



Pracownia studencka  
**Katedry Analizy Środowiska**

# **Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych**

**Ćwiczenie nr 6**

**OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU  
BENZOESOWEGO W NAPOJU  
BEZALKOHOLOWYM METODĄ  
MIARECZKOWANIA**

**Analiza żywności**

# I. Część teoretyczna

## 1. Wprowadzenie

Dodatki do żywności stosuje się w celu podniesienia jej walorów smakowych, zwiększenia trwałości, ułatwienia procesów wytwarzania a niejednokrotnie zwiększenia atrakcyjności wyglądu zewnętrznego. Już w starożytnym Egipcie stosowano ditlenek siarki (obecnie E 220) i kwas octowy (E 260) jako środki konserwujące, saletrę – azotan(III) sodu (E 250) do peklowania mięsa, a kurkumę (E 100) i koszenilę (E 120), jako barwniki do żywności. Od końca XVIII wieku notuje się istotne zmiany i postęp w sposobach konserwowania żywności w związku z rozwojem nauk przyrodniczych. Dzięki pracom Pasteura poznano przyczyny psucia się żywności, a w wyniku rozwoju syntezy chemicznej pojawiły się nowe związki, których działanie zapobiegało rozwojowi drobnoustrojów. W końcu XIX w. wprowadzono jako konserwant kwas mrówkowy (E 236), a na początku XX w. kwas benzoowy (E 210) i ich sole. Jednakże przydatność technologiczna i zdrowotna obu tych związków oraz ich pochodnych nie była zadowalająca. Poszukiwano więc nowych substancji, z których najbardziej przydatne i do dziś stosowane to estry kwasu *p*-hydrobenzoowego (E 214 – E 219), wprowadzone na rynek w latach dwudziestych XX wieku. W latach trzydziestych XX w. wprowadzono sole kwasu propionowego (E 280), a w pięćdziesiątych kwas sorbowy (E 200) i jego sól potasową, których stosowanie zgodnie z ustaleniami Organizacji Narodów Zjednoczonych w ramach Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oraz Światowej Organizacji Rolnictwa i Żywności (FAO) budzi najmniej zastrzeżeń toksykologicznych. W początkach XIX wieku dzięki rozwojowi syntezy organicznej uzyskano wiele substancji barwiących, które spowodowały gwałtowny rozwój ówczesnego przemysłu tekstylnego. Próby ich zastosowania w celu zwiększenia atrakcyjności produktów spożywczych, najczęściej dawały negatywne efekty: występowały zatrucia i w związku z tym wzrosła obawa przed stosowaniem jakichkolwiek dodatków chemicznych do żywności. Dopiero dalszy rozwój chemii w XX wieku umożliwił syntezę barwników i aromatów, które są odpowiednikami substancji występujących w przyrodzie i nie budzą zastrzeżeń zdrowotnych.

Termin „dodatek do żywności” w języku polskim ma szersze znaczenie niż w języku angielskim, w którym odpowiadają mu pojęcia: *food additive*, *food ingredient* oraz *food constituent*. W systemie prawnym Unii Europejskiej uczyniono bardzo wiele w celu uporządkowania terminologii różnych gałęzi gospodarki, jednak w tym przypadku napotkano na poważne trudności; w uproszczony sposób można przyjąć:

- *food constituent* (składnik naturalny) jest to składnik produktu żywnościowego, który występuje w jego pierwotnym (naturalnym) składzie, np. skrobia jako składnik ziemniaka,
- *food ingredient* (dodatek uzupełniający) jest to substancja wprowadzana do żywności, która staje się częścią składową produktu –, np. mączka (skrobia) ziemniaczana dodana do pieczywa,
- *food additive* (dodatek technologiczny – funkcjonalny) jest to substancja, którą wprowadza się do żywności w celach technologicznych, w tym organoleptycznych, zazwyczaj sama niespożywana jako żywność i niestosowana jako typowy jej składnik. Tę grupę dodatków objęto ścisłą kontrolą, a poszczególne dodatki aprobowane przez komisję FAO/WHO oznaczono symbolem E.

## 2. Kategorie dodatków do żywności

Większość produktów żywnościowych dostępnych w obrocie handlowym zawiera dodatki do żywności, które są stosowane w celu:

- przedłużenia trwałości produktów, a więc ograniczenia lub zapobiegania niekorzystnym zmianom powodowanym przez drobnoustroje, enzymy tkankowe oraz abiotyczne procesy degradacyjne, np. utlenianie;
- zapobiegania niekorzystnym zmianom jakościowym powodującym zmiany barwy, smaku, zapachu, konsystencji,
- zwiększenia atrakcyjności konsumenckiej oraz ułatwienia stosowania lub wykorzystania produktu,
- ochrony składników odżywczych produktu (np.: witamin zwykle ulegającym szybkiej degradacji),
- utrzymania stałej i powtarzalnej jakości produktu,
- ułatwienia prowadzenia procesów produkcyjnych oraz zwiększania ich efektywności przez np.: zmniejszenie ubytków, energochłonności lub zwiększenie wydajności,
- otrzymywania nowych produktów, w tym dietetycznych np.: żywność o zmniejszonej lub zwiększonej kaloryczności (energii), zawartości cukru, białka, glutenu itd.

Technologiczną klasyfikację dodatków do żywności można uszeregować w czterech zasadniczych grupach, a w nich poszczególne kategorie zgodnie z określeniem funkcji przyjętych przez Unię Europejską (Tabela 1).

Tabela 1. Kategorie dodatków do żywności (wg Dyrektywy 89/10/EEC)

Zapobiegające zepsuciu	Sensoryczne	Teksturotwórcze	Pomocnicze
Konserwanty	Barwniki	Emulgatory	Enzymy
Kwasy	Nabłyszczające	Przeciwzbrylające	Gazy wypierające
Bufory	Kwaszące	Skrobie modyfikowane	Polepszacze mąki
Przeciwutleniacze	Słodziki	Spulchniające	Pianotwórcze
Sekwestranty (synergenty)	Wzmacniające smakowość	Stabilizatory	Przeciwpieniące
Stabilizatory	Aromaty	Zagęszczacze	Rozpuszczalniki
Gazy (atmosfera kontrolowana)		Zwiększające masę	
		Zwilżające	
		Żelujące	

### 2.1. Dodatki zapobiegające psuciu się żywności

Dodatki, które zapobiegają psuciu się żywności można podzielić na dwie zasadnicze grupy o zupełnie innym charakterze działania, a mianowicie na substancje, które zapobiegają zmianom powodowanym przez:

- **drobnoustroje**, czyli konserwanty, kwasy;
- **tlen z powietrza**, czyli przeciwutleniacze (antyoksydanty), synergenty, (Tabela 2).

Tabela 2. Dodatki zapobiegające psuciu się żywności

Zmiany powodowane przez:	Rodzaj dodatku	Funkcja dodatku
drobnoustroje	Kwasy	obniżenie pH, hamuje rozwój drobnoustrojów i aktywność enzymów
	Konserwanty	inaktywacja enzymów drobnoustrojów
tlen z powietrza	Przeciwutleniacze	zapobieganie tworzeniu nadtlenków
	Synergenty	wspomaganie przeciwutleniaczy przez kompleksowanie metali

**Konserwanty** mają na celu zmniejszenie, względnie całkowite zahamowanie procesów biologicznych powodowanych działaniem mikroflory lub enzymów tkankowych, które są odpowiedzialne za psucie się lub obniżanie jakości żywności. Konserwanty wpływają na procesy biochemiczne komórki przez:

- zmianę przepuszczalności ścian komórkowych lub błon cytoplazmatycznych,
- ingerencję w mechanizm genetyczny, np.: przez jego uszkodzenie,
- inaktywację niektórych enzymów np.: przez redukcyjne działanie siarczanów(IV) na wiązania disulfidowe lub inaktywowanie składników niezbędnych do rozwoju drobnoustrojów, np.: witamin, aminokwasów.

Wśród konserwantów stosowanych do utrwalania żywności, można wyróżnić dwie zasadnicze grupy: *antyseptyki* – związki syntetyczne o prostej budowie, mogące mieć swoje odpowiedniki w przyrodzie, zwykle stosuje się je w ilości poniżej 0,2%; *antybiotyki* – związki o skomplikowanej budowie, działające w bardzo małych dawkach (od kilku do kilkuset ppm). Efektywność działania konserwanta zależy od jego aktywności w stosunku do rodzaju drobnoustrojów, warunków środowiska, stężenia jonów wodorowych, temperatury, składu chemicznego produktów, obecności substancji zmniejszających aktywność wody. Szczególne znaczenie ma oddziaływanie pH środowiska: im niższe jest pH tym dodatki konserwujące o charakterze słabych kwasów lub soli słabych kwasów wykazują silniejsze działanie (najsilniej działają w stanie niezdisocjowanym, ze wzrostem pH wzrasta stopień ich dysocjacji). Kwasy: propionowy, sorbowy, octowy, hydroksybenzooesowy są trwałe przy pH = 4,5 i niższym, natomiast powyżej pH 6 szybko ulegają dysocjacji i zanika ich działanie konserwujące.

Efektywność działania poszczególnych środków konserwujących w stosunku do różnych grup drobnoustrojów jest różna. Najsilniejsze działanie bakteriobójcze i hamujące rozwój bakterii wykazują: azotany(III), siarczany(IV), kwas benzooesowy i jego sole. Na grzyby pleśniowe i drożdże silnie działają; kwas sorbowy, kwas benzooesowy oraz estry i sole sodowe i potasowe tych kwasów. Niektóre środki konserwujące wykazują wybiórcze działanie, np.: kwas propionowy i jego sole hamują rozwój *Bacillus subtilis*, który powoduje wady miękiszu chleba i pojawienie się obcego zapachu. Bardzo często do utrwalania produktu stosuje się dwa lub więcej dodatków, wykazujących efekt synergistyczny, dzięki czemu przy mniejszych dawkach poszczególnych konserwantów uzyskuje się podobny efekt. Konserwant przeznaczony do utrwalania żywności powinien:

- być nietoksyczny,
- łatwo ulegać metabolizmowi w organizmie człowieka i nie odkładać się w tkance tłuszczowej,

- cechować się niezawodnością działania i szerokim spektrum hamowania bakterii, drożdży i pleśni,
- być rozpuszczalny w wodzie (drobnoustroje rozwijają się w fazie wodnej produktu),
- być obojętny chemicznie wobec innych składników żywności,
- nie wpływać na cechy organoleptyczne produktu,
- być trwały i odporny na procesy technologiczne, którym jest poddawany produkt,
- być tani.

W Tabeli 3 przedstawiono krótką charakterystykę wybranych konserwantów dopuszczonych do stosowania w Polsce.

Tabela 3. Charakterystyka wybranych konserwantów dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa	Właściwości	Metabolizm w organizmie człowieka, działanie na organizm	ADI* [mg/kg m.c.]
1	2	3	4
<b>Kwas benzooesowy (E 210)</b>	Białe kryształy, bez zapachu, słabo rozpuszczalny w wodzie, dobrze w etanolu i eterze; w środowisku kwaśnym (pH 3-4,5) hamuje rozwój drożdży i pleśni, mniej skuteczny w stosunku do bakterii; działanie jego wspomaga obecność ditlenku siarki, soli, cukru oraz kwasu sorbowego i jego soli.	W przewodzie pokarmowym wchłania się szybko i jest wydalany z moczem, głównie w postaci kwasu hipurowego lub benzoiloglukuronidu, a częściowo w postaci wolnej. W większych dawkach może wywołać objawy zatrucia (wymioty, bóle głowy, alergię, uczucie drapania w gardle, podrażnienie nabłonka, zakwaszenie organizmu).	0 – 5
<b>Kwas sorbowy (E 200)</b>	Bezbarwne kryształy lub biały proszek o słabym zapachu i lekko kwaśnym smaku; dobrze rozpuszczalny w gorącej wodzie, etanolu i oleju; hamuje rozwój pleśni i drożdży (pH 3-6); obecność soli kuchennej, cukru, kwasu propionowego, nizinny i fosforanów zwiększa jego działanie konserwujące.	W organizmie człowieka ulega procesowi $\beta$ oksydacji, typowej dla kwasów tłuszczowych. jeden z bezpieczniejszych środków konserwujących, uznany za nietoksyczny dla organizmu człowieka.	0 – 25
Estry kwasu <i>p</i> -hydroksybenzooesowego: -etylowy (E214) -propylowy (E216)	Kryształy lub biały proszek, bez zapachu, trudno rozpuszczalne w wodzie, dobrze w etanolu; hamują rozwój pleśni, bakterii i drożdży (pH 3-6); odporne na działanie tlenu z powietrza oraz niskie i wysokie	Wchłaniają się szybko, ulegają hydrolizie w jelicie cienkim i są wydalane z moczem w postaci niezmiennionej lub w połączeniu z kwasem glukuronowym. Mogą	0 – 10

-metylowy (E218)	temperatury stosowane w przetwórstwie.	powodować miejscowe znieczulenie błony śluzowej jamy ustnej.	
<b>Ditlenek siarki (E 220)</b>	Bezbarwny, drażniący gaz, rozpuszczalny w wodzie i etanolu; skutecznie działa na bakterie i pleśnie, słabiej na drożdże (pH 1-6); posiada właściwości odkażające, wybielające, hamuje aktywność enzymów oksydoredukcyjnych (stabilizacja witaminy C); zapobiega enzymatycznemu i nieenzymatycznemu brunatnieniu oraz tworzeniu się nitrozoamin.	Może powodować podrażnienia przewodu pokarmowego oraz reakcje alergiczne; długotrwałe przyjmowanie, nawet w małych dawkach, obniża odporność organizmu.	0 – 0,7
<b>Nizyna (E 234)</b>	Antybiotyk o charakterze polipeptydu, wytwarzany przez szczepy bakterii kwasu mlekowego; nie jest stosowana w lecznictwie; jest skuteczna tylko wobec bakterii Gram-dodatnich; przeciwdziała fermentacji masłowej w serach.	Jest całkowicie rozkładana przez trypsynę. Jest bezpiecznym związkiem; w badaniach na zwierzętach nie stwierdzono wpływu na mikroflorę przewodu pokarmowego i działania alergicznego.	0 – 33 tys. Jednostek/kg m.c.
<b>Azotany (III): azotan potasu (E249); azotan sodu (E250) i azotany (V): azotan sodu (E251) i potasu (E252)</b>	Białe lub żółtawe kryształy, dobrze rozpuszczalne w wodzie; w połączeniu z solą i cukrem stanowią składnik mieszanek peklujących. Azotany (III) zapobiegają rozwojowi bakterii beztlenowych, a w szczególności laseczek zgorzeli ( <i>Clostridium perfringens</i> ) oraz <i>Clostridium botulinum</i> , wytwarzającego silną toksynę – jad kiełbasiany; działanie antibakteryjne azotanów (V) jest słabe i występuje dopiero po ich redukcji do azotanów (III).	W przewodzie pokarmowym azotany (III) mogą powodować nitrozowanie, dając N-nitrozozwiązki o silnym działaniu rakotwórczym; przenikają przez barierę krew-łożysko i wykazują działanie teratogenne; u małych dzieci mogą powodować hemoglobinemię – zaburzenia w wymianie tlenowej krwi.	5  0,2

\*ADI (dopuszczalne dzienne pobranie substancji konserwujących przez człowieka; z ang. *Acceptable Daily Intake*).

Zakres stosowania konserwantów jest stopniowo ograniczany przez rozwój fizycznych metod utrwalania, np.: niskie temperatury, naświetlanie nadfioletem, atmosfera kontrolowana, sterylizacja, stosowanie technologii aseptycznych oraz wprowadzenie procedur analizy zagrożeń i końcowej kontroli jakości HACCP(ang. *Hazard Analysis and Critical Control*

*Point*), które mają na celu zapewnienie czystości higienicznej produktów spożywczych przeznaczonych dla konsumentów. HACCP jest systemowym postępowaniem mającym na celu identyfikację i oszacowanie skali zagrożeń bezpieczeństwa żywności, z punktu widzenia jej jakości zdrowotnej oraz ryzyka wystąpienia tych zagrożeń podczas przebiegu wszystkich etapów produkcji i dystrybucji.

**Przeciwutleniacze** służą do zapobiegania procesom utleniania pod wpływem tlenu z powietrza w dwóch procesach oksydacyjnych:

- *utlenianiu tłuszczów* – proces zwany potocznie jełczeniem, jest główną przyczyną psucia się produktów tłuszczowych (smalec, olej) oraz żywności o silnie rozwiniętej powierzchni, pomimo niewielkiej zawartości tłuszczu, np.: mąka i proszek mleczny,
- *utlenianiu substancji nietłuszczowych* – mogą mieć charakter reakcji nieenzymatycznych lub przebiegać przy udziale enzymów (oksydazy  $\alpha$ -fenolowej i askorbinooksydazy); temu zjawisku zapobiega się, stosując termiczną inaktywację enzymów (np.: blanszowanie owoców i warzyw) lub niektóre przeciwutleniacze – szczególnie kwas L-askorbinowy i jego sole oraz tokoferole.

W celu zahamowania procesu utleniania się składników żywności w praktyce stosuje się różne zabiegi, np.: pakowanie produktów podpróżnią, w atmosferze gazu obojętnego (azotu). Dla wielu produktów jest to niewystarczające i w tych przypadkach zapobiega się utlenieniu, stosując dodatki przeciwutleniaczy naturalnych lub syntetycznych bądź synergentów.

**Przeciwutleniacze syntetyczne** to przede wszystkim estry: propylowy (E 310), oktylowy (E 311) i dodecylowy (E 312) kwasu galusowego oraz BHA czyli butylo-hydroksy-anizol (E319) i BHT butylo-hydroksy-toluen (E 320). Używane są do utrwalania tłuszczów smażalniczych oraz utrwalenia smażonego produktu na zasadzie efektu „przeniesienia” (ang. carry through) działania przeciwutleniacza z oleju smażalniczego na smażony produkt (szczególne znaczenie przy produkcji, np.: chipsów, frytek, pączków).

**Przeciwutleniacze naturalne** to występujące w olejach roślinnych tokoferole (E 306) – najaktywniejsze działanie przeciwutleniające wykazuje  $\delta$ -tokoferol (E 308). W przyrodzie ich obecność zapobiega nie tylko jełczeniu nienasyconych kwasów tłuszczowych, chroni również przed utlenieniem inne substancje np. związki aromatyczne. Do naturalnych przeciwutleniaczy zalicza się także flawonoidy i fenylokwasy, które występują w owocach, liściach, nasionach, przyprawach (szałwia, rozmaryn, oregano, tymianek). Próby zastępowania przeciwutleniaczy syntetycznych naturalnymi nie znalazły dotychczas większego zastosowania. Zwiększenie aktywności wielu przeciwutleniaczy uzyskuje się przez



współdziałanie synergiczne dwóch i więcej związków np.: kwas L-askorbinowy + tokoferole. Substancje o charakterze przeciwutleniającym mogą powstawać również w czasie procesów przetwórczych, np.: polifenole powstające w procesie wędzenia, S-nitrozocysteina powstająca podczas peklowania oraz produkty nieenzymatycznego brunatnienia, które tworzą się w wyniku reakcji Maillarda. **Reakcja Maillarda** nie jest reakcją pojedynczą, lecz ich złożoną serią pomiędzy aminokwasami i cukrami redukującymi, zwykle zachodzącą w podwyższonej temperaturze. Grupa karbonylowa węglowodanu reaguje z grupą aminową aminokwasu, tworząc wodę i związki typu N-podstawionej glukozyloaminy, która następnie, w warunkach reakcji, rozpada się do mniejszych cząsteczek, zawierających reaktywne ugrupowanie O=C-C-N. Atomy azotu i węgla karbonylowego tych cząsteczek mogą się następnie wzajemnie sprzęgać, tworząc związki heterocykliczne, np. pirazyny z wbudowanym atomem azotem, najczęściej obdarzone intensywnym, zapachem, charakterystycznym dla krakersów, chleba, orzeszków lub sera.

**Synergenty** wspomagają i przedłużają działanie przeciwutleniaczy. Ich rola polega na aktywowaniu funkcji przeciwutleniacza i kompleksowaniu jonów metali ciężkich, które katalizują procesy utleniania. Synergenty tworzą trwałe kompleksy z jonami metali, tzw. chelaty. Najważniejsze z nich to wersenian wapniowo-sodowy EDTA (E 385), kwasy: cytrynowy, winowy, jabłkowy oraz difosforany(V), aminokwasy i peptydy.

## 2.2. Dodatki kształtujące cechy sensoryczne

Opinię konsumenta o produkcie kształtują jego cechy wizualne, a więc forma i barwa, jednak na ostateczną ocenę wpływa przede wszystkim smak, zapach i tekstura użytkowa. Obecnie, bardzo popularne stało się stosowanie dodatków barwiących i smakowo-zapachowych, które wpływają na atrakcyjność różnorodnych produktów żywnościowych. Istotnym postępowaniem w tej grupie dodatków jest stosowanie, w coraz większym stopniu, do ich wyrobu surowców naturalnych oraz synteza dodatków, których właściwości są identyczne z naturalnymi.

**Barwniki.** Barwa zachęca lub zniechęca do spożycia, sugeruje odczucie pewnych smaków i zapachów, ostrzega przed spożyciem produktu zepsutego. Żywność barwi się w celu:

- nadania barwy produktom bezbarwnym, np.: napoje orzeźwiające,
- nadania lub wzmocnienia barwy produktów, np.: cukierki, napoje, desery,
- odtworzenia pierwotnej barwy, gdy nastąpiła degradacja barwników podczas przerobu, np.: kompoty,

- wyrównania i zapewnienia takiej samej barwy wszystkim partiom produktu, np.: sosy,
- nadania intensywnej barwy produktom przeznaczonym do rozcieńczenia, np.: syropy, zaprawy owocowe do jogurtów.

Do produktów, których nie wolno barwić należą: żywność nieprzetworzona, woda, chleb, soki owocowe, dżemy, mleko, śmietana, twaróg, sery, olej, mięso i ryby, przetwory z jaj, kakao, czekolada, kawa, herbata, miód.

Do barwienia stosuje się:

- barwiące części roślin jadalnych,
- barwniki organiczne naturalne,
- barwniki organiczne syntetyczne identyczne z naturalnymi,
- barwniki organiczne syntetyczne,
- barwniki nieorganiczne (pigmenty).

**Barwniki naturalne.** Największą akceptacją konsumentów cieszą się barwniki naturalne roślinne: karotenoidy otrzymywane z nasion drzewa tropikalnego, suszonej marchwi, niektórych glonów morskich lub skórki owoców cytrusowych; flawonoidy otrzymywane z wyciśniętego czerwonych winogron, czarnych porzeczek, żurawin, aronii lub czarnego bzu; betalainy otrzymywane z soku buraka ćwikłowego; porfiryny (chlorofile) otrzymywane z zielonych części roślin. Ze względu na budowę chemiczną barwniki występujące w naturze łatwo ulegają degradacji (głównie reakcji utleniania) w czasie przetwarzania i przechowywania (działanie tlenu, światła, temperatury, pH), co ogranicza możliwość ich zastosowania w produktach trwałych. Większe zastosowanie znajdują preparaty barwników naturalnych oraz barwniki syntetyczne identyczne z naturalnymi z grupy karotenoidów i ksantofili. Preparaty barwników naturalnych występują jako roztwory wodne lub olejowe, emulsje, zawiesiny, preparaty suche lub na nośnikach (np. na maltodekstrynie) oraz mikrokapsułkowane. Do najważniejszych należą: kurkuma, koszenila, kompleksy miedziowe chlorofilu i chlorofiliny, anatto, betanina, kapsorubina, astaksantyna, luteinina i karmele. Barwniki otrzymane w procesie syntezy, identyczne z naturalnymi to: ryboflawina,  $\beta$ -karoten, kantaksantyna.

**Syntetyczne barwniki organiczne.** Do barwienia żywności stosuje się głównie związki mono- i diazowe. Ich zaletą jest niska cena, trwałość i odporność na warunki środowiska oraz jednorodność chemiczna. Występują w postaci: proszku i granulatu (88 - 93 % czystego barwnika), past (4 - 10 % czystego barwnika), roztworów wodnych (1 - 6 % czystego barwnika). W zależności od budowy chemicznej sklasyfikowano je wg tzw. indeksu barwy. Do najczęściej stosowanych należą barwniki żółte i czerwone (tetrazyna, żółcień chinolinowa,

azorubina, czerwień koszenilowa, czerwień Allura), rzadziej niebieskozielone (błękit patentowy, indygotyna, zieleń trwała) oraz brązowe i czarne. Wykorzystuje się je głównie w przemyśle cukierniczym, napojów orzeźwiających i alkoholowych, koncentratów spożywczych.

**Barwniki nieorganiczne.** Stosuje się je bardzo rzadko w barwieniu żywności, zwykle do powierzchniowego barwienia polew cukierniczych (węglan wapnia, ditlenek tytanu, tlenki żelaza, sadza) oraz nadawania efektów metalicznych (pył aluminium i srebra lub płatki złota).

### 2.3. Dodatki smakowo-zapachowe

Dodatki służące do wzmacniania lub nadawania określonego smaku i zapachu produktom żywnościowym mają różny charakter. Są to:

- przyprawy naturalne,
- aromaty naturalne i syntetyczne identyczne z naturalnymi,
- esencje spożywcze,
- aromaty syntetyczne,
- substancje wzmacniające smak,
- syntetyczne substancje słodzące.

**Przyprawy naturalne** otrzymuje się z suszonych, jadalnych surowców roślinnych, głównie ziół (korzenie imbiru i selera, cebula i czosnek, liście majeranku i estragonu, kwiaty kaparów i szafranu, owoce papryki i kardamonu, nasiona kminku i kopru, kora cynamonu i wiele innych pochodzących głównie ze strefy krajów tropikalnych. Stosuje się je głównie w wyrobie drobno rozdrobnionych przetworów mięsnych, żywności orientalnej i barowej, koncentratów obiadowych, żywności niskotłuszczowej i wegetariańskiej.

**Aromaty naturalne i syntetyczne identyczne z naturalnymi.** Specyficznym dodatkiem smakowo-zapachowym jest koncentrat dymu wędzarniczego stosowany do aromatyzacji przetworów mięsnych i rybnych, serów, whisky i specjalnych gatunków piwa. Otrzymuje się go metodą suchej destylacji drewna (700 °C) i pirolizy drewna przegrzaną parą wodną. Kondensat dymu po usunięciu składników szkodliwych dla zdrowia jest ciekłą mieszaniną aromatycznych substancji smakowych głównie polifenoli (jest stosowany jako 2% emulsja lub 1% roztwór żelatyny przez rozpylenie w komorach wędzarniczych, zanurzenie lub natryskiwanie). Aromaty syntetyczne identyczne z naturalnymi otrzymuje się na drodze syntezy chemicznej, zwykle produktami takiej syntezy jest mieszanina izomerów (mieszanina racemiczna). Walory smakowe aromatów identycznych z naturalnymi są zbliżone do aromatów naturalnych, a ich dodatkową zaletą jest niska cena. Do tej grupy zalicza się

również aromaty otrzymane metodami biotechnologicznymi, np.: z hodowli tkankowych, przez działanie enzymów na prekursorów aromatów lub otrzymywane przez wybrane szczepy drobnoustrojów z odpowiednio dobranych składników płynów hodowlanych, tzw. **biosynteza de novo**.

*Esencje spożywcze* są to aromaty naturalne lub ich mieszaniny z aromatami syntetycznymi w roztworze alkoholu etylowego lub oleju, stąd też wyróżniamy:

- esencje etanolowodne, np.: anyżowa, cytrynowa, ananasowa, wiśniowa czy pomarańczowa,
- oleoesencje, czyli esencje spożywcze w oleju roślinnym, np.: cytrynowa, arakowa lub rumowa.

*Aromaty syntetyczne* otrzymuje się na drodze syntezy organicznej lub biosyntezy. Wśród aromatów syntetycznych największą grupę stanowią alkohole, estry, aldehydy oraz izomery związków naturalnych (Tabela 4). Wiele z nich ma struktury terpenowe. Metodami biosyntezy uzyskano m.in. wanilinę, antranilan metylu, kwas 2-metylomasłowy. Zastosowanie aromatów syntetycznych w produkcji żywności wymaga zezwolenia służby zdrowia, wyjątkiem jest wanilina i etylowanilina.

Tabela 3. Przykłady syntetycznych aromatów stosowanych do żywności

Związek chemiczny	Typ aromatu	Związek chemiczny	Typ aromatu
Aldehyd benzoowy	gorzkich migdałów	Maślan amylu	bananowy
Benzoesan etylu	anyżowy	Mrówczan izomylu	śliwkowy
Cykloheksanopropionian		Mrówczan etylu	rumowy
allilu	poziomkowy	Octan izobutyłu	ananasowy
Furfural	świeżego chleba	Octan geranylu	agrestowy
Geraniol	morelowy	Izowalerian izoamylu	jabłkowy
Kwas masłowy	maślano-serowy		

*Syntetyczne substancje smakowe* są to głównie zamienniki cukru, czyli tzw. słodziki i ich mieszanki o bardzo dużej intensywności słodzenia, które mają profil słodkości zbliżony do cukru. Są one pomocne przy tworzeniu żywności niskoenergetycznej (napoje orzeźwiające, jogurty, desery, lody, soki, przetwory owocowe, płatki śniadaniowe). Wrażenie słodkości produktów niskoenergetycznych (niskokalorycznych) uzyskuje się, stosując polihydroksylowe alkohole cukrowe zwane alditolami, których słodkość jest mniejsza od sacharozy np. często używany mannitol (E 965i) – ma słodkość 0,6-0,9 w stosunku do sacharozy (jest zwykle dodawany do napojów bezalkoholowych, ciast, wyrobów

cukierniczych). Syntetyczne, gorzkie dodatki smakowe to pochodne chininy, stosowane w napojach typu „tonic”.

**Substancje wzmacniające smak** lub przedłużające czas trwania wrażeń smakowych nazywa się również wzmacniaczami smaku. Wiele z nich nie ma smaku, lub jest on słabo wyczuwalny. Przypisuje się im właściwości otwierania kubków (receptorów) smakowych języka. Są to głównie pochodne kwasu glutaminowego (E 620), nukleotydy kwasu guanylowego (E 626) i inozynowego (E 630) oraz rybonukleotydy (E 634), które dodane do potraw o pH 5-8, szczególnie mięsnych, rybnych, warzywnych oraz zup wzmacniają naturalną smakowitość, nadając jej specyficzny charakter tzw. umami. Wbrew powszechnemu przekonaniu odczuwamy nie cztery, a pięć smaków. Ten ostatni to umami - co z japońskiego tłumaczy się jako "dobry, pełny, mięsny". Bezpośrednio wykrywaną substancją jest jeden z aminokwasów - kwas glutaminowy, który obficie występuje w pokarmach bogatych w białko takich jak: mięso, potrawy sfermentowane i zleżałe (sery parmezan, roquefort), wodorosty, sosy rybne i sojowe, a także pomidory, orzechy, winogrona, brokuły i grzyby. W kuchni azjatyckiej jako przyprawa odpowiadająca temu smakowi jest wykorzystywany glutaminian sodu. Umami odkrył w 1908 r. Kikunae Ikeda z Cesarskiego Uniwersytetu w Tokio, a jego istnienie zostało potwierdzone w 2000 roku.

### 2.3. Dodatki kształtujące cechy fizyczne żywności

Dodatki kształtujące cechy fizyczne żywności pełnią różne funkcje w technologii. Podstawowym celem ich stosowania jest uzyskanie optymalnej i trwałej tekstury produktu, co często wiąże się z uzyskaniem większej jego wydajności.

**Substancje żelujące i zagęszczacze.** Do tej grupy zaliczamy przede wszystkim hydrokoloidy (biopolimery) – związki o dużej masie cząsteczkowej, rozpuszczalne w wodzie lub tworzące w niej zawiesiny. Zwiększają lepkość roztworów lub tworzą żele, często wykazują również właściwości emulgujące i stabilizujące.

W zależności od pochodzenia można je podzielić na:

- naturalne:
  - wydzieliny roślin, np.: guma arabska (E 414), tragakant (E 413), karaya (E 416), guar (E 412), tara (E 417),
  - składniki roślin wyższych w postaci ekstraktu np.: pektyna (E 440) lub wyizolowanego składnika, np.: skrobia, mączka chleba świętojańskiego (E 410),
  - składniki wodorostów, np.: agar (E 406), alginiany (E 401-405), karagen (E 407),
  - produkty pochodzenia zwierzęcego, np. żelatyna,

- - substancje wytwarzane przez drobnoustroje, np.: dekstran, ksantan, kurdlan.
- surowce roślinne modyfikowane metodami chemicznymi i fizycznymi, jak np.: pochodne celulozy, pektyna amidowana, skrobie modyfikowane.
- syntetyczne np.: poli-*N*-winylopirolidon (PVP).

**Hydrokoloidy** mają największe znaczenie w grupie dodatków strukturotwórczych. Dzięki dużej cząsteczce tworzą w układach wodnych trójwymiarową sieć, co powoduje zwiększenie lepkości roztworu, lepsze wiązanie wody, a w odpowiednim stężeniu tworzą żele lub gąbczastą masę. Hydrokoloidy (z wyjątkiem żelatyny) są pochodzenia roślinnego lub mikrobiologicznego i należą do polisacharydów. W zależności od budowy chemicznej i warunków tworzą żele o różnych właściwościach, np.: wysokometylowana pektyna w celu utworzenia prawidłowego żelu wymaga dużej zawartości substancji wiążącej wodę (sacharozy) i kwaśnego środowiska, natomiast niskometylowana pektyna i alginiany, tworzą żel w obecności jonów metali wielowartościowych, a karageny wymagają jonów potasowych. Zmieszanie dwóch lub więcej koloidów umożliwia uzyskanie układów o nowych właściwościach lub dzięki synergizmowi zwiększenie ich efektywności. Na przykład ksantyn oraz mączka chleba świętojańskiego same nie tworzą żeli, natomiast ich mieszanina tworzy żel, elastyczny i sprężysty, odporny na zrywanie. Na efekt działania hydrokoloidów duży wpływ mają również warunki procesu technologicznego: temperatura, sposób wprowadzania i kolejność rozpuszczania składników, obecność jonów metali. Dla uzyskania powtarzalności cech produktu konieczne jest przeprowadzanie poszczególnych czynności zawsze w ten sam sposób. Hydrokoloidy stosuje się niemal we wszystkich działach produkcji żywności, a szczególnie do wytwarzania deserów, budyniu, kisielei (żelowanie), zup i sosów w proszku (wiązanie wody), lepszego wiązania wody przez ciasto i nadawania lepszej struktury i trwałości pieczywa, wyrobu cukierków, galaretek, marmoladek, kremów, zapobiegania krystalizacji cukru w syropach i lodach, lepszego wiązania wody, nadania struktury przetworom i napojom owocowym oraz warzywnym, zapobieganie rozwarstwianiu się sosów, majonezów itp.

**Emulgatory i stabilizatory.** Emulgatory są to substancje powierzchniowo czynne, których cząsteczki mają grupy hydro- i lipofilowe. Są one absorbowane na granicy faz emulsji oleju i wody. Najbardziej typową emulsją, gdzie olej jest rozproszony w wodzie (o/w) jest majonez, a odwrotnie w margarynie czy maśle – woda jest rozproszona w fazie tłuszczowej (w/o). efektywność emulgatorów wspomagają stabilizatory, najczęściej są nimi hydrokoloidy, które, tworząc usieciowania w fazie wodnej, zapobiegają migracji fazy

olejowej, jej zlewaniu i wydzielaniu się. Emulgatory są stosowane do wyrobu wielu produktów żywnościowych, jak np.: przetworów tłuszczowych, jogurtów, deserów, lodów, pieczywa, a nawet rozdrobnionych przetworów mięsnych. Najczęściej używanymi emulgatorami są mono- i diacyloglicerole (E471), estry mono- i diacylogliceroli z kwasami organicznymi, a z emulgatorów naturalnych – lecytyna.

### 2.3. Dodatki skrobiowe i białkowe

Oprócz typowych dodatków kształtujących cechy sensoryczne i fizyczne żywności duże znaczenie ma grupa dodatków o wszechstronnej użyteczności. Są to:

- skrobie modyfikowane chemicznie (E 1410 do 1451),
- preparaty z białek roślinnych i mlecznych,
- dodatki balastowe, zwane również wypełniaczami, związane z rozwojem produkcji żywności o obniżonej wartości energetycznej, pochodne skrobi i celulozy.

Ich wartość użytkowa zależy od charakteru surowca oraz rodzaju i stopnia modyfikacji. Stosuje się je w celu tworzenia odpowiedniej tekstury produktu i trwałego związania wody. Mają one również pośredni lub bezpośredni wpływ na podniesienie wartości odżywczej albo obniżenie wartości energetycznej żywności.

**Skrobie modyfikowane.** W wyniku modyfikacji chemicznej skrobi ziemniaczanej lub kukurydzianej (depolimeryzacja kwasowa, utlenianie, sieciowanie, stabilizowanie przez estryfikację lub eteryfikację) otrzymuje się produkty o właściwościach podobnych do naturalnych hydrokoloidów. Powszechnie wykorzystuje się je w produkcji żywności ze względu na ich dużą odporność na degradację w środowisku kwaśnym (np. ketchup) oraz w czasie ogrzewania. Korzystne cechy fizyczne żeli i roztworów z dodatkiem skrobi modyfikowanych to odporność na zjawiska retrodegradacji i synerezy mrozonek. Do najczęściej stosowanych należą fosforany diskrobiowe, skrobie acetylowane, hydroksypropylowane i acetylowany adypinian diskrobiowy.

**Preparaty białkowe** o różnym stopniu oczyszczenia otrzymuje się z surowców roślinnych (soja) i zwierzęcych (mleko, ryby). Stosowanie preparatów białkowych w określonych produktach żywnościowych ma na celu:

- wzbogacanie produktów w białko, np.: chleba i żywności specjalnej,
- zapewnienie stałej i powtarzalnej jakości np.: smarowalność pasztetów,
- zmniejszenie strat technologicznych, np.: zmniejszenie ubytków termicznych wędlin oraz zwiększenie wydajności produktu,

- modelowanie składu i jakości produktów, np. obniżenie wartości energetycznej, zawartości tłuszczów (żywność dietetyczna),
- obniżenie kosztu wsadu surowcowego, np.: częściowe zastąpienie mięsa,
- wytwarzanie żywności przeznaczenia specjalnego, np.: odżywki dla niemowląt, żywność bezmleczna, preparaty odchudzające.

### 2.3. Dodatki o wartościach odżywczych

**Dodatek witamin i soli mineralnych** ma na celu przywrócenie poziomu składników istotnych dla racjonalnego żywienia utraconych podczas procesów przetwórczych. Natomiast zamierzone wzbogacanie żywności ma na celu zwiększenie zawartości składników istotnych w żywieniu człowieka lub nadanie substytutowi (np. margaryna), wartości odżywczej zbliżonej do substytutenta (np. masło).

Osobną grupę stanowią dodatki, których celem jest uzupełnienie lub wzbogacenie żywności w tzw. składniki deficytowe, bądź zwiększenie jej wartości odżywczej. Do tej grupy należy zaliczyć sole wapnia, potasu, magnezu, żelaza oraz witaminy, głównie A, B, C i D.

Zgodnie z regulacjami WHO ani witaminy, ani aminokwasy nie są traktowane jako dodatki *sensu stricto*. Wzbogacanie żywności tymi ‘dodatkami’ jest regulowane odrębnymi rozporządzeniami Ministra Zdrowia, a jej wytwarzanie odbywa się pod nadzorem władz sanitarnych. Dotyczy to szczególnie żywności tzw. prozdrowotnej, odżywek i żywności dietetycznej, w której dodatki wzbogacające stosuje się w celu pokrycia ich wzmożonego zapotrzebowania przez określone grupy konsumentów (dzieci, sportowcy, ludzie starsi).

Oprócz typowych ‘dodatków wzbogacających’ powstaje nowa grupa dodatków modyfikujących skład produktu w celu kształtowania jego zdrowotnych cech użytkowych. Są to dodatki obniżające wartość energetyczną produktu tzw. substancje balastowe, które wykorzystuje się w celu produkcji wyrobów dających odczucie sytości. Do tej grupy dodatków można zaliczyć dodatki modyfikujące skład żywności: preparaty białka mleka lub białka roślinnego w celu wzbogacenia produktu w białko czy zastąpienia glutenu w odżywkach; preparaty sojowe w żywności wegetarian, czy osób nietolerujących białka mleka.

### 2.3. Dodatki ułatwiające wyrób żywności

Dodatki ułatwiające wyrób żywności (zwane pomocniczymi dodatkami przetwórstwa) to niektóre substancje używane w celu ułatwienia przebiegu procesów przetwórczych lub wspomagające procesy technologiczne. W końcowych etapach przetwórstwa usuwa się je i nie występują jako składnik w gotowym produkcie (Tabela 4).



Tabela 4. Dodatki pomocnicze i ułatwiające wyrób

Rodzaj dodatku	Funkcja dodatku
Preparaty enzymatyczne	przyspieszają określone substancje biochemiczne
Polepszacze mąki	dodane do mąki lub ciasta polepszają ich jakość wypiekową
Spulchniacze	mieszaniny uwalniając CO <sub>2</sub> , powodują zwiększenie objętości ciasta
Nośniki	rozpuszczają, rozcieńczają, dyspergują dodatki w celu ułatwienia ich stosowania
Rozpuszczalniki	ciekłe lub gazowe służą do rozpuszczania
Gazy obojętne	tworzą atmosferę kontrolowaną w opakowaniach jednostkowych lub pomieszczeniach składowania żywności
Gazy wypierające	ułatwiają wypchnięcie ciekłego artykułu spożywczego z pojemnika i powodują uzyskanie odpowiedniej konsystencji (np. piana)
Substancje klarujące i filtrujące	oddzielają lub ułatwiają sedimentację bądź oddzielanie zawiesin występujących w cieczach (soki, wina, oleje)

### 3. Ocena toksykologiczna dodatków

W pierwszej połowie XX wieku, a szczególnie w latach międzywojennych podjęto pierwsze próby uregulowań prawnych dotyczących stosowania dodatków do żywności, korzystając z ówczesnego stanu badań toksykologicznych. Decydujące znaczenie w kształtowaniu bezpiecznej żywności miało ustanowienie wspólnej komisji FAO/WHO, która w latach pięćdziesiątych XX wieku ustaliła metody toksykologicznej oceny składników żywności i metody określania wartości dopuszczalnego dziennego pobrania substancji konserwujących przez człowieka ADI (ang. *Acceptable Daily Intake*). ADI jest to taka ilość substancji, która zgodnie z aktualnym stanem wiedzy może być pobierana przez całe życie, prawdopodobnie bez szkody dla zdrowia. Dawka ta wyrażana jest w mg na kg masy ciała człowieka na dobę (mg/kg m.c./dobę). Przy hipotetycznym ustalaniu wartości ADI jako wartość wyjściową, przyjmuje się maksymalną dawkę, która nie spowodowała jakichkolwiek zmian w czasie toksycznej ekspozycji przewlekłej (chronicznej) (badania najczęściej prowadzone na szczurach). Dzieli się ją przez 10, jako współczynnik bezpieczeństwa ekstrapolowania wyników ze zwierzęcia na człowieka i ponownie przez 10, aby uwzględnić wrażliwość poszczególnych osób (chorzy, kobiety ciężarne, dzieci). Określone wartości ADI mają duży margines bezpieczeństwa.

Badania toksykologiczne dodatków do żywności są kosztowne i długotrwałe. Proste badania toksykologiczne (toksyczność ostra), są prowadzone na hodowlach linii komórkowych oraz specjalnie do tego celu selekcjonowanych zwierzętach doświadczalnych, głównie szczurach. W kolejnym etapie badań eksperyment jest prowadzony porównawczo na

kilku gatunkach zwierząt. Już badając toksyczność przewlekłą w teście 90-dniowym, wykorzystuje się szczury i psy. Szczególnie długotrwałe są badania toksyczności przewlekłej, mutagenności, teratogenności i rakotwórczości, które wymagają prowadzenia eksperymentu ponad 18 miesięcy na myszach, 30 miesięcy na szczurach i 12 miesięcy na psach. Toksyczność reprodukcyjną bada się na płodach królików i prowadzi testy na wielu generacjach szczurów. Jednocześnie z obserwacjami zachowania się zwierząt są wykonywane badania przemiany materii (np. odkładanie badanej substancji w organizmie, charakter powstających produktów rozpadu).

W Polsce wykaz dopuszczonych środków konserwujących jest zawarty w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 17 marca 2003 roku w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych, substancji pomagających w przetwarzaniu i warunków ich stosowania (Dz. U. nr 87/2003, poz. 805). W rozporządzeniu tym konserwanty są wymienione w grupie: Warunkowo dozwolone konserwanty i przeciwutleniacze. Grupa ta obejmuje 35 substancji, dla których określono środki spożywcze, w których mogą być stosowane i dopuszczalne dawki. Została ona podzielona na 4 podgrupy:

- Sorbiniany, benzoesany i para-hydroksybenzoesany.
- Ditlenek siarki i siarczany(IV).
- Inne konserwanty, dla których określono maksymalną dawkę w środku spożywczym, np.: bifenyl, difenyl, nizyna, natamycyna, dimetyloodiwęglan, kwas borowy i jego sól, kwas propionowy i jego sole, lizozym.
- Inne konserwanty, dla których określa się ilości wprowadzone w procesie produkcji oraz ich pozostałości w środku spożywczym: azotan(III) sodu i potasu oraz azotan(V) sodu i potasu.

## **4. Metody oznaczania zawartości wybranych dodatków w żywności**

### **4.1. Metody oznaczania zawartości substancji konserwujących**

Zawartość substancji konserwujących w produktach spożywczych można oznaczać metodami spektrofotometrycznymi, kolorymetrycznymi oraz miareczkowymi.

#### **4.1.1. Metody spektrofotometryczne**

Zasada oznaczenia polega na ekstrakcji kwasu benzoowego z próbki przy użyciu eteru etylowego, reekstrakcji alkalicznej, oczyszczeniu przez utlenianie zakwaszonym roztworem dichromianu potasu i oznaczeniu spektrofotometrycznym oczyszczonego kwasu

przy długościach fali: 267 nm, 272 nm, 276 nm. Kwas sorbowy oddestylowuje się z parą wodną i oznacza jego zawartość w destylacie spektrofotometrycznie, przy długości fali 256 nm.

#### **4.1.2. Metody kolorymetryczne**

Oznaczanie substancji konserwujących polega na utworzeniu barwnego kompleksu konserwanta z odpowiednim związkami (np.: kwas benzooesowy z hydroksyloaminą, kwas sorbowy z kwasem 2-tiobarbiturowym) i fotometrycznym pomiarze intensywności zabarwienia przy odpowiedniej długości fali.

#### **4.1.3. Metody miareczkowe**

Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego metodą miareczkową polega na ekstrakcji kwasu zawartego w próbce chloroformem, odparowaniu rozpuszczalnika, rozpuszczeniu pozostałości w alkoholu etylowym i miareczkowaniu alkoholowego roztworu kwasu benzooesowego roztworem NaOH w obecności fenoloftaleiny.

#### **4.1.4. Metody chromatograficzne**

Obecnie w analizie substancji konserwujących coraz bardziej popularne stają się metody chromatograficzne. Do rozdzielania i identyfikacji mieszaniny konserwantów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosuje się kolumny z odwróconymi fazami (RP C<sub>18</sub>), a jako eluentów można użyć np.: mieszaniny metanol/ bufor octanu amonu o pH 4,6; mieszaniny woda/metanol/kwas octowy itp.

Do oznaczania metodą chromatografii gazowej kwasy: sorbowy, benzooesowy i salicylowy metyluje się, gdyż estry metylowe tych kwasów są bardziej lotne niż wolne kwasy. Reakcję estryfikacji przeprowadza się diazometanem.

#### **4.2. Metody oznaczania zawartości przeciwutleniaczy**

W analizie przeciwutleniaczy w żywności znalazły zastosowanie metody **kolorymetryczne i chromatograficzne**. W celu rozdzielania i identyfikacji mieszaniny przeciwutleniaczy wykorzystuje się metody chromatograficzne: chromatografię cienkowarstwową, chromatografię gazową oraz wysokosprawną chromatografię cieczową. W przypadku wysokosprawnej chromatografii cieczowej rozdział i identyfikację przeciwutleniaczy przeprowadza się najczęściej na kolumnach z odwróconymi fazami (RP C<sub>18</sub>), stosując jako fazę ruchomą mieszaniny: acetonitryl/woda; metanol/woda.

Zasada oznaczania przeciwutleniaczy fenolowych polega na wyekstrahowaniu przeciwutleniaczy z tłuszczu i rozdzieleniu ich za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, a następnie oznaczeniu spektrofotometrycznym po reakcji z 1,1—difenylo-2-pikrylohydrazylem.

### 4.3 Metody oznaczania zawartości syntetycznych substancji słodzących

Wśród metod oznaczania syntetycznych substancji słodzących najczęściej stosuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), przy użyciu której można oznaczać jednocześnie kilka substancji słodzących. Ta metoda zalecana jest do oznaczania w produktach żywnościowych zawartości acesulfamu K, aspartamu i sacharyny.

Zasada oznaczenia syntetycznych substancji słodzących przy użyciu HPLC polega na rozdzieleniu substancji słodzących na kolumnie chromatograficznej w układzie odwróconych faz i oznaczeniu badanych związków za pomocą detektora spektrofotometrycznego (długość fali 220 nm). Próbkę do badań należy odpowiednio przygotować: w przypadku badania roztworów klarownych produktów płynnych wystarczające jest rozcieńczenie wodą, natomiast mętne produkty płynne, produkty półstałe i stałe (dżemy, jogurty) muszą zostać oczyszczone za pomocą roztworów Carreza (roztwór Carreza I: 21,95 g dwuwodnego octanu cynkowego, 3 ml kwasu octowego lodowatego w 100 ml wody; roztwór Carreza II: 10,6 g trójwodnego heksacyjanożelazianu(II) potasowego ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$ ) w 100 ml wody). W przypadku, gdy próbka zawiera barwniki, substancje smakowo-zapachowe i tłuszcze, konieczne jest dodatkowe oczyszczanie metodą ekstrakcji do fazy stałej.

Do oznaczania zawartości sacharyny oraz acesulfamu K w preparatach do bezpośredniego stosowania proponuje się metodę spektrofotometryczną, umożliwiającą ilościowe oznaczenie zawartości środka słodzącego na podstawie pomiaru absorbancji roztworu.

### 4.4. Metody oznaczania zawartości barwników

Obecnie w analizie barwników najczęściej stosowane są **metody chromatograficzne** (chromatografia bibułowa, chromatografia cienkowarstwowa, HPLC).

W chromatografii bibułowej, która jest odmianą chromatografii podziałowej w układzie ciecz – ciecz, wykorzystuje się bibuły filtracyjne wykonane z wysoko oczyszczonej celulozy, różniące się grubością i porowatością. Najczęściej stosowana jest bibuła Whatmana.

W metodach chromatografii cienkowarstwowej (TLC) barwniki rozdziela się na celulozie, proszku poliamidowym lub żelu krzemionkowym a identyfikację przeprowadza się w oparciu o wartości współczynnika  $R_f$  i/lub na reakcjach barwnych. W przypadku użycia celulozy dobre rozdziały uzyskuje się przy użyciu fazy rozwijającej o składzie: 2,5% cytrynian sodu/25% amoniak/metanol (72:18:10); przy użyciu żelu krzemionkowego: octanetylu/etanol/dietyloamina/woda (55:20:10:10), natomiast w przypadku proszku poliamidowego - amoniak/metanol/woda (5:15:80).

Wykorzystując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej, optymalne warunki rozdzielania mieszaniny barwników uzyskuje się na kolumnach z odwróconymi fazami (RP  $C_{18}$ ), stosując jako fazę ruchomą mieszaninę np.: izopropanol/woda (15:85).

Ostatnio w analizie barwników stosuje się również metody złożone, wykorzystujące ekstrakcję oraz chromatograficzne rozdzielanie mieszaniny barwników w postaci tzw. par jonowych. Barwniki zawierające w cząsteczce kwasowe grupy funkcyjne, np.: sulfonowe, karboksylowe są szczególnie podatne na jonizację w roztworze. Po dodaniu odpowiedniego związku – chlorku tetrametyloamoniowego, w roztworze tworzy się para jonowa, która ulegając procesowi ekstrakcji, powoduje łatwiejsze rozdzielanie mieszaniny barwników zarówno w chromatografii bibułowej, cienkowarstwowej, jak i w wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej.

Do identyfikacji i badania struktury nowych, syntetycznych barwników, które mogą być dopuszczone do stosowania w przyszłości oraz do wykrywania zanieczyszczeń w barwnikach wykorzystuje się magnetyczny rezonans jądrowy (NMR).

## **II. Część doświadczalna**

### **1. Wykonanie ćwiczenia**

Celem ćwiczenia jest: zapoznanie się z obowiązującym rozporządzeniem Ministra Zdrowia w zakresie stosowania środków konserwujących, z metodami wykrywania i oznaczania dodatków do żywności oraz wykrywanie i oznaczenie zawartości kwasu benzoesowego w napoju bezalkoholowym.

#### **1.1. Zasada metody**

Metoda polega na ekstrakcji chloroformem kwasu benzoesowego zawartego w próbce, odparowaniu rozpuszczalnika, rozpuszczeniu pozostałości w alkoholu etylowym i

miareczkowaniu alkoholowego roztworu kwasu benzoowego 0,05 M roztworem NaOH w obecności fenoloftaleiny jako wskaźnika.

### 1.2. Odczynniki, sprzęt i aparatura

- |   |         |
|---|---------|
| o wyparka rotacyjna                                 | 1 szt., |
| o biureta o pojemności 25 cm <sup>3</sup>           | 1 szt., |
| o rozdzielacz o pojemności 250 cm <sup>3</sup>      | 1 szt., |
| o cylinder miarowy o pojemności 100 cm <sup>3</sup> | 2 szt., |
| o kolba “sercówka” o pojemności 250 cm <sup>3</sup> | 1 szt., |
| o kolba stożkowa o pojemności 250 cm <sup>3</sup>   | 1 szt., |
| o kolba miarowa o pojemności 250 cm <sup>3</sup>    | 1 szt., |
| o kolba stożkowa o pojemności 50 cm <sup>3</sup>    | 3 szt., |
| o pipeta o pojemności 25 cm <sup>3</sup>            | 1 szt., |
| o pipeta o pojemności 10 cm <sup>3</sup>            | 1 szt., |
| o pipeta Pasteura                                   | 3 szt., |
| o lejek   | 2 szt.  |
- 
- o alkohol etylowy, roztwór 95%,
  - o chlorek sodu NaCl, krystaliczny,
  - o chlorek sodu, roztwór nasycony,
  - o chloroform,
  - o fenoloftaleina, roztwór 1%,
  - o kwas solny HCl, roztwór 10%,
  - o wodorotlenek sodu, roztwór 0,005 M,
  - o wodorotlenek sodu, roztwór 10%.

### 1.3. Wykonanie oznaczenia

Pobrać pipetą 25 cm<sup>3</sup> próbki napoju i przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 cm<sup>3</sup>, dodać 30 g krystalicznego chlorku sodu i po wymieszaniu lekko zalkalizować roztwór 10 % roztworem NaOH, uzupełnić do kreski nasyconym roztworem chlorku sodu, wymieszać i odstawić na 45 minut, mieszając od czasu do czasu. Następnie zawartość kolby przesączyć przez karbowany sączek do kolby stożkowej o pojemności 250 cm<sup>3</sup>. 150 cm<sup>3</sup> przesącza przenieść do rozdzielacza, zobojętnić 10% roztworem kwasu solnego wobec papierka lakmusowego, a następnie dodać jeszcze 5 cm<sup>3</sup> 10% roztworu kwasu solnego. Do

zakwaszonego roztworu w rozdzielaczu dodać 30 cm<sup>3</sup> chloroformu i wstrząsać. Klarowną, dokładnie oddzieloną warstwę chloroformową przenieść do kolby “sercówki”. Procedurę ekstrakcji wykonać jeszcze dwukrotnie, używając każdorazowo po 30 cm<sup>3</sup> chloroformu. Z połączonych ekstraktów chloroformowych oddestylować chloroform na wyparce rotacyjnej w temperaturze łaźni wodnej 40 °C. Suchą pozostałość rozpuścić w 15 cm<sup>3</sup> etanolu, dodać 15 cm<sup>3</sup> wody dejonizowanej i dobrze wymieszać. Do 3 kolbek stożkowych o pojemności 50 cm<sup>3</sup> przenieść pipetą po 10 cm<sup>3</sup> etanolowego roztworu kwasu benzoowego, dodać po 2 krople fenoloftaleiny i miareczkować 0,005 M roztworem NaOH do pojawienia się różowego zabarwienia, utrzymującego się co najmniej 30 s.

#### 1.4. Opracowanie wyników

Na podstawie ilości wodorotlenku sodu zużytego do miareczkowania kwasu zawartego w próbie obliczyć zawartość kwasu benzoowego w mg na 1 dm<sup>3</sup> napoju bezalkoholowego. Za wynik końcowy oznaczenia przyjąć średnią arytmetyczną z trzech równoległych oznaczeń, jeżeli różnica między nimi nie przekracza 5 %.

#### 1.5. Interpretacja wyników

Uzyskany wynik odnieść do norm.

### Literatura

1. Sikorski Zdzisław E.(red.), *Chemia Żywności*, wyd. 4, WNT, Warszawa, 2002.
2. Klepacka Mirosława (red.), *Analiza żywności*, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 2005.
3. Małecka Maria (red.), *Wybrane metody analizy żywności*, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003.
4. Krełowska-Kułas Maria, *Badanie jakości produktów spożywczych*, PWE, Warszawa 1993.
5. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 marca 2003 roku w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych, substancji pomagających w przetwarzaniu i warunków ich stosowania (Dz. U. nr 87/2003, poz. 805).