВКИ.....	55
ДЖЕРЕЛА ЛІТЕРАТУРИ.....	56

ВСТУП

Естетично і соціально, колір завжди зачаровував людство. Протягом усієї історії барвники та пігменти були важливими предметами торгівлі. Колір на певному етапі бере участь у виробництві майже всіх комерційних продуктів, і сьогодні існує близько 9 000 різних барвників під більш ніж 50 000 торгових назв. Така кількість є результатом різноманітності бажаних відтінків і кольорів, хімічних властивостей матеріалу, що фарбується, та безпосереднього зв'язку кольору з молекулярною структурою барвника.

Барвники - це речовини, які використовуються для надання кольору продуктам та різноманітним матеріалам. Вони бувають природними та синтетичними.

До 1850-х років майже всі барвники були природного походження. Найпоширенішими були рослинні, такі як трави та лишайники, а деякі - з комах. Пофарбовані тканини, знайдені в єгипетських гробницях, переконливо свідчать про те, що методам фарбування понад 4 000 років. Стародавні ієрогліфи описують видобуток і застосування природних барвників. Було зроблено чимало спроб видобувати барвники з яскраво забарвлених рослин і квітів. Це пов'язано з тим, що більшість природних барвників нестабільні і існують у вигляді компонентів складних сумішей. Однак дослідження цих барвників у 1800-х роках стали основою для розробки синтетичних барвників, які домінували на ринку до 1900 року.

У 1856 році англійський хімік Вільям Паркін випадково відкрив перший комерційно успішний синтетичний барвник - ліловий. У 1857 році поява цього барвника спричинила зниження домінування натуральних барвників на світовому ринку. Хоча комерційне життя лілового було коротким (близько семи років), його успіх спричинив активну діяльність, яка швидко призвела до відкриття кращих барвників. [1]

Синтетичні харчові барвники зараз використовуються частіше, ніж натуральні барвники. На відміну від природних барвників, синтетичні надають продуктам яскравіший та насиченіший колір. Синтетичні барвники мають велике застосування в різних галузях, таких як текстильна, паперова, харчова, фармацевтична, шкіряна, косметична та інші.

Значний попит на популярність синтетичних барвників зумовлений їх перевагами: термостабільністю, низькою чутливістю до технологічних умов обробки та зберігання, стійкістю до світла та різних середовищ, низькою ціною порівняно з препаратами натурального барвника. Крім того, за останні десятиліття значно зросло використання синтетичних барвників не тільки в харчових продуктах, а й у фармацевтиці – на фармацевтичному ринку представлені різноманітні препарати, що містять барвники. [2]

При виробленні харчових продуктів все частіше використовують барвники, щоб надати продуктам яскравий вигляд, підвищити привабливість смакової якості продуктів і напоїв для споживачів, особливо для дітей.

Водночас у переліку хімічних речовин, дозволених до використання в нашій країні, є велика кількість тих, які можуть призвести до погіршення здоров'я і навіть викликати захворювання. Сьогодні інтерес світової спільноти до якості продуктів харчування та медикаментів зростає. Останні наукові дослідження [3] підкреслюють важливість проблеми синтетичних харчових барвників.

Виробники продуктів можуть додавати синтетичні барвники до харчових продуктів у недозволених кількостях, щоб підсилити колір або зберегти вигляд продукту, з метою підвищення його привабливості для покупців. Це може стати причиною отруєння або алергічних реакцій у споживачів, що може призвести до кримінальної відповідальності.

Існує велика потреба у розробці швидких і надійних методів або вдосконалення вже існуючих методів визначення синтетичних харчових барвників у складних сумішах зразків, що і є актуальністю даної роботи. Це необхідно для визначення гранично - допустимих меж концентрації барвників (ГДК) в продуктах харчування. [4]

Використання барвників Е 122, Е 124, Е 131 і Е 133 відіграє важливу роль у матеріалознавчій криміналістичній експертизі, наприклад, при аналізі різних зразків, таких як фарби, барвники, харчові продукти і косметичні засоби та інші. Барвники використовуються для визначення походження матеріалу. Якщо у зразку фарби виявлено барвники Е 122, Е 124, Е 131 і Е 133, експерти можуть визначити, чи відповідають ці барвники тим, що використовуються в конкретному виробничому процесі. Якщо зразки або докази, знайдені на місці злочину, містять певні барвники, можна ідентифікувати злочинця або джерело доказів. Наприклад, якщо на одязі підозрюваного виявлено певний барвник, експерти можуть порівняти його з барвником, який використовується на конкретному виробництві, щоб довести або спростувати зв'язок. [5]

В роботі проводили підбір оптимізаційних умов розділення та визначення ряду синтетичних харчових барвників: Е 122, Е 124, Е 131, Е 133 методом тонкошарової хроматографії з використанням «зелених» рухомих фаз, які містять поверхнево-активні речовини (ПАР), а саме цетилпіридиній хлорид. Водні розчини ПАР дотримуються принципів «зеленої хімії». Розчинники, що формують класичні рухомі фази в ТШХ є леткі, вогнебезпечні та найбільш токсичні. Їх утилізація після використання вимагає додаткових витрат і зусиль. Втім як водні розчини поверхнево-активних речовин не мають цих недоліків, піддаються біологічному розкладанню і вважаються більш прийнятними, як з екологічної, так і з економічної точки зору, порівняно з органічними розчинниками.

Для виконання даної роботи необхідно було вирішити такі задачі:

- Оптимізація умов хроматографічного розділення харчових барвників Е 122, Е 124, Е 131 та Е 133.
- Оцінка впливу органічних модифікаторів на ефективність розділення синтетичних харчових барвників.
- Визначення метрологічних характеристик напівкількісного візуального аналізу синтетичних харчових барвників.

1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Синтетичні харчові барвники

Терміном "синтетичні" позначають харчові барвники, які були отримані штучними методами та не існують у природі. Ці барвники мають вагомі технологічні переваги порівняно із більшістю природних аналогів. Вони забезпечують насичені кольори, які легко відтворюються та менше схильні до впливу різних методів обробки. Широкий спектр їх застосування пов'язаний із зручністю дозування та їхньою відносною доступністю. Суміші барвників дозволяють отримати відтінки та кольори, які складно досягти за допомогою окремих барвників.

Синтетичні барвники надзвичайно привабливі з промислової та художньої точок зору, оскільки вони мають здатність надавати стійкість кольору з більшою інтенсивністю, ніж натуральні органічні аналоги. Синтетичні барвники виникли як відповідь на потребу підсилення та стандартизації кольору харчових продуктів. Вони виявилися більш стійкими та ефективними у порівнянні з природними аналогами. Поступово розширюючи асортимент, харчова промисловість швидко прийняла синтетичні барвники, забезпечуючи більше можливостей для вибору кольорів та тривалості зберігання продуктів.

Споживання синтетичних барвників у концентраціях, що перевищують допустимі, може спричинити різні несприятливі ефекти на організм людини. Ці ефекти можуть проявлятися у вигляді алергічних реакцій [6] (наприклад, кропив'янки), посилення реакцій у дітей [7] тощо. Дорослі особи можуть відчувати коливання настрою, легку збудливість та розлади кишківника при споживанні синтетичних харчових барвників. Азобарвники, які використовуються в харчовій промисловості, можуть перетворюватися в організмі людини на потенційно небезпечні токсичні аміни та азоксисполуки, що призводить до захворювання печінки та нирок. [6, 8] Проводяться дослідження впливу харчових барвників групи азобарвників з білками альбуміном сироватки та гемоглобіном у людини. [9]

Дослідження синтетичних харчових барвників в матеріалознавчій криміналістичній експертизі може відбуватися в контексті різних ситуацій, таких як злочини, пов'язані з отруєнням, контрабандою або підробкою харчових продуктів.

Експерти можуть використовувати аналітичні методи, такі як хроматографія та мас-спектрометрія, для визначення складу харчових продуктів, що містять синтетичні барвники. Це може виявити наявність певних речовин, які вказують на підробку або злочинну діяльність. Хроматографічні методи, особливо тонкошарова хроматографія і газова хроматографія, широко використовуються в практиці хімічних досліджень. Походження ліків, барвників, паливно-мастильних матеріалів визначають методом газорідинної хроматографії за допомогою складного

обладнання. Кількісний аналіз ліків, барвників, наркотичних речовин та психотропних препаратів можна провести методом тонкошарової хроматографії.

Матеріалознавчі методи можна використовувати для аналізу слідів і зразків, вилучених з місць злочинів і продуктів. Мікроскопічний аналіз, наприклад, може виявити та ідентифікувати навіть маленькі частинки синтетичних барвників. [10]

Основним недоліком синтетичних барвників є їхня токсичність, яка різною мірою присутня як у самих пігментах, так і в хімічних реагентах, що входять до їхнього складу як домішки. Комерційні синтетичні барвники зазвичай на 80-85% чисті. [11]

Усі досліджені синтетичні барвники в обширному інтервалі рН знаходяться у формі аніонів, які у розчині перебувають у вигляді біполярних іонів або аніонів із зарядом 1 - 4 в залежності від значення рН (Табл. 1.1). [12, 13]

Таблиця 1.1 Величини pK_a функціональних груп синтетичних барвників [12, 13]

Барвник	pK_a		Форми іону
Е 122	pK_1	3.88	Протонування атома азоту азогрупи(H_2R^-)
	pK_2	8.33	Перехід з двохзарядного (HR^{2-}) в тризарядний аніон (R^{3-})
	pK_3	-	
Е 124	pK_1	12.16	Перехід з трьох- (HR^{3-}) у чотиризарядний аніон
	pK_2	-	
	pK_3	-	
Е 131	pK_1	3.11	Перехід з однозарядного катіону (H_3R^+) в біполярний іон ($H_2R^{\pm}$)
	pK_2	7.50	Перехід із біполярного іона ($H_2R^{\pm}$) в однозарядний аніон (HR^-)
	pK_3	9.15	Перехід з одно- (HR^-) в двозарядний аніон (R^{2-})
Е 133	pK_1	1.93	Перехід з однозарядного катіону (H_3R^+) в біполярний іон (H_2R)
	pK_2	7.58	Перехід із біполярного іона (H_2R) в однозарядний аніон (HR^-)
	pK_3	9.87	Перехід з одно- (HR^-) в двозарядний аніон (R^{2-})

Барвники мають високу розчинність у воді та гомогенність завдяки високому вмісту сульфокислотних груп відповідно. Також вони мають великі молекулярні маси та добру лінійну компланарність. (Табл. 1.2) [14]

Таблиця 1.2 Деякі фізико-хімічні властивості барвників [14]

Барвник	Молярна маса, г/моль	Розчинність у 100 г H ₂ O, 25 °C	T _{пл.} , °C
E 122	502.4310	12.0	> 300
E 124	604.4766	14.0	150
E 131	579.72	6.0	200
E 133	792.92	20.0	150

1.1.1. Азобарвники

На даний момент, більшість синтетичних барвників відноситься до азосполук. У молекулах таких барвників містяться одна або кілька азогруп ($-N = N-$). Азобарвники отримують шляхом реакції азосполучення, що включає похідні аніліну та фенольних або нафтольних сполук. Молекули азобарвників містять електронодонорні групи, які проявляють схильність до утворення комплексів з катіонами металів.

Наприклад, у складі тартразину (E 102) міститься "піридиновий" азот з високими нуклеофільними властивостями, здатний зв'язувати катіони металів. Протягом 50-х років тартразин використовувався як індикатор адсорбції в аналізі срібла через його схильність до утворення комплексів. Утворення хелатних комплексів з катіонами всіх d - металів (у тому числі і мікроелементів) часто пов'язане з водневими сполуками, які мають в молекулі поруч азогрупу і фенольний гідроксил.

Азобарвники в умовах тривалого та інтенсивного сонячного випромінювання або під впливом нагрівання, можуть втрачати своє забарвлення через руйнування хромофорної системи у присутності відновників та окислювачів. [14]

Слід зазначити, що комплексоутворення найефективніше відбувається в лужному або слабкокислому середовищі, оскільки електронодонорність молекули ліганду є найвищою. В умовах високої кислотності розчину катіони водню блокують атоми з високою електронною густиною і перешкоджають утворенню комплексів металів. [15]

В лужних розчинах рН в азобарвників дисоціюють фенольні групи, в слабкокислих - карбоксильні групи, а в сильнокислих значеннях протонуються азогрупи.

Наприклад, при протолізі функціональних груп молекула барвника E 122 може існувати в трьох іонних формах (Рис. 1.1). [16, 17]

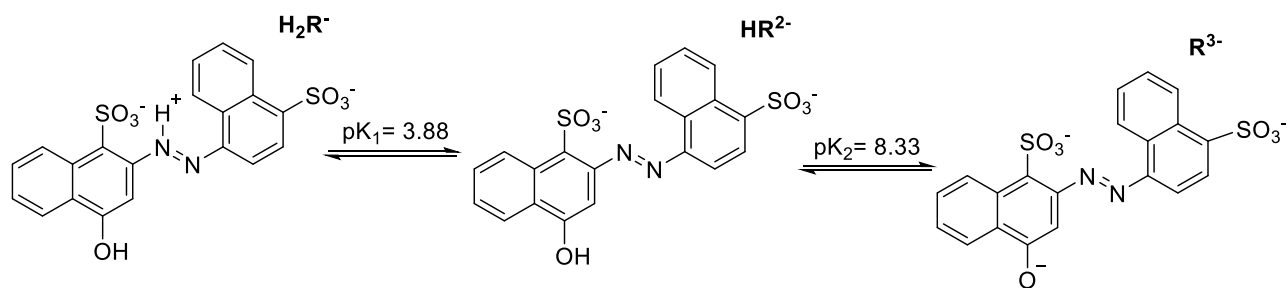


Рисунок 1.1 Схема протолізу барвника Е 122

Сульфогрупи протонуються тільки у сильноокислих розчинах де $\text{pH} < 1$, тому за звичайних умов ці групи вже дисоційовані.

Найбільш поширені в харчовій промисловості азобарвники: Тартразин (Е 102), Жовтий «Захід сонця» (Е 110), Азорубін (Е 122), Понсо 4R (Е 124). Дослідження в нашій роботі було проведено для Е 122 та Е 124.

1.1.1.1 Динатрій 4-гідрокси-3- (4-сульфонато-1-нафтілазо-)1-нафталінсульфонат (Е122)

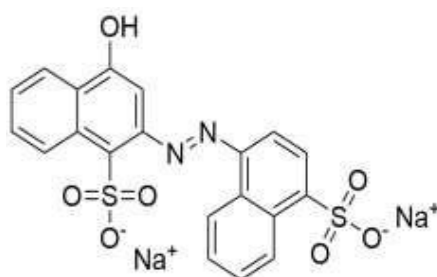


Рисунок 1.2 Структурна форма барвника азорубін (Е 122)

Азорубін (кармуазин) – барвник, що належить до нафталінових азобарвників. Через свою брутто формулу $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$, в промисловості цей барвник має назви азорубін і кармуазин (Рис.1.2).

Його виробляють у процесі дистиляції кам'яновугільної смоли й у живій природі він не зустрічається. Натуральним аналогом, отриманим із натуральної сировини, є барвник кошеніль. На зовнішній вигляд барвник Е 122 – це порошок або гранули, що мають яскраво-червоне або темно-бордове забарвлення.

Він не має смаку, запаху, добре розчиняється у воді (120 г/л при кімнатній температурі), стійкий до світло- та термообробки, що робить його популярним серед виробників. [14, 11] Для харчового синтетичного барвника Е 122 при $\text{pH} > 5,5$ відбувається дисоціація з подальшим утворенням іона R^{3-} . При $\text{pH} < 5,5$ відбувається протонуванням азогрупи та зміною просторового розташування

сполучених бензольних кілець, що призводить до збільшення електронної густини. [18] Барвник азорубін може існувати в трьох іонних формах у рівновазі (Табл. 1.1). [12, 13, 19]

Його основні властивості полягають у тому, що барвник підсилює природний колір продукту або відновлює кольори, втрачені внаслідок нагрівання чи інших процесів; Е 122 також може забарвлювати харчові продукти у відтінки від рожевого до фіолетового, а в поєднанні з іншими барвниками дає помаранчеві, коричневі або фіолетові відтінки. [11]

Азорубін (кармуазин) в основному знаходить своє застосування у харчовій промисловості, а саме в кондитерській галузі. [15, 20]

Барвники додають до джемів, сиропів, йогуртів, марципанів, мармеладу, фруктових соків, напоїв і соусів для покращення зовнішнього вигляду харчових продуктів. Е122 також міститься в продуктах, які природним чином змішуються з іншими пігментами (зеленим, фіолетовим, коричневим) для отримання іншого кольору. Харчовий барвник також міститься в парфумерних продуктах, таких як туалетна вода, парфуми та мило. Пігмент також використовується в декоративній косметиці, такій як помада і рум'яна, а також у тінях для повік і фарбі для волосся. Його присутність у косметиці може викликати контактну алергію. [14]

Деякі правозахисні організації вирішили виключили барвник Е 122 з продуктів харчування через його потенційну небезпеку для здоров'я. Пацієнти з астмою піддаються ризику задухи, спричиненої прийомом препаратів, в складі якого присутній барвник азорубін (кармуазин). [6] Також цей барвник може викликати дефіцит уваги особливо у дітей [21] крім того, цей барвник вважається небезпечним для людей, які страждають алергією на аспірин та інші протизапальні препарати. Обмеження в 4 мг на 1 кг ваги людини встановлено Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) та іншими дослідницькими організаціями як максимально допустима добова доза барвників. [5, 22]

1.1.1.2 2-гідрокси -1-(4-сульфонато-1'-нафтилазо)-6,8-нафталендисульфонат натрію (Е 124)

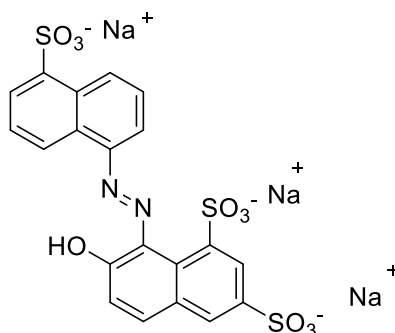


Рисунок 1.3 Структурна формула Понсо 4R

Хімічна назва: 2-гідрокси-1-(4-сульфонато-1'-нафтилазо)-6,8-нафталендисульфонат натрію. Його хімічна формула $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$, в промисловості Понсо 4R (Е 124) (Рис.1.3).

Барвник Понсо 4R – це червоний порошок або гранули, добре розчинний у воді (140 г/л при кімнатній температурі (Табл. 1.2)), помірно розчинний в етанолі і нерозчинний в рослинних оліях. Хороша світло-, тепло- (150°C) і кислотостійкість, помірно лугостійкий (з часом набуває коричневого кольору). Втрати при сушінні (з солями хлориду і сульфату натрію) не перевищують 20.0% (135°C, до постійної маси). [14]

Для азобарвника Е 124 в лужному середовищі депротонування з гідроксильної групи призводить до зміщення смуги поглинання в бік коротших довжин хвиль.

Отже, в результаті протолізу функціональних груп молекула барвника Е 124 може існувати у двох іонних формах (Рис. 1.4, Табл. 1.1). [19]

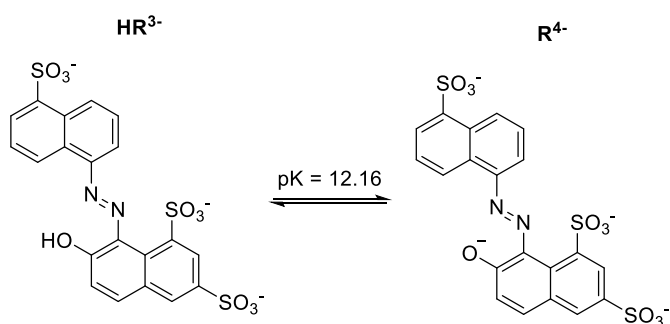


Рисунок 1.4 Схема протолізу барвника Е 124

Понсо 4R (добавка Е 124) широко використовується (самостійно або в поєднанні з іншими барвниками) у виробництві харчових барвників, кондитерських виробів, напоїв, морозива, пудингів, десертів і фруктових консервів. Добавка Е 124 використовується у виробництві рибних та м'ясних продуктів, молочних десертів, тортів та сирних виробів. [20] Цей барвник може викликати гіперактивність та неухважність у дітей, а також відомий як причина раку, нейротоксичності та репродуктивної токсичності. [21]

Барвник Е 124 входить до дозволених для використання у формі лаків. Також дозволені Е 100 - куркумін, Е 102 - тартазин, Е 104 - хіноліновий жовтий, Е 110 - жовтий "сонячний захід", Е 120 - кармін, Е 122 - азорубін, Е 123 - амарант, Е 124 - понсо 4R, Е 127 - еритрозин, Е 129 - спеціальний червоний АС, Е 131 - патентований синій V, Е 132 - індигокармін, Е 133 - діамантовий синій FCF, та інші барвники відповідно. [23]

1.1.2 Триарилметанові барвники

Синтетичні барвники, головним чином похідні трифенілметану, відзначаються різноманітністю кольорів, таких як червоний, фіолетовий, синій і зелений. Залежно від хімічної

структури, їх можна розділити на амінотриарил-метанові (наприклад, кристалічний фіолетовий) та окситриарилметанові (наприклад, фенолфталеїн) барвники. [11]

У катіонах молекул барвників першого типу можуть бути дві аміногрупи ($-NH_2$), між якими симетрично розподілена електронна густина. Молекули барвників другого типу будуються так само, як і першого типу, за винятком того, що в них оксигрупи ($-O-$) приєднуються до арильних кілець, утворюючи забарвлений аніон. Вони надають яскраві і чисті забарвлення, але мають невелику стійкість до впливу світла. [24]

Барвники цієї групи майже завжди розчиняються у спирті, воді та багатьох інших органічних розчинниках. При взаємодії з водою вони гідролізуються, і водний розчин набуває кислої реакції. [5] При $pH < 7$ рівновага зміщується або до забарвленої дисоційованої форми, при $pH > 7$ до безбарвної недисоційованої форми. [19]

Отримують такі барвники шляхом конденсації альдегідів, кетонів, ангідрид або хлорангідридів з ароматичними амінами або фенолами (нафтолами). Трифенілметанові барвники широко використовуються як індикатори металевого хрому та фотометричні реагенти. [14, 19] Із популярних барвників даної групи можна згадати синій патентований V (E 131) та синій блискучий FCF (E 133). Саме ці 2 харчових барвники досліджуються в даній роботі.

Триарилметанові (арилкарбонові) барвники менш стійкі, ніж азосполуки. У воді (особливо лужному середовищі) триарилметанові барвники перетворюються на безбарвні карбінольні сполуки (Рис. 1.5) [14, 19]

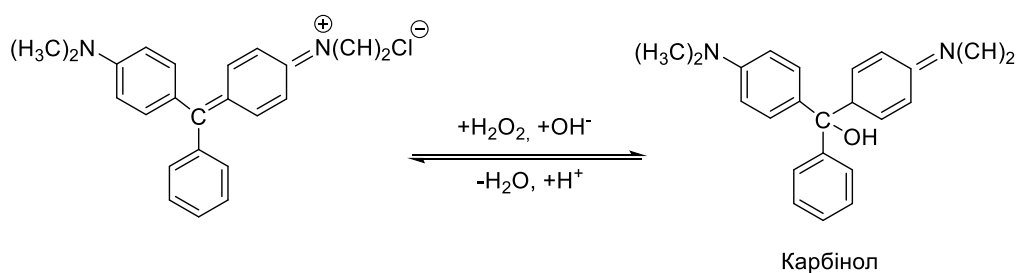


Рисунок 1.5 Перехід триарилметанових барвників у безбарвні карбінольні основи.

1.1.2.1 Кальцієва сіль [4, 4'-біс (N, N-діетиламіно) (5"- гідрокси- 2", 4"-дисульфонато)] трифенілкарбенію (E 131)

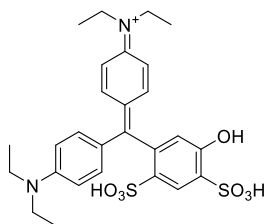


Рисунок 1.6 Структурна формула синього патентованого V

Хімічна назва: кальцієва сіль [4, 4'-біс (N, N-діетиламіно) (5''- гідрокси- 2'', 4''-дисульфонато)] трифенілкарбенію, або N-[4- [[4-(діетиламіно) феніл]-2-(2, 4-дисульфофеніл)метилен]-2,5-циклогексациєн-1-іліден]- N – етиленамонійна сіль кальцію, в промисловості - Синій патентований V (E 131) (Рис.1.6).

Зауважимо, що барвник синій патентований V існує також у вигляді натрієвої солі $-C_{27}H_{31}N_2NaO_7S_2$.

Це порошок або гранули червоно-синього кольору, які легко розчиняються у воді - 60 г/л при кімнатній температурі (Табл. 1.2) і утворюють блакитне забарвлення. Барвник помірно розчиняється в етанолі і не розчиняється в рослинних оліях. Термостійкість йому властива до 140°C, а світлостійкість - помірна. Стійкість барвника до кислот незадовільна (змінює колір на зелений), але до лугів вона хороша, хоча з часом може з'явитися червонястий відтінок. Втрати при висушуванні (разом з хлоридом і сульфатом, у перерахунку на натрієву сіль) не перевищують 15,0% (при температурі 135°C до досягнення постійної маси). [14]

В роботі [19] досліджувався спектрофотометричний аналіз водних розчинів E131 в діапазоні рН 6.5 – 13, який показав зміщення смуги поглинання в бік коротших хвиль. Зникнення цієї смуги поглинання можна пояснити перерозподілом електронної густини при відриві протона від гідроксильної групи, метапозиційної до центрального атома вуглецю. З іншого боку, при рН < 7 смуга поглинання зміщується в бік більших довжин хвиль через протонування сульфогрупи та збільшення електронної густини. В результаті протолізу функціональних груп молекула барвника E 131 може існувати у чотирьох іонних формах (Рис. 1.7).

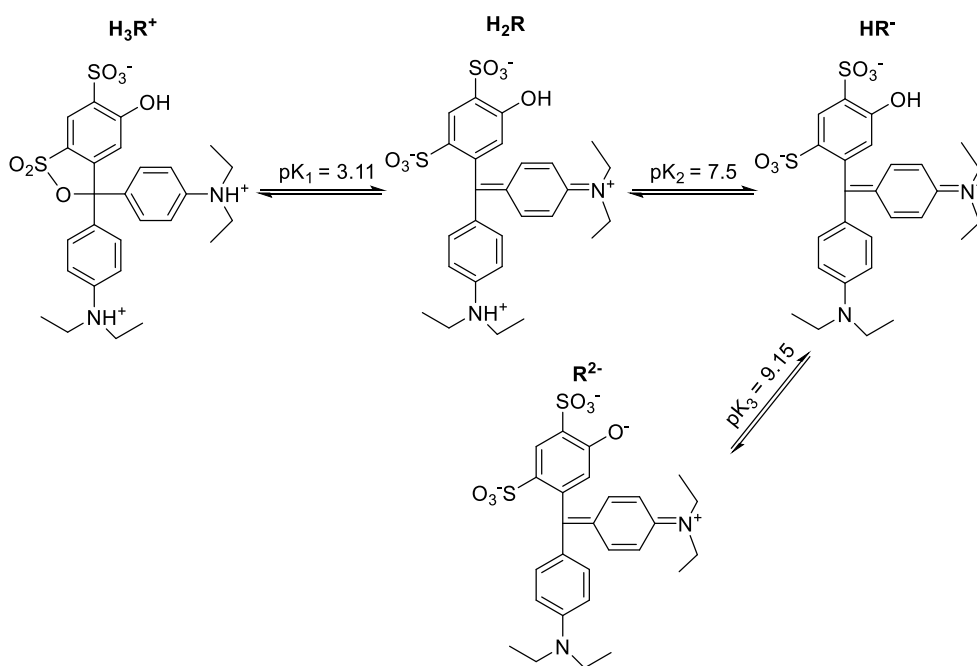


Рисунок 1.7 Схема протолізу барвника E 131

Е 131 заборонений у деяких країнах, таких як Норвегія, США та Австралія. Проте в Україні його використання дозволено. Цей барвник додають до різноманітних продуктів, включаючи кондитерські вироби (вироби зі смаком молока, в тому числі фруктове морозиво та морозиво), м'ясні продукти (фарш, ковбаси), харчові суміші, супи, глазуровані фрукти та овочі, консерви, сухі снеки з картоплі, борошняні вироби, їстівні покриття для декоративних цілей, спеції, соуси, харчові добавки, замінники рослинного білка для м'яса та риби, неїстівні покриття для ковбас, барвники для великодніх яєць. [15]

У медицині використовується в діагностичних цілях. У Європі використовується у фармацевтичній та косметичній промисловості, особливо у виробництві фармацевтичних капсул, шампунів, піни для ванн, зубної пасти та інших засобів по догляду за обличчям і тілом, для надання продуктам необхідного колірного тону. Е 131 також використовується для фарбування текстилю та вовняної пряжі.

1.1.2.2 Динатрієва сіль {4,4' - біс [N-(м-сульфонатобензил)- N-етиламіно] (2'' -сульфонато)} трифенілкарбенію (Е 133)

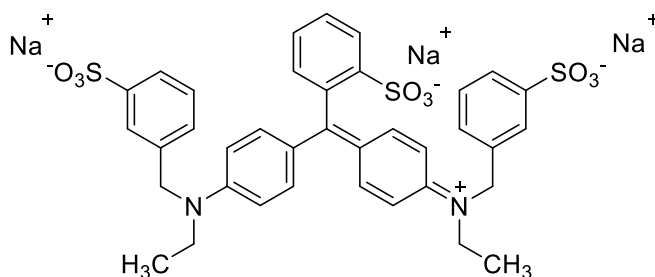


Рисунок 1.8 Структурна формула діамантового синього

Хімічна назва: динатрієва сіль {4,4' - біс [N-(м-сульфонатобензил)- N-етиламіно] (2'' -сульфонато)} трифенілкарбенію. В промисловості: Діамантовий синій FCF (Е 133) (Рис.1.8).

Блискучий синій FCF представляє собою синтетичний барвник, що отриманий шляхом конденсації 2-формілбензолсульфонової кислоти та відповідного аніліну.

У процесі виробництва барвник діамантовий синій FCF зазвичай змішують з іншими барвниками для отримання кольору, необхідного для фарбування певних матеріалів, наприклад, зеленого, фіолетового, коричневого або чорного.

Це фіолетовий порошок чи гранули, які легко розчиняються у воді (200 г/л при кімнатній температурі). Водні розчини мають блакитний відтінок. Кислотостійкість барвника Е 133 вища, ніж у барвника Е 131. Треба взяти до уваги, що в кислому середовищі може відбуватися зміна відтінку від синього до зеленого.

Барвник Е 133 помірно розчиняється в етанолі та не має розчинності в рослинних оліях. Синтетичний барвник проявляє високу термостійкість (150°C). Стійкість до світла значно перевищує деякі інші барвники, такі як індиго або кармін. Діамантовий синій стійкий до дії лугів. Втрати при висушуванні (разом із хлоридом і сульфатом у перерахунку на натрієву сіль) не перевищують 15% (135°C , до досягнення постійної маси). [14, 17]

Усі іонні форми барвника Е 133 мають смугу поглинання за довжини хвилі 640 нм. Збільшення інтенсивності поглинання спостерігається під час переходу від диполярного іона ($\text{pH} > 2$) до аніону називається гіперхромним ефектом. Це ефекти, що пов'язані з порушенням просторової симетрії молекул та перерозподілом електронної щільності всередині хіноїдного кільця. При $\text{pH} > 7$ спостерігається зменшення інтенсивності поглинання. Це пов'язано з дисоціацією сульфогрупи і відновленням просторової симетрії молекули. [19] В результаті протолізу функціональних груп молекула барвника Е 133 може існувати у чотирьох іонних формах (Рис. 1.9).

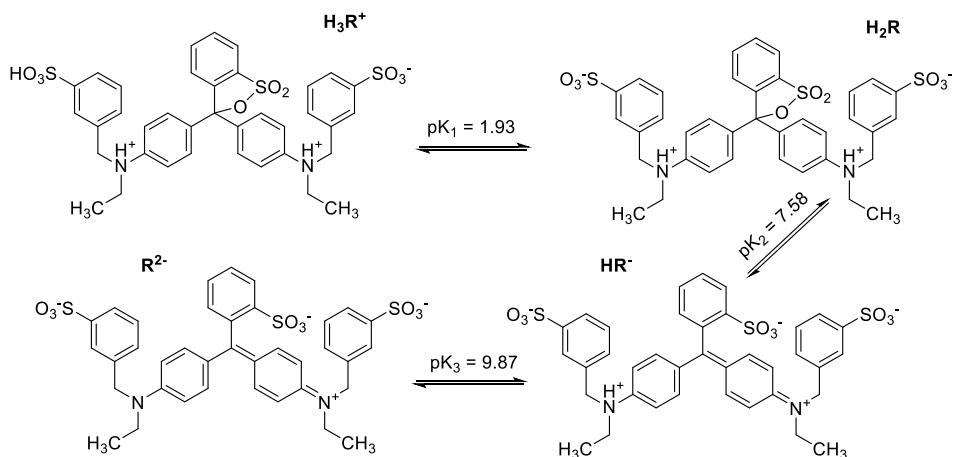


Рисунок 1.9 Схема протолізу барвника Е 133

Барвник Е 133 - це синтетична харчова добавка синього (з червоним відтінком), яка використовується як в харчовій промисловості, так і в інших галузях народного господарства.

Список продуктів, в яких була помічена біологічно-активна добавка Е 133, включає: різні види десертів, морозиво, плодоовочеві консерви, безалкогольні напої, солодощі, сухий сніданок. [20]

Е 133 використовується в харчовій промисловості, а також у фармацевтиці, декоративній та гігієнічній косметичці, миючих засобах і в текстильній промисловості для додання необхідного кольору виробам з вовни та шовку.

Наразі барвник Е 133 дозволений у багатьох країнах світу, в тому числі в ЄС та Україні. Однак це не означає, що ця харчова добавка не є шкідливою для організму людини.

На сьогоднішній день достовірно відомо, що Е 133 може бути шкідливим для астматиків та осіб з підвищеною чутливістю до аспірину (ацетилсаліцилової кислоти) (барвник також може викликати напади ядухи). [25, 22]

1.2 Методи аналізу харчових синтетичних барвників

У сучасних науково-дослідних лабораторіях набувають популярності використання методу високоефективної рідинної хроматографії для кількісного аналізу синтетичних барвників у харчових продуктах. Однак, через потребу висококваліфікованого оператора та складного і дорогого обладнання, цей метод являється доступним не для кожної лабораторії. Методом тонкошарової хроматографії також можна визначати наявність барвників в харчових продуктах.

Іншим методом аналізу харчових барвників в продуктах харчування є спектрофотометрія. Цей метод використовується як самостійно так і, в поєднанні з іншими методами. Проте основна складність цього методу полягає в неможливому аналізі складних сумішей барвників. Більш детальніше розглянуто ці методи нижче.

1.2.1 Хроматографічні методи аналізу

Хроматографія охоплює різноманітну і важливу групу методів, які дозволяють розділяти, ідентифікувати та визначати близькоспоріднені компоненти складних сумішей. У всіх хроматографічних розділеннях зразок розчиняється в рухомій фазі, яка може бути газом, рідиною або надкритичною рідиною. Рухома фаза переміщується відносно нерухомої фази, яка закріплюється на місці в колонці або на твердій поверхні. Дві фази вибираються таким чином, щоб компоненти зразка різною мірою розподілялися між рухомою та нерухомою фазами. Ті компоненти, які міцно утримуються нерухомою фазою, рухаються лише повільно з потоком рухомої фази. Навпаки, компоненти, які слабко утримуються нерухомою фазою, швидко рухаються. Як наслідок цих відмінностей у рівнях міграції, компоненти зразка поділяються на окремі смуги або зони, які можна аналізувати якісно та кількісно.

Розглянемо детальніше методи тонкошарової хроматографії (ТШХ) і високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

В роботі [26] проводили розділення та визначення 13 синтетичних харчових барвників (Е 102, Е 104, Е 110, Е 122, Е 123, Е 124, Е 127, Е 128, Е 129, Е 131, Е 132, Е 133, Е 142) методом ВЕРХ з діодно-матричним детектором. Використовували нерухому фазу С18, а рухома фаза містила суміш ацетонітрil-метанол (20:80) і 1% буферний розчин ацетату амонію при рН 7,5. Діодно-матричний детектор використовувався для моніторингу барвників між 350 і 800 нм. Межі виявлення для всіх речовин варіювалися від 1,59 (Е 142) до 22,1 (Е 124) мкг/л⁻¹.

Застосування комбінації ВЕРХ і мас-спектроскопії дозволило ідентифікувати вісім сульфатованих азобарвників, що мають значні відмінності у структурі та містять різні іон-парні реагенти у водно-метанольних рухливих фазах. [27, 28]

Автори роботи [29] пропонували новий, чутливий і надійний метод ВЕРХ в обернено-фазовому варіанті в поєднанні з діодно-матричним детектором для одночасного визначення 5 барвників E 102, E 110, E 129, E 133 та E 127 у зразках косметики. Найкращу ефективність розділення було отримано на аналітичній колонці RP C18 Zorbax (США). Аналіз проводився в градієнтних умовах, які були оптимізовані. Визначення барвників проводили при 420, 480, 510, 634 і 530 нм відповідно.

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) є варіацією рідинної хроматографії, де елюент переміщується через шар сорбенту завдяки капілярним силам. ТШХ включає два основних типи - адсорбційну, яка є більш поширеною, та розподільну. Залежно від полярності рухомої фази (РФ) та нерухомої фази (НФ), ТШХ поділяється на нормально-фазову та обернено-фазову. [30]

Існує три основні методи тонкошарової хроматографії: висхідний, низхідний і горизонтальний, залежно від напрямку руху розчинника, нанесеного на тонку пластинку. У висхідному методі розчинник рухається вгору під дією капілярних сил. У низхідному методі розчинник стікає вниз з верхньої частини пластини під дією сили тяжіння. Горизонтальний метод ТШХ заснований на безперервному подаванні на пластину розчинника. Після проходження через весь шар сорбенту розчинник залишає пластинку і витікає або випаровується.

ТШХ відводиться особливе місце серед всіх інших хроматографічних методів. Причинами цього є простота методу, доступність обладнання, широкий спектр застосування, швидкість експерименту, висока ефективність, висока селективність і висока чутливість. Тонкошарова хроматографія унікальна тим, що це єдиний метод, яким можна проводити повний аналіз невідомих сумішей. Також він дозволяє перевірити, чи не залишився у вихідній точці будь-який нерозчинений компонент. [31]

ТШХ є найдоступнішим методом майже для всіх типів речовин. Тонкошарову хроматографію можна поєднувати з такими інструментальними методами, як спектрофотометрія, полярографія, радіоактивація і кінетичні методи, що значно розширює її можливості як аналітичного і дослідницького методу. Крім того, поєднання ТШХ і рідинної хроматографії може бути дуже корисним.

Тонкошарова хроматографія використовує ті ж самі сорбенти та елюенти, що й рідинна хроматографія. Найчастіше використовують силікагель, оксид алюмінію і поліамідні смоли. Силікагель є найбільш універсальним сорбентом і може використовуватися для розділення більшості речовин.

На поверхні силікагелю можна ідентифікувати кілька різних типів реакційноздатних груп, які відрізняються за структурою (Рис.1.10). Це групи силандіольні, силанольні і силоксанові. Із усіх груп на поверхні силікагелю найбільш хімічно активними є силанольні групи – ізольовані групи Si – OH (а); подвійні групи OH (або гемінальні) пов'язана з атомом кремнію (б); сусідні групи (або віцинальні групи), які є групами OH, розташованими близько одна до одної, які з'єднані з різними атомами кремнію та зв'язані одна з одною водневими зв'язками (в). [32]

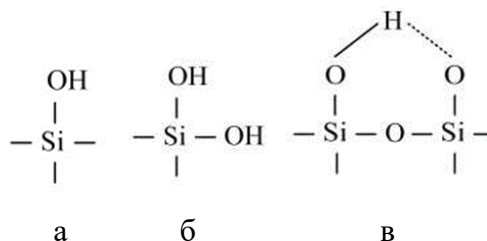


Рисунок 1.10 Види силанольних груп на поверхні кремнезема: а) ізольовані групи, б) подвійні або гемінальні, в) віцинальні групи (сусідні).

Оксид алюмінію з його сильними адсорбційними властивостями часто використовується для розділення неполярних речовин. Поліамідні смоли можна використовувати для розділення речовин з гідроксильними групами, приєднаними до ароматичного кільця, наприклад, фенолів. В якості рухомих фаз можуть використовуватися різні розчинники і суміші розчинників, органічні та неорганічні кислоти.

Розчинник обирають в залежності від властивостей аналізованої речовини і природи сорбенту. Зазвичай це етиловий спирт (також інші спирти), етилацетат, вода, ацетон, діетиловий ефір, бензол та багато інших розчинників. Також часто використовуються суміші різних розчинників. Якщо розглядати в якості рухомої фази розчини з додаванням поверхнево-активної речовини (ПАР), то відбувається модифікація поверхні нерухомої фази (пластинки). При взаємодії РФ з розчинами ПАР відбувається:

- Якщо концентрація поверхнево-активних речовин у рухомій фазі не досягає критичної концентрації міцелоутворення (ККМ) то у цьому випадку міцели в рухомій фазі не утворюються.
- Якщо концентрація поверхнево-активних речовин на рівні ККМ на поверхні силікагелю виникають складніші агрегати частинок такі як адміцелли, геміміцелли, біслої, обернені геміміцелли. [33]
- Якщо концентрація ПАР в рухомій фазі перевищує ККМ використовуваної ПАР, то у такій рухомій фазі знаходяться міцели ПАР та солюбілізований у них органічний розчинник. [4]

В роботі [34] авторами вивчено можливість застосування тонкошарової хроматографії та спектрофотометрії для визначення 2 синтетичних харчових барвників Е 102 та Е 122 в сиропі

«Грипаут бейбі». Використовуючи пластинки Sorbil (ТУ26 - 11 - 17 - 89) розміром 10 x 15 із сумішшю розчинників пропанол : етилацетат : вода: (концентрований) водний розчин аміаку (20:6:5:1). Межа виявлення для тартразину становить $5 \cdot 10^{-7}$ г/мл, для кармуазину - $3,75 \cdot 10^{-7}$ г/мл.

Авторами роботи [35] була розроблена методика тонкошарової хроматографії з оберненою фазою (RP-TLC) для однозначного визначення 10 найбільш часто використовуваних синтетичних харчових барвників Е 102, Е 104, Е 110, Е 122, Е 123, Е 124, Е 129, Е 131, Е 132, Е 133. Використовувалася горизонтальна техніка проявлення з використанням окстадецил – модифікованого кремнезему як нерухомої фази та $0.5 \text{ моль} \cdot \text{дм}^{-3}$ сульфату амонію в 30% розчині етанол – вода як рухома фаза. Аналіз ВЕРХ проводили з використанням колонки XDB-C18 і градієнтом суміші водного розчину ацетату амонію ($0,1 \text{ моль} \cdot \text{дм}^{-3}$, pH = 6,5) і MeOH/ACN (1:1 за об'ємом). Задовільні значення меж виявлення та кількісного визначення були встановлені для обох методів, хоча й дещо вищі у випадку ТШХ.

В роботі [36] автори розділили й денситометрично визначили синтетичні харчові барвники Е 102, Е 124, Е 133, Е 110 та Е 122 методом тонкошарової хроматографії на силікагелі 60 з рухомою фазою складу: хлороформом-ізопропанол - водневий розчин аміаку 25% (1:3:1). Межа визначення була менше ніж, 1 мг/л.

Найпопулярнішим методом визначення харчових барвників є тонкошарова хроматографія з водно-органічними рухомими фазами, які зазвичай мають сильний запах і канцерогенні. Заміна цих фаз на міцелярні або циклодекстринові рухомі фази дозволяє усунути ці недоліки. В роботі [37] автори для визначення харчових барвників використовували рухомі фази на основі β-циклодекстрину. Хроматографію проводили на полярних пластинах Sorbfil та низькополярних поліамідних сорбентах. В якості рухомих фаз досліджували водно-метанольні розчини β-циклодекстрину в діапазоні концентрацій 0,01 - 0,2 М. Оптимальна область концентрацій β-циклодекстрину, рекомендована для практичного використання, знаходиться в діапазоні 0,07 - 0,13 моль/л.

Отже, ТШХ посідає особливе місце серед інших хроматографічних методів. Причинами цього є простота методики, доступність обладнання, широке застосування, висока швидкість проведення експерименту, висока ефективність та достатньо висока селективність і чутливість. [38]

Для розділення та визначення синтетичних харчових барвників також використовують методи капілярного електрофорезу: капілярний зонний електрофорез [39] і міцелярну електрокінетичну хроматографію. [40]

1.2.2 Оптичні методи аналізу

Одним із найпростіших методів визначення харчових синтетичних барвників являється спектрофотометрія. Вона ґрунтується на визначенні вмісту барвників за власним світлопоглинанням.

Автори роботи [41] велику увагу приділили спектрофотометричним аналітичним методам, таких як похідна спектрофотометрія, метод стандартного додавання Н-точок (HPSAM), метод екстракції точки помутніння (CPE) для аналізу водорозчинних (прямих барвників) і нерозчинних у воді харчових барвників.

При визначенні одного барвника в харчових продуктах застосовують твердофазну екстракцію, яку можна використовувати як для безпосереднього визначення на сорбенті методом твердофазної спектроскопії [42, 43], так і після проведення реекстракції. [44, 45]

При визначенні декількох барвників в харчових продуктах (наприклад, в продуктах що містять два барвники) найчастіше використовують перші похідні спектрів поглинання екстрактів або реекстрактів за методикою нульового перетину (zero-crossing). [46, 47, 48]

В продуктах, що містять три і більше барвників застосовують перші та другі похідні. В роботі [49] розділення потрібних сумішей харчових барвників Е 102, Е 131, Е 132 було здійснено двома похідними методами з використанням «першої похідної» та «похідної співвідношення спектрально-нульового переходу», які були задовільно використані для визначення синтетичних сумішей цих барвників у різних співвідношеннях і в трьох комерційних продуктах.

В роботі [50] для спектрофотометричного багатокомпонентного аналізу порошків безалкогольних напоїв і синтетичних сумішей, що містять Е 110, Е 102, Е 129 без будь-якого хімічного розділення розроблено методи дубльованого відношення спектрів похідних (графічний метод), класичний метод найменших квадратів та регресія головних компонентів (два числових методи).

Спектрофотометричні методи можуть бути використані для визначення барвників в продуктах харчування з простою матрицею: напоях з низьким вмістом цукру, порошках для десертів на основі желатину з ароматизаторами, матриця яких не розчиняється у холодній воді. [51]

У дослідженні [52] автори об'єднали хемометричний підхід з кінетико-спектроскопічними даними, що дозволило одночасно визначити два барвники Е 102 і Е 120 у складних матрицях, таких як гірчиця, сухі розчинні супи, варення.

1.2.3 Електрохімічні методи аналізу

Аналітичні методи, включаючи вольтамперометрію дуже швидко розвиваються за останні роки завдяки прогресу в матеріалах робочих електродів і модифікаторів поверхні.

Вольтамперометричний метод відповідає вимогам надійності, чутливості, принципам екологічної хімії (в цьому методі не використовуються органічні розчинники) та вибіркості, також характеризується низькими межами виявлення та швидкою реакцією. [53] Наприклад, автори роботи [54] розглядали метод вольтамперометричного визначення синтетичного барвника Е 102, особливу увагу зосередили на матеріалах робочих електродів та модифікаторах поверхні електродів.

Поряд з вольтамперометричним методом іноді зустрічається потенціометричний метод визначення барвників. [55]

В роботі [56] було оцінено новий покритий графітовий електрод (ГЕ) для визначення хінолінового жовтого (ХЖ), штучного барвника в їжі, на основі використання іон-парного комплексу тетрафенілфосфонієм-ХЖ як електроактивної речовини. Електрод виявив лінійну відповідь електромоторної сили (ЕМС)-рХЖ в широких концентраційних діапазонах ($1.0 \cdot 10^{-1} \sim 5.0 \cdot 10^{-5}$ М) з нахилом -30.1 ± 0.2 мВ десятик $^{-1}$ та межею виявлення $4.0 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Електрод виявився стабільним, відтворюваним та мав швидку відповідь (< 5 с). Він може бути використаний в широкому діапазоні рН (4.7 – 10.7) та був успішно застосований для визначення хінолінового жовтого в штучних сумішах та комерційних безалкогольних напоях. Результати, отримані за допомогою цього електрода, були в хорошій узгодженості зі значеннями, отриманими за допомогою вимірювань на ВЖЖ, як офіційним методом.

1.3 Основні параметри ТШХ

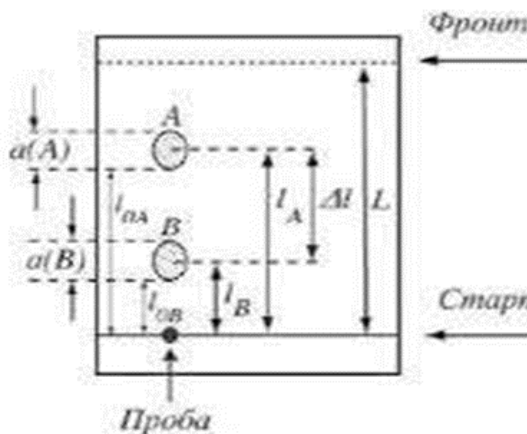


Рисунок 1.11 ТШХ- хроматограма для розрахунку

У тонкошаровій хроматографії коефіцієнт утримування (R_f) є важливим параметром, який використовується для оцінки розподілу речовин між нерухоною і рухоною фазами. Цей параметр визначається відношенням відстані, пройденої рухоною фазою, до відстані, пройденої компонентом речовини під час хроматографічного процесу. [57]

$$R_f = \frac{l_i}{L} \quad (1.1)$$

де, l_i - відстань, яку пройшла речовина у міліметрах;

L - це відстань, пройдена фронтом РФ в міліметрах. [30]

Значення цього параметру R_f змінюються в діапазоні від 0 (речовина, яка досліджується міцно адсорбується на поверхні НФ і не переміщується з фронтом РФ) до 1 (речовина не адсорбується на НФ і переміщується з фронтом РФ).

Також для розрахунку використовують параметр R_s , який разом з параметром R_f вказує на ступінь розділення або розчинності двох речовин, розрахований на основі відстані між центрами двох сусідніх хроматографічних плям (Δl) і їх довжини - a (А) і b (В). Значення параметра варіюється: при $R_s < 1$ розділення неповне, а при $R_s > 1$ розділення речовин відбувається повністю.

$$R_s = \frac{2\Delta l}{a(A) + a(B)} \quad (1.2)$$

де, Δl - відстані між центрами двох сусідніх хроматографічних плям для двох речовин a (А) і b (В) – довжини речовин.

Поділ двох речовин також можна охарактеризувати за допомогою коефіцієнта селективності розділення (α). Коефіцієнт селективності розділення показує, у скільки разів сильніше адсорбент (наприклад, нерухома фаза) утримує одну речовину, ніж іншу. $\alpha > 1$ вказує на те, що перший компонент має більший вплив на нерухомих фазу, ніж другий компонент. Використання систем з коефіцієнтом селективності в ТШХ дозволяє краще прогнозувати та описати розділення компонентів в зразку, що важливо для точного аналізу. [38]

Коефіцієнт селективності розділення розраховується за наступним рівнянням

$$\alpha = \frac{\frac{1}{R_{f_1}} - 1}{\frac{1}{R_{f_2}} - 1} = \frac{R_{f_2}(1 - R_{f_1})}{R_{f_1}(1 - R_{f_2})} \quad (1.3)$$

де, R_{f_1} - це відстань, пройдена першим компонентом,

R_{f_2} - відстань, пройдена другим компонентом.

Всі ці параметри допомагають визначити ефективність хроматографічної системи і є важливими для оптимізації умов розділення та аналізу речовин на хроматограмі.

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Обладнання та реактиви

Обладнання:

- Пластини для тонкошарової хроматографії Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ-254;
- Мікрошприц “Агат” М-10, на 10 мкл;
- Мірний посуд II класу точності: мірні колби на 10 мл, 25 мл, 50 мл, 250 мл, 1000 мл;
- Мірний посуд II класу точності: градуйовані піпетки на 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл;
- Пінцет металевий;
- Хроматографічні камери зі скляними кришками;
- Пробірки Флоринського для зберігання розчинів;
- Шпатель лабораторний скляний, шпатель лабораторний металевий;
- Бюкси лабораторні скляні;
- Ультразвукова ванна Jeken (Codyson) PS-20;
- Фарфорова ступка з товкачиком;
- Лабораторні аналітичні ваги ВЛА-200 г. з допустимою похибкою не нижче 0.25 мг;
- рН-метр-іономер “Експерт-001” з комбінованим скляним електродом ЕСК-10603;

Реактиви:

- Барвники: Кармуазин (Е 122), Понсо 4R (Е 129), Синій патентований V (Е 131), Е 133 Діамантовий синій FCF (Е 133) ЛЕВ-Україна, Україна та Тауна експорт, Індія. Вміст основної речовини не менше 85%;
- Цетилпіридинію хлорид моногідрат $C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$, масова частка основної речовини 96 %, Merck, Німеччина;
- Етанол C_2H_5OH (об’ємна частка основної речовини не менше 95,1% та не більше 96,9%)
Компоненти буферних розчинів:
- Натрію тетраборат: $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ (бура) кваліфікація «ч.д.а», Алхім, Україна;
- Хлоридна кислота HCl (с = 3 моль/л);
- Кислота амінооцтова: $C_2H_5NO_2$ (гліцин), кваліфікація «хч»;
- Калій дигідроортофосфат: KH_2PO_4 , кваліфікація «хч»;
- Натрій гідроортофосфат дигідрат: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, кваліфікація «хч»;
- пропанол - 1, кваліфікація «ч.д.а»;
- пентанол - 1, кваліфікація «ч.д.а»;

2.2 Методики приготування експериментальних розчинів

2.2.1 Методика приготування буферних розчинів

Для проведення тонкошарової хроматографії потрібні буферні розчини з різними значеннями рН. Ми приготували буфери з приблизними значеннями рН 2, 6 і 9. Всі буфери готували за методикою, описаною в роботі. [58]

Кислий буферний розчин. Для приготування кислого буферного розчину використовували гліцин: 1.43 г гліцину переносили в мірну колбу на 250 мл і розчиняли в невеликій кількості дистильованої води. До отриманого розчину додавали 2 мл розчину HCl з концентрацією 3 моль/л. Розчин розбавляли дистильованою водою і ретельно перемішували. Після настоювання розчину вимірювали рН за допомогою рН-метра зі скляним електродом, попередньо відкаліброваним. Отримували розчин з рН 2.70.

Слабокислий буферний розчин. Наважки 0.36 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ та 2.00 г KH_2PO_4 розчиняли їх в невеликій кількості води в колбі ємністю 250 мл. Розчин доводили до мітки дистильованою водою та ретельно перемішували. Отримали буферний розчин зі значенням рН 5.80.

Лужний буферний розчин. Для приготування лужного розчину використовували $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$: 16.40 г натрій тетраборату декагідрату розчиняли в невеликій кількості води в мірній колбі ємністю 1 л. До утвореного розчину додавали 4.8 мл соляної кислоти концентрацією 3 моль/л та доводили до мітки дистильованою водою, ретельно перемішуючи. Отримали розчин зі значенням рН 9.2.

2.2.2 Методика приготування розчинів синтетичних харчових барвників

Основними умовами для якісного розділення ТШХ є добра розчинність зразка в розчиннику і летючість розчинника при нанесенні зразка на хроматографічну пластинку. Тому в якості розчинника було обрано 96% етанол.

Приготування вихідних розчинів. Наважки синтетичного харчового барвника (Табл. 2.1) пересипали в колби ємністю 10 мл через суху скляну воронку. Промивали зважувальні бюкси та скляні воронки (які використовували для перенесення наважки в колбу) 96% розчином етанолу. Етанолом колби заповнювали не до кінця. Для того, щоб осад розчинився, колби поміщали на ультразвукову баню. У розчинах, де барвники розчинилися вміст колб доводили до мітки етанолом. Проте деякі барвники, а саме Е 122 та Е 124 мали погану розчинність в 96% розчині етанолу. Вирішенням даної проблеми є те, що об'єм розчину довели до 10 мл та перемішували, а потім додали ще 5 мл води і також перемішували. Після цього осади барвників розчинилися.

Вихідні розчини барвників перенесли в пробірки Флоринського для зберігання.

Таблиця 2.1 Наважки барвників та концентрації утворених розчинів

Барвник	Е 122	Е 124	Е 131	Е 133
Наважка, мг	6.40	7.45	8.85	7.40
Концентрація розчину в 96% EtOH, ммоль/л	-	-	1.00	0.93
Концентрація розчину в 64% EtOH, ммоль/л	0.85	1.00	-	-

2.2.3 Методика приготування розчинів цетилпіридиній хлориду

Для проведення тонкошарової хроматографії обрали концентрації ЦПХ у рухомій фазі: у точках до ККМ - 10^{-5} моль/л, поблизу точки ККМ - 10^{-3} моль/л та після точки ККМ - 10^{-2} моль/л. ККМ цетилпіридиній хлориду становить 10^{-3} моль/л [59]

Приготування вихідних розчинів ЦПХ. Наважку масою 3.58 г цетилпіридиній хлориду моногідрату поміщали в колбу ємністю на 100 мл та додали невелику кількість води. Для розчинення осаду, використовували ультразвукову баню. Після розчинення кристалів ЦПХ необхідно дочекатися зупинки утворення піни, щоб чітко бачили межу поділу повітря-розчин. Потім доводили розчин до мітки дистильованою водою, додаючи її обережно по стінках. Отримали вихідний розчин ЦПХ з концентрацією 0.1 моль/л.

Для приготування розчину ЦПХ з концентрацією 0.01 моль/л відбирали аліквоту 5 мл розчину ЦПХ з концентрацією 0.1 моль/л та поміщали в колбі ємністю 50 мл. Доводили до мітки дистильованою водою.

Для приготування розчину ЦПХ з концентрацією 0.001 моль/л відбирали аліквоту 5 мл розчину ЦПХ з концентрацією 0.01 моль/л та поміщали в колбі ємністю на 50 мл. Доводили до мітки дистильованою водою.

2.2.4 Методика проведення ТШХ - розділення

Розділення харчових барвників в рухомій фазі без додавання розчину ЦПХ

Для проведення одного досліду на пластинці розмірами 10 см x 5 см в хроматографічній камері необхідно 5 мл рухомої фази. На хроматографічній пластинці Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ-254 відмітили лінію старту на відстані 1 см від нижнього краю пластинки. Розміщали точки на відстані 1 см від краю пластинки та один від одного, в які потім наносили розчини барвників за допомогою мікрошприца “Агат” М-10, на 10 мкл. Мікрошприц промивали декілька разів дистильованою водою та розчинами барвників між нанесеннями. У точки наносили 0.5 мкл розчинів барвників та

просушували потоком повітря, використовуючи гумову грушу. Після нанесення барвників мікрошприц промивали водою та 96% розчином етанолу.

Пластинки одразу занурювали в хроматографічні камери, в які попередньо вже були налиті рухомі фази: буферні розчини без додавання розчинів ЦПХ. Хроматографічні камери накривали кришками та чекали доки фронт рухомої фази не пройде відстань нижче на 1 см від краю пластинки. Пластинки виймали та одразу окреслювали лінію фронту і залишали їх просушуватися при кімнатній температурі. Після просушування наводили границі хроматографічних плям та обчислювали параметри ТШХ розділення. [57]

Розділення харчових барвників в рухомій фазі з додаванням розчину ЦПХ

Для проведення хроматографічного розділення необхідно приготувати рухомі фази на основі ЦПХ. В мірну колбу ємністю на 5 мл внесли аліквоту 0.5 мл розчину ЦПХ з відповідною концентрацією на порядок вище, ніж у РФ. Довели до мітки буферним розчином з відповідним значенням рН.

Для проведення одного досліду на пластинці розмірами 10 см х 5 см в маленькій хроматографічній камері необхідно 5 мл рухомої фази. На хроматографічній пластинці Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ-254 відмітили лінію старту на відстані 1 см від нижнього краю пластинки. Нанесення зразка є, мабуть, найважливішим аспектом тонкошарової хроматографії, особливо для кількісних вимірювань. Розмітили точки на відстані 1 см від краю пластинки та один від одного, в які потім наносили розчини барвників за допомогою мікрошприца “Агат” М-10, на 10 мкл. Мікрошприц промивали декілька разів дистильованою водою та розчинами барвників між нанесеннями. У точки наносили 0.5 мкл розчинів барвників та просушували потоком повітря, використовуючи гумову грушу. Після нанесення барвників мікрошприц промивали водою та 96% розчином етанолу. Для кращої ефективності розділення пляма повинна мати діаметр - близько 5 мм для якісної роботи і менше для кількісного аналізу. Для розбавлених розчинів використовуються три або чотири повторювані нанесення, з сушінням між ними. [57]

Пластинки одразу занурювали в хроматографічні камери, в які попередньо вже були налиті рухомі фази. Насичувати хроматографічну камеру РФ не треба, так як компоненти РФ на основі ПАР є нелеткі. Хроматографічні камери накривали кришками та чекали доки фронт рухомої фази не пройде відстань нижче на 1 см від краю пластинки. Пластинки виймали та одразу окреслювали лінію фронту і залишали їх просушуватися при кімнатній температурі. Після просушування наводили границі хроматографічних плям та обчислювали параметри ТШХ розділення.

Під час хроматографії нанесені плями змиваються, в той час як менші плями, нанесені на базову лінію, збільшуються як в ширину, так і в довжину. Існує дві можливі причини цього явища: кінетичний і термодинамічний фактори.

Аналіт піддається молекулярній дифузії, вихровій дифузії і масопереносу, що призводить до розмивання хроматографічної плями. Кінетичний фактор розмиття - це явище дифузії, яке спостерігається при нерівномірному розподілі речовини (затримка масопереносу). Молекули намагаються рівномірно заповнити відведений їм простір і рухаються від ділянок з високою концентрацією до ділянок з набагато меншою концентрацією. Термодинамічні фактори: адсорбція аналітів на сорбентах може нелінійно залежати від концентрації аналіту в рухомій фазі. Якщо ізотерма адсорбції лінійна, пляма на хроматограмі буде круглої форми; якщо ізотерма сорбції нелінійна, пляма буде асиметричною. [57]

Методи ідентифікації. Метод тонкошарової хроматографії можна використовувати як для якісного, так і для кількісного аналізу сполук.

Якісний аналіз в ТШХ. Через відмінності в значеннях R_F в залежності від розміру зразка, тонкошарової пластини і умов проявлення, дані однієї хроматограми часто не дають достатньої інформації для ідентифікації різних хімічних видів, присутніх в суміші. Крім того, завжди існує ймовірність того, що дві абсолютно різні розчинені речовини мають ідентичні або майже ідентичні властивості.

Метод ідентифікації. Іноді попередню ідентифікацію можна провести, додавши в контейнер розчин очищеної речовини, яка, ймовірно, міститься в невідомій речовині; збіг значень R_F свідчить про ідентичність аналіту та речовини – свідка. В інших випадках ідентичність розділених хімічних речовин може бути підтверджена за допомогою зіскрібка і солюбілізації. У цьому випадку частину, що містить аналізовану речовину, зіскрібають з пластини лезом бритви або шпателем, а вміст збирають на глянцевого папір. Після перенесення у відповідний контейнер аналіт розчиняють у відповідному розчиннику і відокремлюють від нерухомої фази центрифугуванням або фільтруванням. Потім аналізовані види ідентифікують за допомогою спектроскопічних методів, таких як флуоресценція, УФ-видиме поглинання, ядерний магнітний резонанс і ІЧ-спектроскопія. Тонкошарову хроматографію також комбінують в режимі онлайн з низкою спектроскопічних методів виявлення; поєднання ТШХ і мас-спектрометрії є активною сферою досліджень. [57]

Найнадійнішим методом якісної ідентифікації речовин є метод свідків, в якому окремі речовини, що відповідають речовинам, які, як очікується, присутні в суміші, поміщають на базову лінію поруч зі зразком. Збіг між компонентами зразка і "свідка" R_F є основою для ідентифікації речовини.

Кількісний аналіз в ТШХ. За допомогою денситомету, вимірюють поглинання речовини в точці і кількісно визначати аналізовану речовину в зразку. Також можна видалити сорбент, що містить аналіт, з пластини, десорбувати його і виміряти кількість речовини іншими способами. [38] За еталонними розчинами речовини – свідка проводиться кількісний аналіз.

Також існує метод визначення кількості речовини, що міститься в плямі, використовуючи міліметровий папір. За його допомогою вимірюють площу плями і якщо вміст речовини (в цій плямі) міститься в інтервалі 1-80 мкг то графік залежності площі плями від маси речовини набуває лінійного вигляду.

Візуалізація ТШХ - розділення. Для візуалізації результатів ТШХ - розділення можна використовувати спеціальні реагенти (кольорові індикатори), розпилення, пропарювання або занурення пластини в реагент призводить до появи кольорових плям. Рекомендується використовувати певний кольоровий проявник для перевірки наявності конкретних домішок.

Для хроматографічного контролю чистоти використовують неспецифічні розчини, що проявляють, такі як пари йоду, 1% спиртовий розчин хлориду заліза (III) з наступним нагріванням. [57]

2.3 Результати та їх обговорення

2.3.1 Оптимізація умов розділення синтетичних харчових барвників

У роботі ми дослідили розділення 4 харчових барвників Е 122, Е 124, Е 131 та Е 133. Для оптимізації умов хроматографічного розділення використовували ТШХ платівки з силікагелем у якості нерухомої фази.

2.3.1.1 Вплив концентрації цетилпіридиній хлориду та рН на розділення харчових синтетичних барвників

Як ми вже згадували раніше, на поверхні силікагелю знаходяться силанольні групи, які здатні протонуватися (поверхня силікагелю набуває позитивного заряду) або депротонуватися (поверхня набуває негативного заряду). Показник константи кислотності (pK_a) для протонованих силанольних груп становить приблизно 2, pK_a дисоціації силанольних груп приблизно дорівнює 8.5 та 4.5 для ізольованих, віцінаних та гемінальних відповідно. [60]

Тобто при значеннях рН нижче 2,0 поверхня силікагелю заряджена позитивно за рахунок протонування силанольних груп ($-\text{Si}-\text{OH}^{2+}$), а при більш високих значеннях рН $> 4,0$ виникає негативно заряджена поверхня за рахунок часткової дисоціації силанольних груп ($-\text{Si}-\text{O}^-$). [61]

Барвники, досліджувані нами, здебільшого представлені у формі аніонів на великому діапазоні рН. Проте заряди цих аніонів можуть змінюватися в залежності від pK_a барвників (Табл.1.1).

При різних значеннях концентрації поверхнево-активних речовин можуть утворюватися міцели, агрегати або взагалі не будуть утворюватися агрегати. Якщо концентрація ПАР набагато нижче точки ККМ то не будуть утворюватися агрегати за рахунок адсорбції молекул ПАР на

поверхні адсорбенту. При концентраціях ПАР трохи вище або на рівні ККМ на поверхні силікагелю утворюються біслої або геміміцели. При високих концентраціях ПАР вище за точку ККМ утворюються міцели.

Дослідження залежності форми та ступеню розділення хроматографічних плям барвників від концентрації ЦПХ та рН є важливою частиною даної роботи.

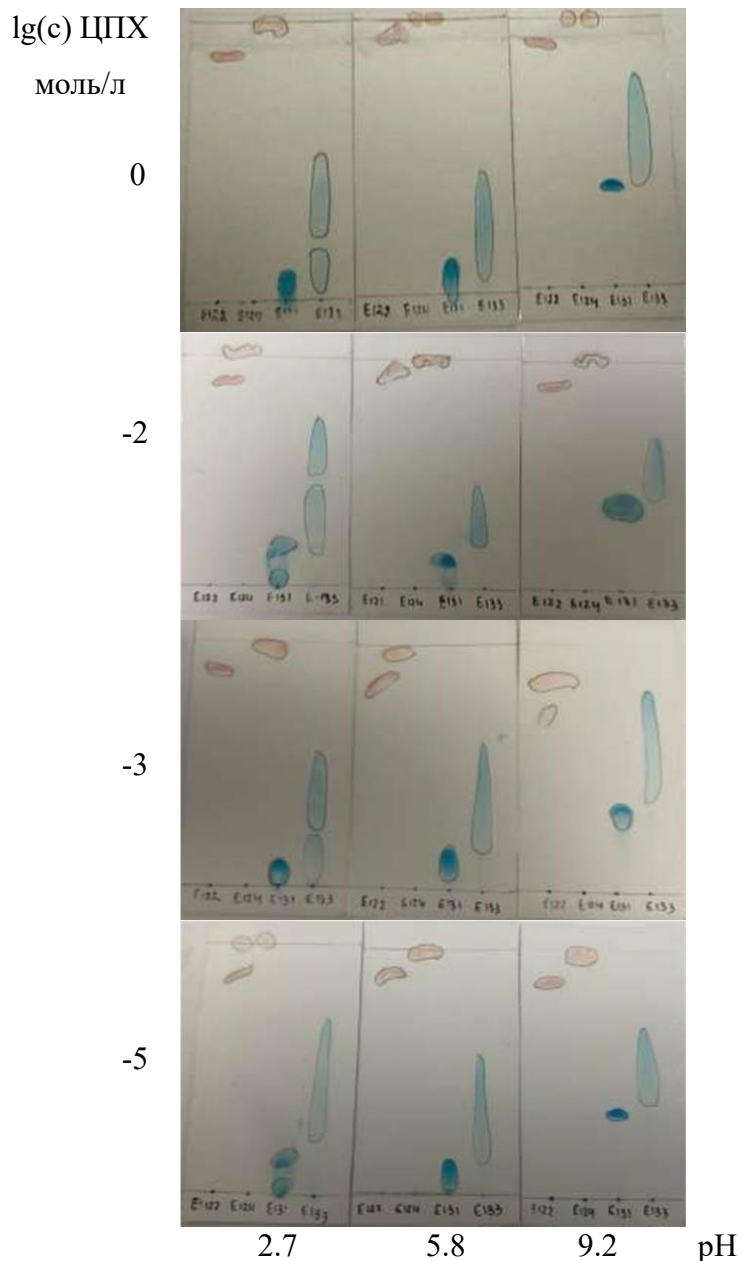


Рисунок 2.1 Результати хроматографічного розділення барвників в залежності від рН та концентрації ЦПХ

В таблиці 2.2 наведені значення фактору затримування барвників E 122, E 124, E 131, E 133 в залежності від значень рН та концентрації ЦПХ. Позначки * та ** застували для позначення двох різних форм барвників.

За рисунком 2.1 можемо зробити висновок, що дані барвники були розділені при правильно підібраних умовах. В більшості випадків барвники E 124, E 131 та E 133 давали роздвоєні або дуже розтягнуті плями. Це можна пояснити тим, що використовували дуже великі концентрації для барвників, в наслідок чого ізотерма сорбції набуває не лінійного виду (відіграє роль термодинамічний фактор розмивання); дві плями одного і того самого барвника можуть виникати внаслідок співіснування двох форм барвників при вказаних рН.

Таблиця 2.2 Розраховані значення фактору затримування (R_f) для досліджуваних барвників

с (ЦПХ), моль/л	рН 2.7	рН 5.8	рН 9.2
0	E ₍₁₂₂₎ 0.84 E ₍₁₂₄₎ 1.01 E ₍₁₃₁₎ 0.04 E _{(133)*} 0.09 E _{(133)**} 0.21	E ₍₁₂₂₎ 0.98 E _{(124)*} 1.01 E _{(124)**} 1.006 E ₍₁₃₁₎ 0.08 E ₍₁₃₃₎ 0.20	E ₍₁₂₂₎ 0.91 E _{(124)*} 0.99 E _{(124)**} 0.98 E ₍₁₃₁₎ 0.37 E ₍₁₃₃₎ 0.58
10 ⁻²	E ₍₁₂₂₎ 0.89 E ₍₁₂₄₎ 1.02 E _{(131)*} 0.04 E _{(131)**} 0.17 E _{(133)*} 0.29 E _{(133)**} 0.60	E ₍₁₂₂₎ 0.89 E ₍₁₂₄₎ 1.00 E ₍₁₃₁₎ 0.12 E ₍₁₃₃₎ 0.26	E ₍₁₂₂₎ 0.90 E ₍₁₂₄₎ 1.01 E ₍₁₃₁₎ 0.36 E ₍₁₃₃₎ 0.54
10 ⁻³	E ₍₁₂₂₎ 0.90 E ₍₁₂₄₎ 0.98 E ₍₁₃₁₎ 0.06 E _{(133)*} 0.13 E _{(133)**} 0.40	E ₍₁₂₂₎ 0.86 E ₍₁₂₄₎ 0.97 E ₍₁₃₁₎ 0.11 E ₍₁₃₃₎ 0.39	E ₍₁₂₂₎ 0.71 E ₍₁₂₄₎ 0.86 E ₍₁₃₁₎ 0.31 E ₍₁₃₃₎ 0.60
10 ⁻⁵	E ₍₁₂₂₎ 0.88 E _{(124)*} 1.00 E _{(124)**} 1.02 E _{(131)*} 0.04 E _{(131)**} 0.14 E ₍₁₃₃₎ 0.44	E ₍₁₂₂₎ 0.89 E ₍₁₂₄₎ 1.00 E ₍₁₃₁₎ 0.08 E ₍₁₃₃₎ 0.36	E ₍₁₂₂₎ 0.86 E ₍₁₂₄₎ 0.98 E ₍₁₃₁₎ 0.32 E ₍₁₃₃₎ 0.53

Таблиця 2.3 Значення роздільної здатності (R_s) та коефіцієнта селективності (α) для барвників

с (ПАР) моль/л	pH 2.7	pH 5.8	pH 9.2
0	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 2.50 R_s (E ₁₃₁ і E _{133**}) 1.58 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 0 α (E ₁₃₁ і E _{133**}) 6.21	R_s (E ₁₂₂ і E _{124*}) 1.10 R_s (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 0.63 α (E ₁₂₂ і E _{124*}) 0 α (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 2.78	R_s (E ₁₂₂ і E _{124*}) 1.10 R_s (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 0.95 α (E ₁₂₂ і E _{124**}) 8.73 α (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 2.34
10 ⁻²	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 3.33 R_s (E _{131**} і E _{133**}) 2.61 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 0 α (E _{131**} та E _{133**}) 7.39	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 1.10 R_s (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 1.11 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 0 α (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 2.64	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 2.0 R_s (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 0.87 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 0 α (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 2.04
10 ⁻³	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 1.78 R_s (E ₁₃₁ і E _{133**}) 1.58 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 4.33 α (E ₁₃₁ і E _{133*}) 10	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 1.67 R_s (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 1.11 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 5.19 α (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 5.32	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 2.18 R_s (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 1.00 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 2.29 α (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 3.3
10 ⁻⁵	R_s (E ₁₂₂ і E _{124*}) 3.33 R_s (E _{131**} і E ₁₃₃) 1.06 α (E _{131**} і E ₁₃₃) 2.61 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 0	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 1.56 R_s (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 0.93 α (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 7.01 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 0	R_s (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 1.6 R_s (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 1.03 α (E ₁₂₂ і E ₁₂₄) 8.37 α (E ₁₃₁ і E ₁₃₃) 2.34

Згідно отриманих даних (Табл.2.2 та 2.3) бачимо, що задовільне розділення барвників найкраще досягається при концентраціях ЦПХ в рухомій фазі 10⁻³ та 10⁻⁵ моль/л та при значеннях pH 5.8 та 9.2. Для подальшої роботи ми обрали такі оптимальні умови розділення барвників, а саме pH 9.2 з концентрацією ЦПХ в РФ 10⁻⁵ моль/л. Тому що, саме при таких умовах спостерігається симетричність розмивання в зоні компонента, повний поділ барвників, оптимальні значення фактору затримання, менша витрата реактивів для подальших досліджень.

Для кращого розділення барвників E 131 та E 133 зменшимо їх концентрацію в 2 рази і знову проведемо ТШХ- розділення.

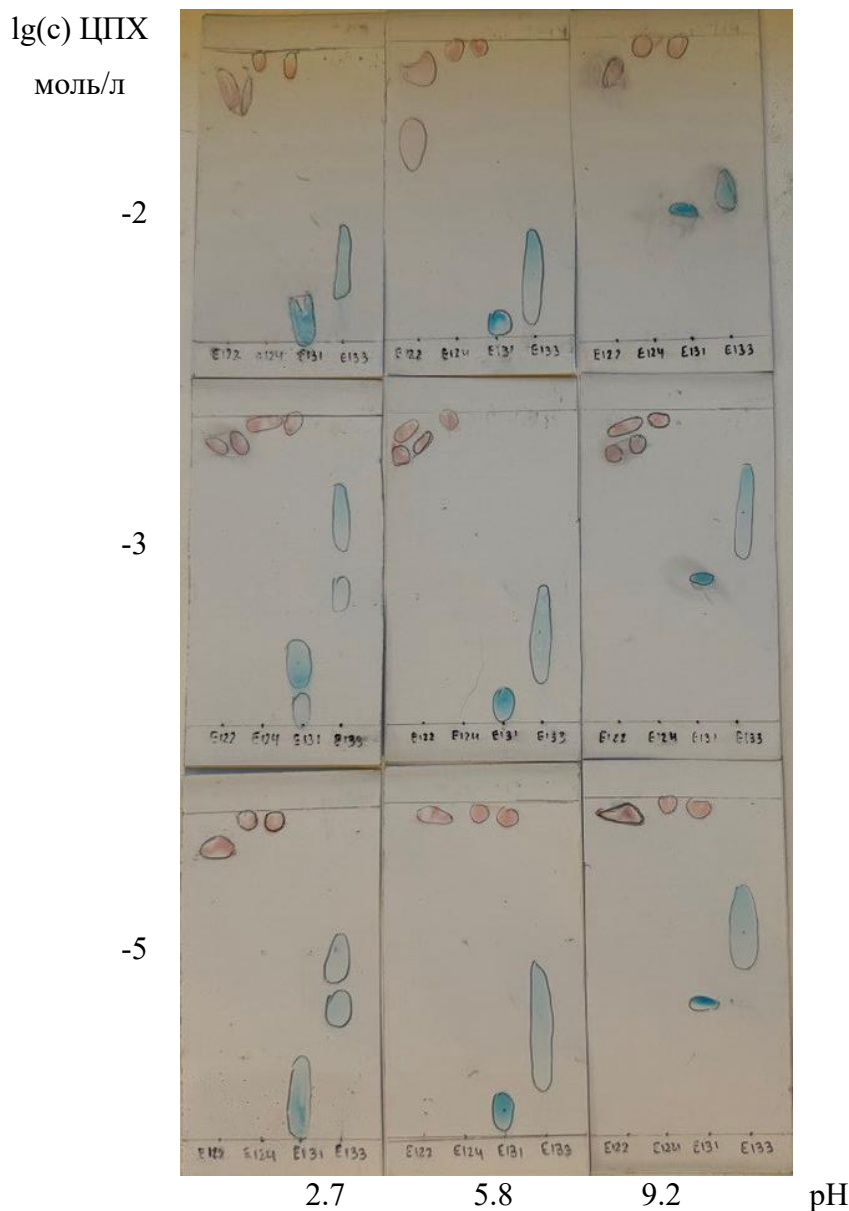


Рисунок 2.2 Результати хроматографічного розділення барвників (зі зменшеними концентраціями E 131 та E 133) в залежності від pH та концентрації ЦПХ

Таблиця 2.4 Розраховані значення фактору затримування (R_f) для досліджуваних барвників

с (ЦПХ), моль/л	pH 2.7	pH 5.8	pH 9.2
10^{-2}	E ₍₁₂₂₎ 0.88	E ₍₁₂₂₎ 0.66	E ₍₁₂₂₎ 0.91
	E _{(122)*} 0.80	E _{(122)*} 0.92	E _{(124)*} 0.95
	E _{(124)*} 0.91	E _{(124)*} 0.99	E _{(124)**} 0.95
	E _{(124)**} 0.89	E _{(124)**} 0.98	E ₍₁₃₁₎ 0.405
	E ₍₁₃₁₎ 0.09	E ₍₁₃₁₎ 0.06	E ₍₁₃₃₎ 0.48
	E ₍₁₃₃₎ 0.28	E ₍₁₃₃₎ 0.21	

Продовження таблиці			
10^{-3}	$E_{(122)*}$ 0.90	$E_{(122)*}$ 0.88	$E_{(122)*}$ 0.87
	$E_{(122)**}$ 0.91	$E_{(122)**}$ 0.96	$E_{(122)**}$ 0.91
	$E_{(124)*}$ 0.98	$E_{(124)*}$ 0.98	$E_{(124)*}$ 0.96
	$E_{(124)**}$ 0.97	$E_{(124)**}$ 0.91	$E_{(124)**}$ 0.96
	$E_{(131)*}$ 0.05	$E_{(131)}$ 0.06	$E_{(131)}$ 0.46
	$E_{(131)**}$ 0.09	$E_{(133)}$ 0.30	$E_{(133)}$ 0.68
	$E_{(133)*}$ 0.42		
	$E_{(133)}$ 0.68		
10^{-5}	$E_{(122)}$ 0.91	$E_{(122)}$ 0.97	$E_{(122)}$ 0.963
	$E_{(124)*}$ 0.97	$E_{(124)*}$ 0.96	$E_{(124)*}$ 0.981
	$E_{(124)**}$ 0.96	$E_{(124)**}$ 0.90	$E_{(124)**}$ 0.975
	$E_{(131)}$ 0.14	$E_{(131)}$ 0.08	$E_{(131)}$ 0.388
	$E_{(133)*}$ 0.39	$E_{(133)}$ 0.33	$E_{(133)}$ 0.625
	$E_{(133)}$ 0.556		

Таблиця 2.5 Значення роздільної здатності (R_s) та коефіцієнта селективності (α) для барвників

$c(\text{ЦПХ})$ моль/л	2.7	5.8	9.2
10^{-2}	$R_s(E_{122**} \text{ i } E_{124*})$ 1.25	$R_s(E_{122} \text{ i } E_{124*})$ 0.75	$R_s(E_{122*} \text{ i } E_{124*})$ 1.07
	$R_s(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 0.97	$R_s(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 0.94	$R_s(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 1.00
	$\alpha(E_{122**} \text{ i } E_{124*})$ 2.00	$\alpha(E_{122} \text{ i } E_{124})$ 0	$\alpha(E_{122*} \text{ i } E_{124*})$ 1.89
	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 4.05	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 4.56	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 1.33
10^{-3}	$R_s(E_{122*} \text{ i } E_{124*})$ 1.75	$R_s(E_{122*} \text{ i } E_{124*})$ 2.00	$R_s(E_{122**} \text{ i } E_{124**})$ 1.33
	$R_s(E_{131**} \text{ i } E_{133*})$ 1.62	$R_s(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 1.15	$R_s(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 1.26
	$\alpha(E_{122*} \text{ i } E_{124*})$ 6.42	$\alpha(E_{122*} \text{ i } E_{124*})$ 7.38	$\alpha(E_{122**} \text{ i } E_{124**})$ 2.25
	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 0	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 7.22	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 2.55
10^{-5}	$R_s(E_{122} \text{ i } E_{124*})$ 1.35	$R_s(E_{122} \text{ i } E_{124*})$ 0.5	$R_s(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 1.56
	$R_s(E_{131} \text{ i } E_{133*})$ 1.50	$R_s(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 1.05	$R_s(E_{122} \text{ i } E_{124*})$ 0.7
	$\alpha(E_{122} \text{ i } E_{124*})$ 3.24	$\alpha(E_{122} \text{ i } E_{124*})$ 0.97	$\alpha(E_{122} \text{ i } E_{124*})$ 1.87
	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133*})$ 4.06	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 5.93	$\alpha(E_{131} \text{ i } E_{133})$ 2.63

Можемо зробити деякі висновки, щодо оптимальних умов розділення.

- Оптимальні умови для розділення Е 122, Е 124 та Е 131 краще проводити при концентрації ЦПХ $1 \cdot 10^{-5}$ моль/ та рН 2.7 через форми плям всіх учасників.
- Оптимальні умови для розділення Е 122, Е 124, Е 131 та Е 133 краще проводити при рН 9.2 та концентрації ЦПХ $1 \cdot 10^{-5}$ через форми плям барвників та значення параметру фактора затримування (R_f).
- Оптимальні умови для розділення Е 131 та Е 133 краще проводити при рН 9.2 та будь-якому значенні концентрації ЦПХ.

2.3.1.2 Оптимізація типу та вмісту органічного модифікатора

Спирти - це органічні сполуки або похідні вуглеводнів, в яких один чи кілька атомів водню заміщені гідроксильною групою (О-Н).

Хімічні властивості спиртів залежать від наявності полярних зв'язків О-Н і С-О та нековалентних електронних пар атомів кисню; полярність зв'язку О-Н значно вища за полярність зв'язку С-О, про що свідчать відповідні значення дипольного моменту. [62]

Додавання спиртів у різних об'ємних частках до рухомої фази в тонкошаровій хроматографії може вплинути на хроматографічні плями і загальний процес розділення аналізованого зразка.

В тонкошаровій хроматографії зразок, розчинений в рухомій фазі, взаємодіє з нерухомою фазою для розділення компонентів на місці. Полярні матеріали взаємодіють сильніше, ніж неполярні. Додавання полярних розчинників, таких як спирти, змінює ступінь поляризації рухомої фази. Це впливає на взаємодію з молекулами в нерухомій фазі і на розподіл зразка між фазами. Механізм взаємодії між речовиною і нерухомою фазою також може змінюватися. Як наслідок, це впливає на швидкість руху речовини через нерухому фазу, а також на форму і розмір хроматографічної плями. Зміна полярності може впливати на розділення речовин, зокрема, регулюючи селективність і специфічність процесу. Це важливий фактор при оптимізації умов хроматографування для досягнення найкращого розділення під час аналізу. [57]

Додавання спиртів до рухомої фази може впливати на хімічні властивості рухомої фази, зокрема на полярність і розчинність різних сполук. Спирти можуть збільшувати або зменшувати розчинність сполук у рухомій фазі. Це може призвести до зміни концентрації речовини в РФ і спричинити зміну розподілу речовини між нерухомою і рухомою фазами. Зміна розчинності може вплинути на ефективність розділення.

Наприклад, збільшення розчинності певних компонентів може вплинути на ширину та інтенсивність хроматографічної плями за рахунок збільшення швидкості їх переміщення через рухому фазу. Зміна хімічних властивостей рухомої фази, в тому числі додавання спирту, може

впливати на конформацію молекул і визначати їх взаємодію із НФ. Вивчення впливу додавання спирту на розчинність речовин у хроматографічній системі допомагає визначити оптимальні умови аналізу і максимізувати роздільну здатність і чутливість хроматографічного методу. [63, 57]

Проведення ТШХ - розділення синтетичних харчових барвників з додавання до РФ органічних модифікаторів: 1-пропанолу та 1-пентанолу.

Ми використовували такі об'ємні частки спиртів як 1%, 3%, 5%, 8% для пропанолу-1 та 0.25%, 0.5%, 1%, 2% для пентанолу-1. При більшій об'ємній частці спирту більше 2% пропанолу-1 та для 8% пентанол-1 буде відбуватися розшарування системи, тобто вона не буде гомогенною.

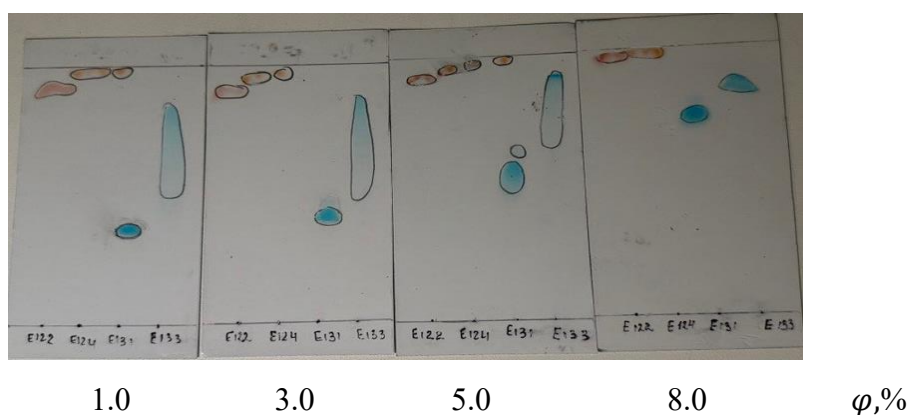


Рисунок 2.3 Результати хроматографічного розділення барвників з додаванням пропанолу-1 з різними об'ємними частками при рН 9.2 та концентрацією ЦПХ 10^{-5} моль/л

Форми плям барвників при внесенні органічного модифікатора пропанолу-1 покращувались для всіх синтетичних харчових барвників. Особливо покращувались форма плями Е 133 при об'ємній частці спирту 8%. Таким чином Е 122 та Е 124 можна відокремити від синіх барвників, але не один від одного. Додатково Е 131 та Е 133 в цих умовах добре розділяються (Рис. 2.3, Табл. 2.6).

Таблиця 2.6 Розраховані параметри розділення барвників з додаванням пропанолу-1 з різними об'ємними частками при рН 9.2 та концентрацією ЦПХ 10^{-5} моль/л

$\varphi, \%$	R_f	R_s	α
1	Е (122) 0.92	(Е 122 і Е 124*) 1.14	(Е 122 і Е 124*) 3.48
	Е (124*) 0.97	(Е 131 і Е 133) 1.41	(Е 131 і Е 133) 3.66
	Е (124**) 0.97		
	Е (131) 0.36		
	Е (133) 0.67		

Продовження таблиці			
3	$E_{(122)}$ 0.89 $E_{(124*)}$ 0.93 $E_{(124*)}$ 0.96 $E_{(131)}$ 0.41 $E_{(133)}$ 0.67	$(E_{122} \text{ і } E_{124*})$ 1.43 $(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 1.05	$(E_{122*} \text{ і } E_{124*})$ 1.78 $(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 2.88
5	$E_{(122*)}$ 0.93 $E_{(122**)}$ 0.96 $E_{(124*)}$ 0.97 $E_{(124**)}$ 0.99 $E_{(131*)}$ 0.531 $E_{(131**)}$ 0.631 $E_{(133)}$ 0.800	$(E_{122*} \text{ і } E_{124*})$ 1.33 $(E_{131*} \text{ і } E_{133})$ 1.18	$(E_{122*} \text{ і } E_{124*})$ 3.16 $(E_{131*} \text{ і } E_{133})$ 3.53
8	$E_{(122)}$ 0.97 $E_{(124)}$ 0.98 $E_{(131)}$ 0.86 $E_{(133)}$ 0.84	$(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 1.6	$(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 0.9

Барвники E 122 та E 124 задовільно розділялись при φ (пропанолу-1) = 3%, в той же час форма плями була деформованою. Тим не менш всі барвники можуть бути відділені один від одного (Рис. 2.3, Табл. 2.7). Барвник E 124, в цих умовах був у двох формах: трьохзарядний аніон (HR^{3-}) та відповідно чотиризарядний аніон (R^{4-}), $pK_a = 12.16$.

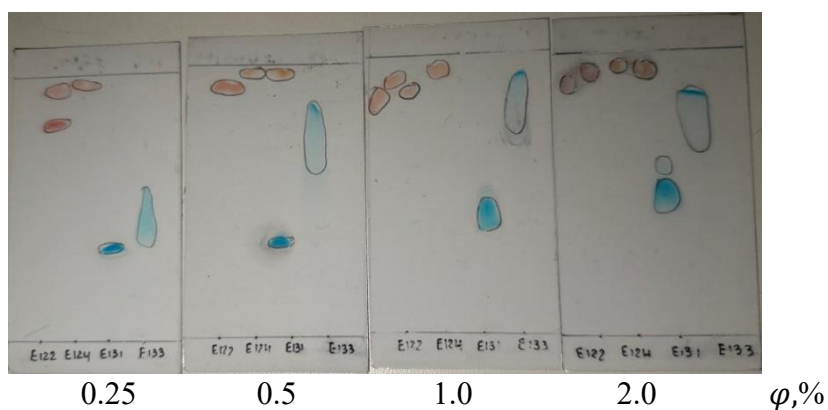


Рисунок 2.4 Результати хроматографічного розділення барвників з додаванням пентанолу-1 з різними об'ємними частками при pH 9.2 та концентрацією ЦПХ 10^{-5} моль/л

Таблиця 2.7 Розраховані параметри розділення барвників з додаванням пентанолу-1 з різними об'ємними частками при рН 9.2 та концентрацією ЦПХ 10^{-5} моль/л

$\varphi, \%$	R_f	R_s	α
0.25	$E_{(122)}$ 0.76 $E_{(124*)}$ 0.89 $E_{(124**)}$ 0.97 $E_{(131)}$ 0.34 $E_{(133)}$ 0.39	$(E_{122} \text{ і } E_{124*})$ 2.22 $(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 0.95	$(E_{122} \text{ і } E_{124*})$ 2.56 $(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 1.24
0.5	$E_{(122)}$ 0.93 $E_{(124*)}$ 0.97 $E_{(124**)}$ 0.97 $E_{(131)}$ 0.34 $E_{(133)}$ 0.73	$(E_{122} \text{ і } E_{124*})$ 1.33 $(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 2.55	$(E_{122} \text{ і } E_{124*})$ 3.16 $(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 5.18
1	$E_{(122)}$ 0.78 $E_{(122*)}$ 0.87 $E_{(124*)}$ 0.92 $E_{(124**)}$ 0.95 $E_{(131)}$ 0.42 $E_{(133)}$ 0.83	$(E_{122**} \text{ і } E_{124**})$ 1.2 $(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 2.36	$(E_{122**} \text{ і } E_{124**})$ 2.71 $(E_{131} \text{ і } E_{133})$ 6.54
2	$E_{(122*)}$ 0.89 $E_{(122**)}$ 0.93 $E_{(124*)}$ 0.95 $E_{(124**)}$ 0.93 $E_{(131*)}$ 0.48 $E_{(131**)}$ 0.53 $E_{(133)}$ 0.76	$(E_{122*} \text{ і } E_{124*})$ 1.11 $(E_{131*} \text{ і } E_{133})$ 1.57	$(E_{122*} \text{ і } E_{124*})$ 2.40 $(E_{131*} \text{ і } E_{133})$ 3.34

Для синтетичних харчових барвників E 122, E 124 та E 131 підходили значення об'ємної частки спирту φ (пентанолу - 1): 0.25%, 0.5 та 1%. Плями були компактною правильною форми. Але при φ спирту 1% спостерігалось існування барвників E 122 та E 124 в двох аніонних формах: E 124 в HR^{3-} та R^{4-} , $pK_a = 12.16$; E 122 в HR^{2-} та R^{3-} , $pK_a = 8.33$ відповідно – це не є задовільним при оптимізації розділення барвників (Рис. 2.4, Табл. 2.7).

В усіх випадках форма барвників Е 133 була незадовільна, але відокремити Е 133 від інших барвників можна при рН 9.2, c (ЦПХ) = $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л та φ спирту 0.5% та 2%. Але краще все таки при φ спирту 0.5%, так як для проведення експерименту використовується менша кількість реагенту, що робить цей метод дешевим.

2.4 Метрологічні характеристики напівкількісного аналізу харчових барвників

Основними метрологічними характеристиками напівкількісного аналізу є інтервал ненадійності, межа виявлення та межа кількісного визначення. [64]

2.4.1 Інтервал ненадійності

Область концентрації аналіту, де відсоток правильних відповідей спостерігачів (або частота виявлення аналіту $P(c)$) змінюється від 0 до 1, називається інтервалом ненадійності (ІН).

$$0 < P(c) < 1 \quad (2.1)$$

Чим вужчий інтервал ненадійності і чим менше значення його відносної ширини, тим зручніша система з практичної точки зору. [64, 65]

Для визначення інтервалу ненадійності готували розчин, що складався з суміші барвників Е 122, Е 124 та Е 131 концентрацією 2 ммоль/л. З цього розчину готували 5 розчинів з різними концентраціями. (Табл. 2.8)

Таблиця 2.8 Схема приготування розчинів

№	$V_{\text{ал}}, \text{мл}$	$V_{\text{заг}}, \text{мл}$	$C_{\text{р-ну}}$ ммоль/л
		$V_{\text{етанолу 96\%}}$	
1	2.5 мл розчину з c (суміші) = 2 ммоль/л	7.5 мл	0.5
2	5 мл розчину з c = 0.5 ммоль/л	5 мл	0.25
3	5 мл розчину з c = 0.25 ммоль/л	5 мл	0.125
4	5 мл розчину з c = 0.125 ммоль/л	5 мл	0.0625
5	5 мл розчину з c = 0.0625 ммоль/л	5 мл	0.03125

Було проведено 2 серії хроматографічного розділення для барвників з різною концентрацією. Після того як дістали пластину з рухомої фази, збирали 15 незалежних спостерігачів, яким задавали запитання: «Чи бачите ви відмінність досліджуваних плям барвника від холостої плями?». Спостерігачі на відстані 30 см від пластини та при денному світлі для кожного барвника давали відповідь «так» чи «ні». Всі результати наведені в таблицях 2.9, 2.10, 2.11.

Таблиця 2.13 Результати спостерегіачів для барвника Е 124

№ р-ну	Барвник Е 124														
	Спостерігачі														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблиця 2.14 Результати спостерегіачів для барвника Е 131

№ р-ну	Барвник Е 131														
	Спостерігачі														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Для барвників Е 122 та Е 124 проводили дослідження всіх 5 розчинів, а для барвника Е 131 не використовували 5 концентрацію. Результати наведено в таблицях 2.12, 2.13 та 2.14.

Отже, орієнтовний інтервал ненадійності для червоних барвників Е 122 та Е 124 складає 0.0625 ммоль/л або $6.25 \cdot 10^{-5}$ моль/л, для синього барвника Е 131 складає 0.125 ммоль/л або $1.25 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

2.4.2 Межа визначення

Межа визначення (c_{lim}) - це найменший вміст аналіту в речовині або матеріалі, який може бути кількісно визначений із заданою похибкою або невизначеністю за допомогою методики аналізу.

Візуальні напівкількісні визначення вмісту аналіту проводяться, використовуючи колірну шкалу порівняння, яка являє собою серію тестових зразків, що відповідають точно відомим концентраціям аналіту. Така шкала готується тільки перед тестуванням. [64, 66]

Межа визначення за допомогою кольорової шкали розраховується як потрійне експериментально знайдене стандартне відхилення поблизу цього значення (s_c). На практиці за верхню межу інтервалу ненадійності приймають наближене значення c_{lim} , а навколо цього значення готують тест-зразок, що відповідає кольоровій шкалі, і розчин заданої концентрації аналіту для порівняння. Використовуючи кольорову шкалу, 15-18 спостерігачів оцінюють концентрацію аналіту (c_i) в розчині. Експеримент повторюємо тричі. За результатами одержаних вимірювань ($N = 45$) розраховуємо стандартне відхилення шуканої концентрації та нижню межу кількісного визначення:

$$s_c = \sqrt{s_c^2} = \sqrt{\frac{\sum (c_{зад} - c_i)^2}{N - 1}} \quad (2.1)$$

$$c_{lim} = 3s_c \quad (2.2)$$

Таблиця 2.15 Розчини суміші синтетичних харчових барвників для колірної шкали порівняння

Концентрація розчину суміші барвників в реперних точках шкали, ммоль/л			Концентрація барвників для розчинів порівняння, ммоль/л			Концентрація барвників для розчинів порівняння, ммоль/л		
			Е 122	Е 124	Е 131	Е 122	Е 124	Е 131
1	2	3	4			5		
0.05	0.1	0.2	0.06	0.06	0.08	0.08	0.08	0.15

Для побудови колірної шкали на силікагелеві пластинки Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ-254 на відстані 1 см від нижнього краю пластинки вносили розчини барвників з різною концентрацією на відстані 1 см один від одного (Табл. 2.15). Концентрація аналіту на колірній шкалі зростає в геометричній прогресії, яка дорівнює 2, через експоненціальну залежність властивостей кольору від концентрації аналіту та зі сприйняттям кольору людським оком.

Коефіцієнт геометричної прогресії (q) - дорівнює відношенню сусідніх концентрацій на шкалі, найчастіше обирають рівним двом або трьом. Шкала повинна бути однаково контрастною і добре сприйматися людським оком. [64, 67]

$$q = \frac{c_{n+1}}{c} \quad (2.3)$$

Після нанесення розчинів на пластинки одразу занурювали в хроматографічні камери, в які попередньо вже були налиті рухомі фази: буферний розчин з рН 9.2, розчин цетилпіридиній хлориду з концентрацією $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л та пентанол-1 з об'ємною часткою 0.25%. Хроматографічні камери накривали кришками та чекали доки фронт рухомої фази не пройде відстань нижче на 1 см від краю пластинки

Таблиця 2.26 Результати опитування за 2 колірною шкалою порівняння

Діапазон концентрацій	Барвник Е 124, розчин № 5														
	Спостерігачі														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0.05	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
0.05 - 0.1	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
0.1	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
0.1 - 0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблиця 2.27 Результати опитування за 2 колірною шкалою порівняння

Діапазон концентрацій	Барвник Е 131, розчин № 5														
	Спостерігачі														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.05 - 0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
0.1 - 0.2	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

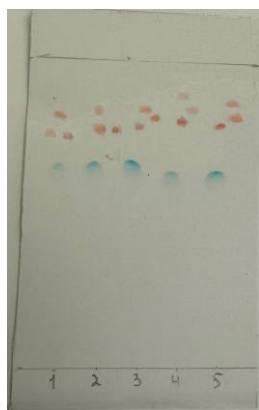


Рисунок 2.9 ТШХ-хроматограма колірної шкали (серія 3)

Таблиця 2.31 Результати опитування за 3 колірною шкалою порівняння

Діапазон концентрацій	Барвник Е 122, розчин № 5														
	Спостерігачі														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0.05	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
0.05 - 0.1	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
0.1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
0.1 - 0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблиця 2.32 Результати опитування за 3 колірною шкалою порівняння

Діапазон концентрацій	Барвник Е 124, розчин № 5														
	Спостерігачі														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0.05	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
0.05 - 0.1	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
0.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
0.1 - 0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблиця 2.33 Результати опитування за 3 колірною шкалою порівняння

Діапазон концентрацій	Барвник Е 131, розчин № 5														
	Спостерігачі														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.05 - 0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
0.1 - 0.2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Із отриманих результатів опитування проводимо розрахунок стандартного відхилення шуканої концентрації за формулою 2.1 та нижню межу визначення за формулою 2.2 для кожного синтетичного харчового барвника в суміші.

Таблиця 2.34 Колірна шкала: 0; 0.05; 0.1 ммоль/л; N = 45

Введено барвника Е 122 0.06 ммоль/л	Знайдено барвника Е 122 з використанням колірної шкали, ммоль/л				
	0.05	0.025	0.05	0.075	0.1
Число відповідей	0	0	18	27	0
S_c	0.013 ммоль/л				
c_{lim}	0.039 ммоль/л				

Таблиця 2.35 Колірна шкала: 0; 0.05; 0.1 ммоль/л; N = 45

Введено барвника Е 124 0.06 ммоль/л	Знайдено барвника Е 124 з використанням колірної шкали, ммоль/л				
	0	0.025	0.05	0.075	0.1
Число відповідей	0	0	10	27	7
S_c	0.013 ммоль/л				
c_{lim}	0.038 ммоль/л				

Таблиця 2.36 Колірна шкала: 0; 0.1; 0.2 ммоль/л; N = 45

Введено барвника Е 131 0.08 ммоль/л	Знайдено барвника Е 131 з використанням колірної шкали, ммоль/л				
	0	0.05	0.1	0.15	0.2
Число відповідей	0	0	14	30	1
S_c	0.06 ммоль/л				
c_{lim}	0.17 ммоль/л				

Таблиця 2.37 Колірна шкала: 0; 0.05; 0.1 ммоль/л; N = 45

Введено барвника Е 122 0.08 ммоль/л	Знайдено барвника Е 122 з використанням колірної шкали, ммоль/л				
	0	0.025	0.05	0.075	0.1
Число відповідей	0	0	11	27	7
S_c	0.015 ммоль/л				
c_{lim}	0.046 ммоль/л				

Таблиця 2.38 Колірна шкала: 0; 0.05; 0.1 ммоль/л; N = 45

Введено барвника Е 124 0.08 ммоль/л	Знайдено барвника Е 124 з використанням колірної шкали, ммоль/л				
	0	0.025	0.05	0.075	0.1
Число відповідей	0	0	7	24	14
S_c	0.013 ммоль/л				
c_{lim}	0.038 ммоль/л				

Таблиця 2.39 Колірна шкала: 0; 0.1; 0.2 ммоль/л; N = 45

Введено барвника Е 131 0.15 ммоль/л	Знайдено барвника Е 131 з використанням колірної шкали, ммоль/л				
	0	0.05	0.1	0.15	0.2
Число відповідей	0	0	12	33	0
S_c	0.06 ммоль/л				
c_{lim}	0.18 ммоль/л				

Отже, нижня межа визначення для синтетичного харчового барвника Е 122 в суміші становить 0.06 ммоль/л або $6 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Табл. 2.34). Для синтетичного харчового барвника Е 124 нижня межа візуального визначення становить як 0.06 ммоль/л або $6 \cdot 10^{-5}$ моль/л відповідно (Табл. 2.35). Це говорить про те, що межа визначення для цього барвника знайдена правильно. Для синтетичного барвника Е 131 в суміші нижньою межею напівкількісного визначення являється значення 0.08 ммоль/л або $8 \cdot 10^{-5}$ моль/л (Табл.2.36).

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано існуючі методи аналізу синтетичних харчових барвників.
2. Оптимізовано умови розділення синтетичних харчових барвників Е 122, Е 124, Е 131, Е 133: концентрація цетилпіридиній хлориду $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, тетраборатних буферний розчин з рН 9.2, пентанол-1 з φ 0.25%.
3. Встановлено величини межі напівкількісного візуального визначення синтетичних харчових барвників Е 122, Е 124 та Е 133: 0.06 ммоль/л, 0.06 ммоль/л та 0.08 ммоль/л відповідно.

 О.В. Бакуменко

ДЖЕРЕЛА ЛІТЕРАТУРИ

1. Friedrich Bayer, Adolf von Baeyer. National Center for Biotechnology Information - General Introduction to the Chemistry of Dyes. **2024**
2. Syntetic Food Dyes-Some Aspects of Use and Methods of Determination/ L.Dubenska et al.*Methods and objects of chemical analysis*,. 2020. № 1. p. 5 - 20.
3. Єдаменко Д. В. Розділення і визначення біологічно активних органічних речовин методом тонкошарової хроматографії з використанням міцелярних рухомих фаз.: Харків. – 2016
4. Санітарні правила по застосуванню харчових добавок № 222 від 23 липня 1996 року. Збірник важливих офіційних матеріалів. Київ, 1997. с. 122–184.
5. Кофанов А.В., Кобилянський О.Л., Давидова О.О. Криміналістичні дослідження лакофарбових матеріалів. – Методичні рекомендації. – Київ: КИЙ, 2010. с. 48.
6. Amchova, P.; Kotolova, H.; Ruda-Kucerova, J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, 73(3), p. 914-922.
7. Bateman B., Warner J. O., Hutchinson E., Dean T., Rowlandson P., Gant C., Grundy J., Fitzgerald C., Stevenson J. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children / *Archives of Disease in Childhood*. **2004**. ,V. 89, №. 6, p. 506-511.
8. Amin, K. A.; Abdel Hameid, H.; Abd Elsttar, A. H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48(10), p. 2994-2999.
9. Basu. B. A.; Kuma. G. S. Binding of carmoisine, a food colorant, with hemoglobin: spectroscopic and calorimetric studies. *Food Research International*. **2015**, 72, p. 54-61.
10. Біленчук П. Д. Криміналістична тактика і методика розслідування окремих видів злочинів: Навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. / П. Д. Біленчук, А. П. Гель, Г. С. Семаков. - К.: МАУП, 2007. - Бібліогр.: у кінц. розд. - с. 512.
11. Сарафанова Л.О. Харчові добавки: Енциклопедія. – 2-е вид. випр. і відред. - СПб.: Професія. 2011.; с. 775.
12. Мчедлов-Петросян Н. О. Флуоресцеїнові барвники в розчинах - добре вивчені системи. *Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Сер. Хімія.* - **2004**. - Т. 626, № 11 (34). с. 221-313.
13. О. М. Чеботарьов., Бевзюк К. В., Христова, Н. М., Столовник, К. О. Кислотно-основні кольорометричні характеристики харчового барвника Жовтий «Сонячний захід сонця». *Вісник Одеського національного університету. Хімія.* - **2014**. - Т. 19, № 2 (50), с. 50-57.

14. Ластухін, Ю. О. "Харчові добавки. Е-коди. Будова. Одержання. Властивості. «Львів: Центр Європи», 2009 ; с. 836.
15. Болотов В. М. Харчові барвники: класифікація, властивості, аналіз, застосування / В. М. Болотов, А. П. Нечаєв, Л. А. Сарафанова. - СПб. : ГИОРД. - 2008. - с. 237.
16. Khalzova S. A. Determination of synthetic dyes in liquid media using piezoelectric sensors modified with polymers with molecular imprints. PhD Thesis. 2017
17. Bassam M.E. A., Speight J. G., Farahat A. M. Handbook of industrial chemistry: organic chemicals. McGraw-Hill New York: 2005.
18. Brown D., Floyd A., Sainsbury M. Spectroscopy of organic substances,; *Mir*, **1992**. - p. 300.
19. Хімія барвників: Навчальний посібник / укл.: Ягодинець П. І., Скрипська О. В., Андрійчук Ю. М. – Чернівці, 2019. - с. 92.
20. Сарафанова Л.О Застосування харчових добавок в кондитерській промисловості. – СПб.: Професія. 2005.
21. McCann, D.; Barrett, A.; Cooper, A.; Crumpler, D.; Dalen, L.; Grimshaw, K.; et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3- year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*. **2007**, 370, p. 1560-1567.
22. FDA. Food and Drug Administration & US Department of Health and Human Services. Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices. [Електронний ресурс, цитовано 3.01.2019].
23. Регламент Європейського Парламенту і Ради про харчові добавки (ЄС) № 1333/2008 від 16 грудня 2008 року
24. Venkataraman, Krishnasami, ed. The Chemistry of Synthetic Dyes. *Elsevier* 2012, *V4*. Vol. 4.
25. Пищевая химия / А.П. Нечаев, С.Е. Траубенберг, А.А.Кочеткова и др./ Под ред. А.П. Нечаева; издание 4-е, испр. и доп. – СПб.: ГИРД, 2007. - с. 640.
26. Minioti K.S, Sakellariou C.F, Thomaidis N.S. Determination of 13 synthetic food colorants in watersoluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Anal Chim Acta*. **2007**, 583(1), p. 103 - 110.
27. Коваленко Д. Н. Аналіз якості харчових продуктів та інгредієнтів. Застосування ГЖХ та ВЕРХ з мас-спектральним закінченням / Д. Н. Коваленко // Молочна промисловість. - 2006. № 5. с. 25-28.
28. Vaněrková, D., Jandera, P., & Hrabica, J.. Behaviour of sulphonated azodyes in ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1143(1-2), p.112-120.

29. Filiz Z., Oymak T., Dural E. Determination of synthetic colorants in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Res Pharm.* **2019**, 23(6), p. 1048-1059.
30. Юрченко, О. І., Дрозд, А. В., & Бугаєвський, О. А. Аналітична хімія. Загальні положення. Якісний аналіз. Харків: ХНУ, 2002. – с. 123.
31. Баркарь Є. В. Б25 Методи біотехнологічних досліджень : курс лекцій / Є. В. Баркарь. - Миколаїв : МНАУ, **2019**. – с. 44.
32. Корнілович Б.Ю. Фізична хімія кремнезему і нанодисперсних силікатів: навчальний посібник/ Корнілович Б.Ю., Андрієвська О.Р., Племянніков М.М., Спасьонова Л.М.; за ред. чл.-кор. НАН України Б.Ю. Корніловича.- К.: «Освіта України», 2013.- с. 178.
33. Torres-Lapasio J.R. Michrom software / J.R. Torres-Lapasio // User Manual in: Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Micellar Liquid Chromatography. – New York : *Marcel Dekker*, **2000**. – p. 632.
34. Матерієнко А.С., Грудько В.А., Георгіянц В.А. Розробка методик визначення тартразину та кармуазину у сиропі «Грипаут бейбі». - *Серія медицини. Фармація*. **2013**. № 25 (168). Випуск 24.
35. Jelena Vlajkovic, Filip Andric, Petar Ristivojevic, Aleksandra Radoicic, Zivoslav Tesic, Dusanka Milojkovic-Opsenica. Development and validation of a TLC method for the analysis of synthetic foodstuff dyes. - *Article in Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2013**, 36(17).
36. Sobańska, A. W., Pyzowski, J.; Brzezińska, E. SPE/TLC/Densitometric Quantification of Selected Synthetic Food Dyes in Liquid Foodstuffs and Pharmaceutical Preparations. *J. Anal. Methods Chem.*, **2017**, p.1-9.
37. Sumina E.G., Atayan V.Z. Determination of Food Dyes by Thin-Layer Chromatography with Cyclodextrin Mobile Phases. - *Journal of Analytical Chemistry* **2003**, 58 (7).
38. Федорченко С.В., Курта. С.А. "Хроматографічні методи аналізу: навч. посіб. Івано-Франківськ: Прикарп. нац. ун-т ім. В. Стефаника: 2012. с. 146.
39. Del Giovine L., Piccioli Bocca A. Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis. *Food Control*. **2003**, 14(3), p. 131-135.
40. Коновалова, О.Ю., Тимченко В.В., Н. Никитина А.А. Разделение и определение пищевых красителей Е 110 и Е 122 методом гель-электрофореза. *Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: Хімія*, **2014**, 23: с. 61-72.
41. Kaur A.; Gupta U. The Review on Spectrophotometric Determination of Synthetic Food Dyes and Lakes. *Gazi University Journal of Science*. **2012**, 25(3), p. 579-588.
42. Li R.; Jiang Z.-T.; Wang R.-X. Solid phase extraction combined direct spectrophotometric determination of Brilliant Blue in food using β -cyclodextrin polymer. *Food Anal. Methods*. **2009**, 2, p. 264-270.

43. Bişgin A.T. Simultaneous extraction and determination of Allura Red (E129) and brilliant blue FCF (E133) in foodstuffs by column solid-phase spectrophotometry. *J. AOAC Int.* **2019**, *102* (1), p 181-188.
44. Capitán-Vallvey L.F.; Valencia M.C.; Nicolás E.A. Flow injection analysis with on-line solid phase extraction for spectrophotometric determination of Ponceau 4R and its subsidiary unsulfonated dye in sweets and cosmetic products. *Microchim. Acta.* **2002**, *38* (1-2), p. 69-76.
45. Bişgin A.T.; Narin I.; Uçan M. Determination of sunset yellow (E110) in foodstuffs and pharmaceuticals after separation and preconcentration via solid-phase extraction method. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2015**, *50* (4), p. 919-925.
46. Altunau N. A Simple and Cheap Ultrasound Assisted Microextraction Procedure For Extraction of Tartrazine in Soft Drinks and Foodstuff. *Cumhuriyet Sci. J.* **2019**, *40*(2), p. 275-284.
47. Nevado J.J.B.; Flores J.R.; Cabanillas C.G.; Llerena M.J.V.; Salcedo A.C. Resolution of ternary mixtures of Tartrazine, Sunset yellow and Ponceau 4R by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods. *Talanta.* **1998**, *46*, p. 933-942.
48. Bozdoğan A.; Özgür M.U.; Koyuncu I. Simultaneous determination of sunset yellow and ponceau 4R in gelatin powder by derivative spectrophotometry and partial least-squares multivariate spectrophotometric calibration. *Anal. Lett.* **2000**, *3*(14), p. 2975-2982.
49. Nevado J.J.B.; Cabanillas C.G.; Flores J.R.; Salcedo A.M.C.; Llerena M.J.V. Rapid spectrophotometric method for determining eritrosine, amaranth and tartrazine in ternary mixtures. *Anal. Lett.* **1997**, *30*(14), p. 2565-2578.
50. Dinç E.; Baydan E.; Kanbur M.; Onur F. Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component regression methods. *Talanta.* **2002**, *58*, p. 579-594.
51. Saleh M. M. S.; Hashem E. Y.; Al-Salahi N. O.A. Oxidation and complexation-based spectrophotometric methods for sensitive determination of tartrazine E102 in some commercial food samples. *Comp. Chem.* **2016**, *4*, p. 51-64.
52. Boeris V.; Arancibia J.A.; Olivieri A.C. Multivariate curve resolution applied to kinetic spectroscopic data matrices: Dye determination in foods by means of enzymatic oxidation. *Talanta.* **2017**, *169*, p. 189–194.
53. Dubenska L.O.; Plotytsia S.I.; Blazheievskyi M.Ye.; Pylypets M.Ya.; Sarakhman O.M. Metod voltamperometrii dlia vyznachennia likarskykh rehovyn. *Methods Objects Chem. Anal.* **2017**, *12*(2), p. 61-75.
54. Vladislavić N.; Buzuk M.; Škugor Rončević I.; Brinić S. Electroanalytical methods for determination of sunset yellow – a Review. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, *13*, p. 7008-7019.
55. Rouhani S. Novel electrochemical sensor for Sunset Yellow based on a platinum wire-coated electrode. *Anal. Lett.* **2009**, *42*(1), p. 141-153.

56. Shohre Rouhani, Narges Alizadeh, Novel PVC-Based Coated Graphite Electrode for Selective Determination of Quinoline Yellow. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **2009**. 6(4)
57. Skoog, Douglas A., F. James Holler, and S. R. Crouch. "Principles of instrumental analysis. Thomson Brooks." *Cole, Canada*. 2007; p. 1011.
58. Лурье Ю. Ю. Буферные растворы. Справочник по аналитической химии; Химия:, 1989; с 272.
59. Критические концентрации мицеллообразования. Поверхностно-активные вещества; Химия: Ленинград, 1979; с. 197.
60. Singappuli-Arachchige, Dilini; Slowing, Igor I. Control of interfacial pH in mesoporous silica nanoparticles via surface functionalization. *J. Chem. Phys.*, **2020**, 152(3).
61. Кусяк, А. П. Адсорбційна активність поверхні в концепції багаторівневих нанокompозитів з функціями нанороботів. *Diss. Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка*:Київ, 2018.
62. Ю.О. Ластухін, С.А. Воронов. Органічна хімія. Підручник для вищих навчальних закладів. – Львів: *Центр Європи*, 2006. – с. 864.
63. Ренкевич О. Ю., Куликов О. Ю., Баштинський С. А., Чернишова О. С. Вплив фізико-хімічних параметрів рухомої фази на основі неіоногенного ПАВ на хроматографічну поведінку речовин у міцелярній та субміцелярній ТСХ. *Вісник Харківського національного університету*. – **2014**. – №1136, серія "Хімія", вип. 24 (47). - с. 145-15.
64. Хроматографічні та тестові методи аналізу: навчальний посібник: у 2 ч. Ч.1. Тестові методи аналізу / О.О. Решетняк, Н. О. Никітіна. Х.: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2012. - с. 92.
65. E.A.Reshetnyak, N.A. Nikitina, Yu.V.Kholin et al (2003) Metrological characteristics in test analysis: reliable estimates. *Kharkov University Bulletin*, Vol.596, №10(33). p. 90-98. [In Russian]
66. Lidia P. Loginova, Olga Konovalova. Test films for test-determinations on the base of reagents, immobilized in gelatinous gel. *Talanta*, **2008**, Vol. 77, № 2. p. 915-923.
67. Olga Konovalova, Valeriya Savchenko, Natalia Nikitina, Valentina Nesterenko, Anna Radomska and Elizaveta Voroshilova. Gel-electrophoretic separation of a number of synthetic food dyes with subsequent determination by spectrophotometric and visual methods. *Methods Objects Chem. analytics*, **2023** , 18(3), p.126-135.