

JOANNA MASŁOWSKA, JOLANTA JANIAK

BADANIA NAD ZAWARTOŚCIĄ SYNTETYCZNYCH BARWNIKÓW SPOŻYWCZYCH W BARWIONYCH GALARETKACH ŻELATYNOWYCH

STUDY OF CONTENTS OF SYNTHETIC FOOD DYES IN GELATINE JELLIES

Z Zespołu Chemii Bionieorganicznej i Analitycznej
Instytutu Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej
Kierownik: prof. dr hab. J. Masłowska

Opisano sposoby wykrywania i metody ilościowego oznaczania barwników syntetycznych w barwionych galaretkach żelatynowych. W badaniach wykorzystano trzy techniki: chromatografię bibulową, spektrofotometrię absorpcyjną i polarografię różnicową.

WSTĘP

Do barwienia żywności używa się barwników organicznych, zarówno naturalnych, uzyskiwanych z roślin lub organizmów zwierzęcych jak również syntetycznych, otrzymywanych w wyniku odpowiednich reakcji chemicznych [10, 12]. Barwniki spożywcze są zwykle łatwo rozpuszczalne w wodzie, nieco trudniej w niektórych rozpuszczalnikach organicznych takich jak: metanol, etanol, aceton, eter dietylowy, chloroform a nierozpuszczalne w olejach i tłuszczach. Są one dostatecznie dobrze rozpuszczalne w glicerynie, sorbitolu lub w glikolu propylenowym, co wykorzystuje się wówczas, gdy dodatek wody do produktu spożywczego jest niepożądany [11]. W większości krajów barwienie żywności jest regulowane specjalnymi dla każdego z nich odrębnymi aktami prawnymi. Zwykle publikuje się tzw. listę barwników dozwolonych do praktycznego stosowania oraz szczegółowe wymagania dotyczące dopuszczalnych zawartości zanieczyszczeń.

W Polsce stosowanie substancji dodatkowych do żywności reguluje Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej [12]. Zgodnie z tym zarządzeniem do barwienia żywności dopuszczonych jest osiem barwników spożywczych podanych w tabeli I. Ustalono również dopuszczalną zawartość danego barwnika w odpowiednich produktach spożywczych.

Maksymalna zawartość naturalnych barwników organicznych w produktach spożywczych została ustalona na poziomie 250 mg/kg, a zawartość syntetycznych, organicznych barwników mieści się w granicach od 30 do 200 mg/kg, w zależności od rodzaju środka spożywczego [12]. Ze względów zdrowotnych zarówno w Polsce jak i w innych krajach obserwuje się tendencję do zmniejszania liczby barwników, dopuszczonych wcześniej do barwienia żywności. Na podejmowanie takich decyzji, mają wpływ głównie aktualne wyniki badań, dotyczące ich szkodliwości. W ustroju człowieka barwniki azowe ulegają redukcji do amin aromatycznych, które charakteryzują się udowodnionym działaniem rakotwórczym [2, 9].

Tabela I. Wykaz syntetycznych barwników spożywczych dopuszczonych do stosowania w Polsce [13].
List of synthetic food colours permitted in Poland.

Lp.	Nazwa barwnika	Colour index No	EEC No	Barwa
1	Czerwień koszenilowa	16255	E 124	czerwona
2	Czerń brylantowa	28440	E 151	niebieska
3	Indygotyna	73015	E 132	niebieska
4	Żółcień pomarańczowa	15985	E 110	pomarańczowa
5	Żółcień chinolinowa	47005	E 104	żółta
6	Fiolet metylowy	42535	–	fioletowa
7	Błękit patentowy	42051	E 131	niebieska
8	Azorubina	14720	E 122	czerwona

Dotychczasowe nasze prace badawcze [3, 7] dotyczące barwników spożywczych poświęcone były właściwościom kwasowo-zasadowym tych barwników [3], oddziaływaniom z jonami żelaza [4] oraz ich polarograficznej redukcji na wiszącej kroplowej elektrodzie rtęciowej [5–7].

Celem niniejszej pracy było opracowanie sposobów identyfikacji oraz metod ilościowego oznaczania syntetycznych barwników spożywczych zawartych w barwionych galaretkach żelatynowych.

MATERIAŁ I METODYKA

Przedmiotem badań były trzy różne rodzaje galaretek żelatynowych:

- produkcji czeskiej (Cokoladovy Velim Kombinadni Podnik, Velim);
- produkcji polskiej (Zakład Przetwórstwa Spożywczego, Dimax)
- produkcji tureckiej (Gıda Maddeleri, Sanayu Ve Tic A.S., Istambul).

W tabeli II podano szczegółową charakterystykę badanych próbek dotyczącą masy, barwy i zawartości innych związków chemicznych zadeklarowanych przez producentów na opakowaniu. Część doświadczeń wykonano w dwóch etapach. Pierwszy etap polegał na ekstrakcji barwników z badanych galaretek. W drugim etapie dokonano identyfikacji i określono zawartość barwników w badanych galaretkach.

Sposób wykonania ekstrakcji

Etap ekstrakcji barwników z badanych galaretek wykonywano wg *Andrzejewskiej* [1]. W tym celu odważono 4–5 g uprzednio rozdrobnionej próbki galaretki i rozpuszczono ją w 30 cm³ wody redestylowanej o temp. 70°C. Roztwór zakwaszono kwasem octowym do pH 2–3, a następnie przenoszono ilościowo na kolumnę chromatograficzną wypełnioną tlenkiem glinu Al₂O₃. Kolumnę przemywano około 150 cm³ wody redestylowanej o temp. 70°C, w celu usunięcia substancji przeszkadzających (sacharoza, kwas cytrynowy, żelatyna, substancje zapachowe itp.). Jeżeli w próbce są obecne syntetyczne barwniki spożywcze to ulegną one adsorpcji na powierzchni tlenku glinu stanowiącego wypełnienie kolumny. Brak zabarwienia nośnika w kolumnie przy równoczesnej obecności barwników w eluacie (przesączu z kolumny) wskazuje na użycie barwników pochodzenia naturalnego.

Zaadsorbowane barwniki na Al₂O₃ eluowano roztworem będącym mieszaniną 25% amoniaku i wody destylowanej (1:9). Eluat odparowywano i przenoszono ilościowo do kolbki miarowej o pojemności 10 cm³.

Tabela II. Charakterystyka badanych próbek galaretek żelatynowych wg deklaracji producentów.
 Characteristics of the studied samples of gelatine jellies as declared by producer.

Lp.	Producent badanej galaretki	Masa opakowania (g)	Barwa galaretki w opakowaniu	Inne składniki zawarte w galaretkce
1	Czechy	150	żółta, zielona, czerwona, brązowa	Cukier, syrop skrobiowy, żelatyna, kwas cytrynowy, substancje zapachowe, barwniki (E 102, E 110, E 127, E 132).
2	Polska	100	czerwona, pomarańczowa, żółta, seledynowa	Cukier, żelatyna, kwas cytrynowy, esencja, barwniki
3	Turcja	50	wiśniowa, malinowa, żółta, bezbarwna	Syrop kukurydziany, żelatyna, sok owocowy, kwas cytrynowy, naturalne substancje zapachowe oraz środki nabłyszczające: olej roślinny i wosk pszczeleli.

Sposoby identyfikacji i oznaczania barwników w roztworze

Zastosowano trzy niezależne metody analityczne:

- chromatografię bibułową, wstępującą (bibuła *Whatman* 3; układ rozwijający: amoniak 25% - etanol - woda (1:2:3));
- Spektrofotometrię absorpcyjną w obszarze ultrafioletu i w części widzialnej widma (kiuwety kwarcowe o grubości $d = 1$ cm, odnośnik-woda);
- polarografię różnicową na wiszącej kropli rtęci fsdpp (katoda: wisząca kroplowa elektroda rtęciowa (HME); anoda: nasycona elektroda kalomelowa-NEK; elektroda odniesienia: blaszka platynowa o powierzchni $1,5$ cm²; elektrolit podstawowy: bufor *Brittona-Robinsona*).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badania próbek żelków, produkcji tureckiej nie wykazały obecności w nich barwników syntetycznych. Po przepuszczeniu barwnych roztworów przez kolumnę chromatograficzną wypełnienie pozostawało bezbarwne, a wszystkie barwniki przechodziły do przesączu. Barwniki zawarte w badanych żelkach były naturalne i pochodziły przypuszczalnie z soków owocowych użytych przy ich produkcji, co jest zgodne z deklaracją producenta podaną na opakowaniu. W dalszych etapach badań uwagę skoncentrowano na galaretkach produkcji polskiej oraz czeskiej. W tabeli III podano wyznaczone wartości R_F barwników zawartych w barwnych eluatach otrzymanych z badanych galaretek oraz barwników zawartych we wzorcowych roztworach dozwolonych barwników spożywczych.

Dane te pozwalają na wstępną identyfikację. W galaretkach produkcji czeskiej stwierdzono obecność tartrazyny (barwa żółta), czerwieni koszenilowej (barwa czerwona), tartrazyny + indygotyny (barwa zielona), czerwieni koszenilowej + indygotyny (barwa brązowa). Otrzymane przez nas dane wskazują, że w próbkach produkcji polskiej tartrazyna występuje w galaretkach o barwie: żółtej, seledynowej oraz pomarańczowej. W galaretkach o barwie czerwonej obecna jest czerwień koszenilowa. Barwnik ten obecny jest także w bardzo małej ilości w galaretkce o barwie

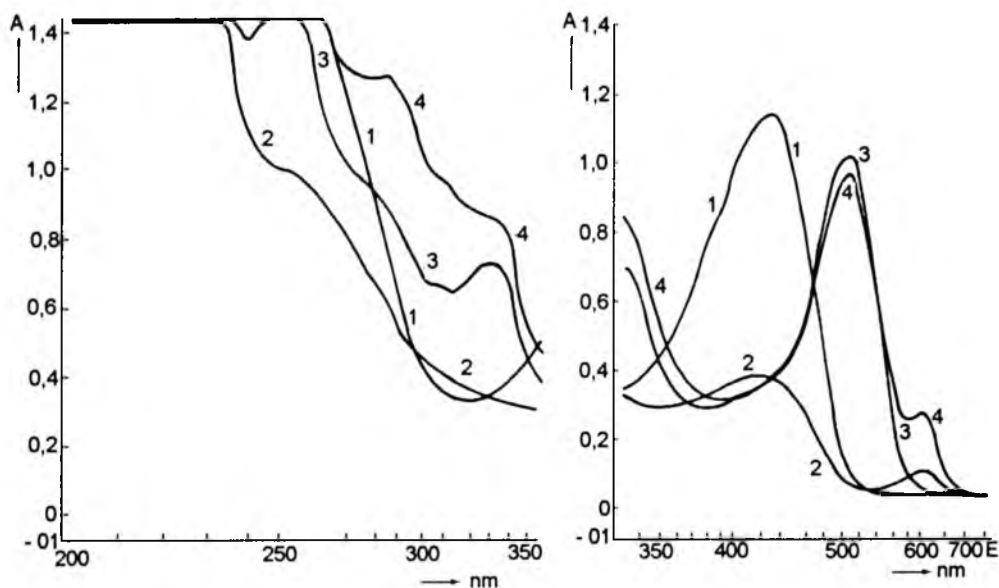
Tabela III. Wyznaczone wartości współczynników przesunięć (R_f) barwników; układ rozwijający: 25% $\text{NH}_3\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH-H}_2\text{O}$ (1:2:3); bibuła *Whatman* 3; czas rozwijania – 1 godzina, temp. 20°C. Calculated values of shifting index (R_f) of colours: Developing system: 25% $\text{NH}_3\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH-H}_2\text{O}$ (1:2:3); *Whatman* paper 3, development time – 1 hour, temp. 20°C

Charakterystyka badanej próbki	Wartość R_f plam na chromatogramie $\times 100$	
Galaretki czeskie o barwach:		
czerwonej	84	
brązowej	84 i 52	
żółtej	79	
zielonej	78 i 50	
Galaretki polskie o barwach:		
czerwonej	85	
pomarańczowej	83 i 78	
seledynowej	79	
żółtej	78	
Wzorce barwników firmy BASF (Niemcy):		
Tartrazyna	żółta	78
Czerwień koszenilowa	czerwona	85
Amarant	czerwona	47
Erytrozyna	czerwona	56
Żółcień pomarańczowa	pomarańczowa	60
Indygotyna	niebieska	52
Czerń brylantowa	niebieska	21

pomarańczowej. W celu potwierdzenia tych wyników oraz określenia ilościowej zawartości poszczególnych barwników wykonaliśmy badania spektrofotometryczne. Na rysunkach 1 i 2 przedstawiono otrzymane elektronowe widma absorpcyjne wodnych roztworów barwników wyekstrahowanych z próbek badanych galaretek produkcji czeskiej i polskiej.

W naszej wcześniejszej pracy z 1983 r. [3] zamieszczono elektronowe widma absorpcyjne i ich charakterystykę, rozcieńczonych, wodnych roztworów podstawowych barwników spożywczych. W oparciu o te widma oraz widma zamieszczone w tej pracy na ryc. 1 oraz 2 dokonano obecnie identyfikacji barwników zawartych w badanych galaretkach żelatynowych. W tabeli IV podane są charakterystyczne pasma występujące w widmach barwników zawartych w badanych galaretkach. Użyte wyniki potwierdzają w pełni wyciągnięte wnioski w oparciu o badania metodą chromatograficzną.

Deklaracja producenta dotycząca obecności erytrozyny w badanych galaretkach okazała się nieprawdziwa. Barwnik ten nie jest dopuszczony do stosowania w Polsce. Przyjmując, że erytrozyna może występować w galaretkach o barwie zbliżonej do czerwonej lub filetovej, szczegółowym badaniom poddano wszystkie galaretki o barwie czerwonej i brązowej. W obu rodzajach galaretek wykazano obecność barwnika



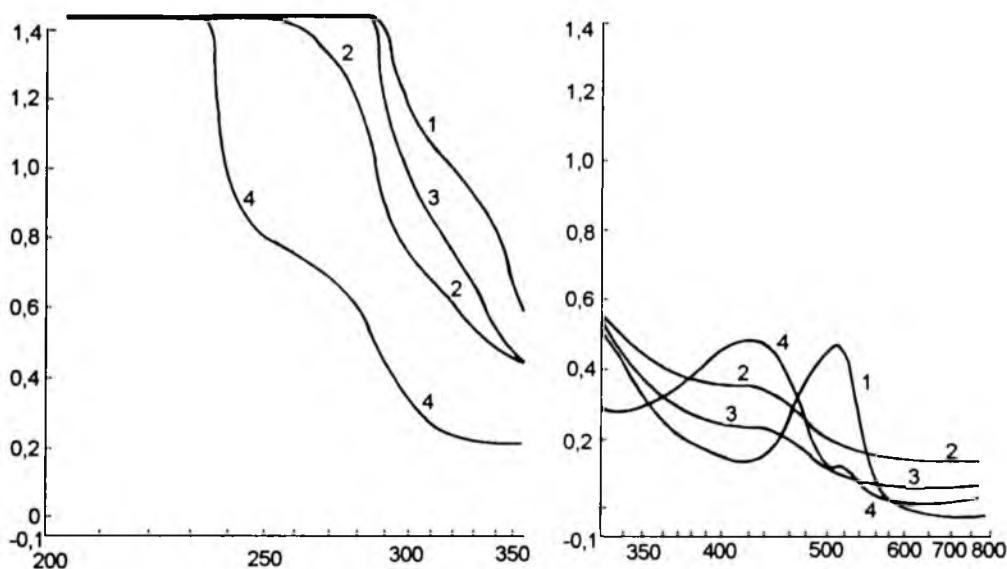
Ryc. 1. Widma absorpcyjne wodnych roztworów barwników spożywczych zawartych w galaretkach żelatynowych (żelkach) produkcji czeskiej; Barwa galaretek: 1 – żółta, 2 – zielona, 3 – czerwona, 4 – brązowa; $d = 1$ cm; temp. 20°C .

Absorption spectra of water solutions of food product colours in gelatin jellies of Czech production. Jelly colour: 1 – yellow, 2 – green, 3 – red, 4 – brown, $d = 1$ cm, temp. 20°C

czerwonego, w widmie którego występuje pasmo w obszarze widzialnym $\lambda_{max} = 512$ nm. Wcześniej doświadczalnie wykazano [8], że dla erytrozyny B wartość λ_{max} tego pasma wynosi 525 nm, a dla erytrozyny Y – 518 nm. Ocena tych wartości oraz porównanie przebiegu całych widm w zakresie UV-VIS badanych próbek z widmami roztworów wzorcowych próbek erytrozyny B i Y wyklucza obecność tych barwników w badanych

Tabela IV. Dane spektralne charakteryzujące widma barwników zawartych w badanych galaretkach
Spectral data characteristic of spectra of the colours in the studied jellies.

Lp.	Badana galaretka		Charakterystyka pasma w widmie absorpcyjnym			
	Producent	Barwa	Pasma I		Pasma II	
			λ (nm)	A	λ (nm)	A
1	Czechy	żółta	425	1,140	–	–
		zielona	425	0,380	625	0,100
		czerwona	512	1,020	–	–
		brązowa	512	0,960	625	0,270
2	Polska	czerwona	512	0,460	–	–
		seledynowa	425	0,340	–	–
		żółta	425	0,220	–	–
		pomarańczowa	425	0,480	512	0,100



Ryc. 2. Widma absorpcyjne wodnych roztworów barwników spożywczych zawartych w galaretkach żelatynowych (żelkach) produkcji polskiej; Barwa galaretek: 1 – czerwona, 2 – seledynowa, 3 – żółta, 4 – pomarańczowa; $d = 1$ cm; temp. 20°C

Absorption spectra of water solutions of food product colours in gelatin jellies of Polish production. Jelly colour: 1 – red, 2 – celadon, 3 – yellow, 4 – orange; $d = 1$ cm, temp. 20°C

próbkach. Dla wszystkich wykrytych barwników wykonano badania zależności absorbancji od stężenia ($A = f(c)$). Po wykreśleniu krzywych wzorcowych określono zawartość barwnika w poszczególnych rodzajach galaretek. Wyniki obliczeń podano w tabeli V.

W tabeli tej są zamieszczone również wyniki otrzymane metodą polarograficzną. W oparciu o wykonane wcześniej [5–7] doświadczenia, dotyczące elektrochemicznej redukcji i ilościowego oznaczania niektórych barwników spożywczych, dokonano polarograficznej analizy badanych eluatów.

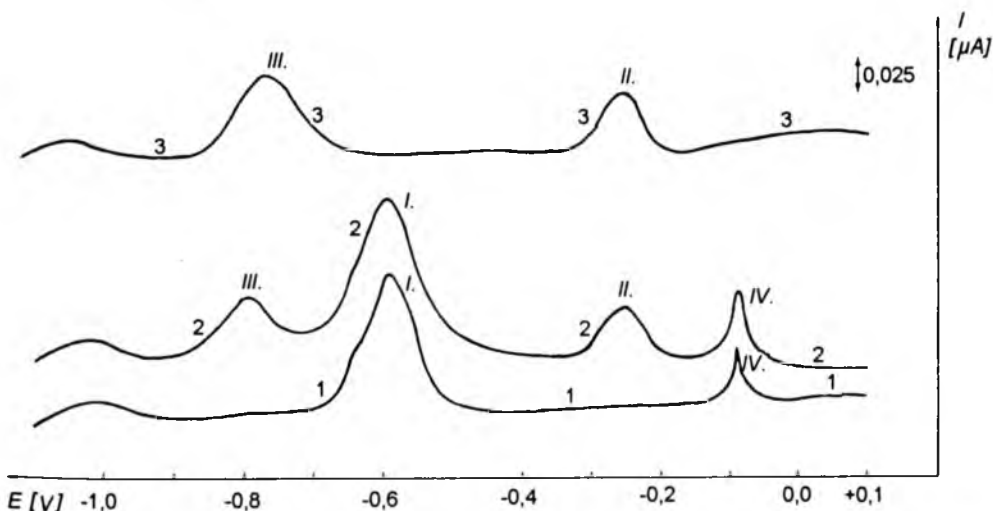
Na ryc. 3 przedstawiono przykładowe krzywe polarograficzne otrzymane dla galaretek produkcji czeskiej. Na krzywych 1 i 2 odpowiadającym polarogramom próbek galaretek czerwonej i brązowej widoczne są fale redukcji barwnika (fala I) przy potencjale $E_p = -0,60$ V. Pik ten przypisano czerwieni koszenilowej, opierając się na wcześniejszych naszych badaniach procesu redukcji tego barwnika [7]. W pracy tej uwzględniliśmy również szczegółową analizę zależności wielkości prądu (i) pików polarograficznych od stężenia (c) barwnika oraz podano równania regresji zależności $i = f(c)$. Na podstawie tych danych obliczono zawartość czerwieni koszenilowej w obu próbkach galaretek produkcji czeskiej. W galaretkę o barwie czerwonej wynosi ona $62,5$ mg/kg, a o barwie brązowej – 59 mg/kg. Na krzywej polarograficznej 2 (ryc. 2) występują dodatkowo: fala II przy potencjale $E_p = -0,26$ V i fala III przy potencjale $E_p = -0,77$ V. Porównano potencjały obu tych fal z krzywą 3, która przedstawia polarogram wzorcowego roztworu indygotyny zarejestrowany w tych samych warunkach (elektrolitem podstawowym był bufor *Brittona-Robinsona*, a $\text{pH} = 6,59$).

Tabela V. Zestawienie końcowych wyników badań barwników zawartych w badanych galaretkach żelatynowych.

Comparison of end-results of the study of colours present in gelatine jellies.

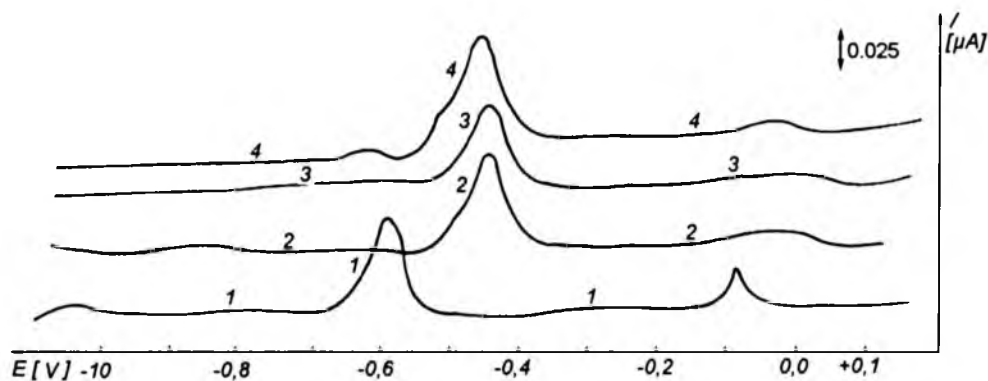
Lp.	Badana galaretka		Wykryty barwnik	Zawartość barwnika określona metodą (mg/kg)	
	Producent	Barwa		spektrofotometryczną	polarograficzną
1	Czechy	czerwona	czerwień koszenilowa	64,6	61,5
		żółta	tartrazyna	46,5	44,8
		brązowa	czerwień koszenilowa	60,4	58,6
			indygotyna	9,3	10,0
		zielona	tartrazyna	15,7	15,5
			indygotyna	3,6	3,5
			czerwona	czerwień koszenilowa	29,7
2	Polska	seledynowa	tartrazyna	13,9	12,1
		żółta	tartrazyna	8,9	7,5
		pomarańczowa	tartrazyna	19,6	18,0
			czerwień koszenilowa	6,3	6,0

Stwierdzono, że próbka druga o barwie brązowej oprócz czerwieni koszenilowej zawiera także dodatek indygotyny. Widoczna na krzywych 1 i 2 mała przedfała (IV) jest falą adsorpcji czerwieni koszenilowej na elektrodzie rtęciowej [7].



Ryc. 3. Polarogramy roztworów eluatów zawierających barwniki wyeluuowane z próbek galaretek czeskich; 1 – galaretka o barwie czerwonej, 2 – galaretka o barwie brązowej, 3 – wzorcowy roztwór indygotyny o stężeniu $c = 0,4 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$. Elektrolit podstawowy: bufor Brittona-Robinsona o pH = 6,59; czułość aparatu – $0,025 \mu\text{A/cm}$; temp. 20°C .

Polarograms of eluate solutions containing colours eluted from samples of Czech jellies; 1 – red jelly, 2 – brown jelly, 3 – standard indigo solution of concentration $c = 0,4 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$. Basal electrolyte: Britton-Robinson buffer pH 6.59, unit sensitivity $0.025 \mu\text{A/cm}$, temper. 20°C .



Ryc. 4. Polarogramy roztworów eluatów zawierających barwniki wyeluowane z próbek galaretek polskich; 1 – galaretka o barwie czerwonej, 2 – galaretka o barwie seledynowej, 3 – galaretka o barwie żółtej, 4 – galaretka o barwie pomarańczowej; Elektrolit podstawowy: bufor *Brittona-Robinsona* o pH = 6,05; czułość aparatu 0,025 μA ; temp. 20°C.

Polarograms of eluate solutions containing colours elued from samples of Polish jellies: 1 – red jelly, 2 – celadon jelly, 3 – yellow jelly, 4 – orange jelly, Basal electrolyte: *Britton-Robinson* buffer pH 6.05; unit sensitivity 0.025 μA , temp. 20°C

W omawianych wyżej próbkach galaretek czeskich nie stwierdzono obecności erytrozyny. W warunkach jakie zastosowano w doświadczeniu (pH = 6,59) potencjał redukcji erytrozyny B wynosi $-0,125\text{ V}$, a erytrozyny Y $-0,100\text{ V}$.

Na ryc. 4 pokazano polarogramy próbek galaretek polskich. W próbkach o odcieniu żółtym zawarty barwnik zidentyfikowany został jako tartrazyna. Potencjał półfali polarograficznej tartrazyny przy pH = 6,09 wynosi $-0,46\text{ V}$. Z rysunku widać wyraźnie, że określona zawartość barwnika w tych próbkach jest zróżnicowana.

Aktualnie prowadzone są w naszym Zespole doświadczalne badania dotyczące procesu elektrochemicznej redukcji tartrazyny na elektrodzie rtęciowej. Zawartość tego barwnika w badanych próbkach określono metodą dodatku wzorca. Otrzymane wyniki podane są w tabeli V. Wyniki otrzymane obiema metodami, zarówno spektrofotometryczną jak i polarograficzną są ze sobą zgodne.

Poziom barwników w badanych galaretkach nie przekracza wartości dopuszczonych w Zarządzeniu MZiOS [12]. W galaretkach i deserach żelujących wynosi on 100 mg/kg. Galaretki czeskie są mocniej barwione; zawierają one około dwukrotnie większą ilość barwników niż galaretki polskie. W czeskich galaretkach użyto najwięcej czerwieni koszenilowej, około 60 mg/kg w próbkach czerwonych i brązowych. Najmniej użyto indygotyny, bo tylko 3–10 mg/kg. W produkcji galaretek polskich użyto tylko dwóch barwników: tartrazynę i czerwień koszenilową.

Badania nasze wykonane trzema opisanymi wyżej metodami wykluczyły obecność erytrozyny i żółci pomarańczowej deklarowanych na opakowaniach galaretek czeskich.

WNIOSKI

1. Opisana w pracy chromatograficzna metoda elucji barwników ze stałych środków spożywczych pozwala na szybkie wydzielenie i rozróżnienie barwników naturalnych lub syntetycznych.

2. Badania wykonane trzema metodami: chromatograficzną, spektrofotometryczną i polarograficzną umożliwiły pełną identyfikację i określenie ilości barwników syntetycznych zawartych w próbkach barwionych galaretek pochodzących z trzech różnych krajów.

Masłowska J., Janiak J.

STUDY OF CONTENTS OF SYNTHETIC FOOD DYES IN GELATINE JELLIES

Summary

Methods of identification and quantitative determination of synthetic dyes in gelatine jellies have been described. Extraction and isolation procedures of synthetic food dyes have been developed specifically for gelatine products. The various techniques have been used as follows: paper chromatography, absorption spectrophotometry and polarography. Tartrazine, Cochineal Red and Indigotin in amounts permitted by Polish legislation have been determined.

PIŚMIENNICTWO

1. *Andrzejewska E.*: Metoda określania najmniejszej dopuszczalnej ilości barwników syntetycznych w środkach spożywczych, których barwienie jest dozwolone. *Roczn. PZH*, 1974, 1, 47.
- 2. *Irons R.D., Gross E.A., White E.I.*: Aniline: Evidence for an enterogastric cycle in the rat. *Fd Cosmet. Toxicol.* 1980, 18, 393.
- 3. *Masłowska J., Janiak J.*: Badanie właściwości kwasowo-zasadowych podstawowych barwników spożywczych. *Przem. spoż.* 1983, 18 (6), 274.
- 4. *Masłowska J., Janiak J.*: Oddziaływanie jonów Fe (II) i Fe (III) z czernią niebieskawą i czerwienią kosenilową. *Technologia i Chemia Spożywcza, Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej* 1987, 40, 47.
- 5. *Masłowska J., Janiak J.*: Polarographic studies on Brilliant Black BN. *Dtsch. Lebens.-Rundsch.* 1988, 5, 151.
- 6. *Masłowska J., Janiak J.*: Studies on electrochemical reductions of the food dye Cochineal Red. *Dtsch. Lebens.-Rundsch.* 1991, 4, 114.
- 8. *Masłowska J., Janiak J.*: Polarographic and spectrophotometric studies of the food dye erithrosine. *Dtsch. Lebens. Rundsch.* 1994, 90, 385.
- 9. *Nikonorow M., Urbanek-Karłowska B.*: Toksykologia żywności, PZWŁ, Warszawa 1987.
- 10. *Sadowska H.*: Bezpieczna żywność i żywienie. LSW, Warszawa 1985.
11. *Venkataraman K.*: The Analytical Chemistry of Synthetic Dyes. *Wiley A.*: Interscience Publication, New York 1977.
- 12. Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dn. 31.03.1993, *Monitor Polski* nr 22/93.

Dn. 1994.01.20

90-924 Łódź, ul. B. Stefanowskiego 4/10