

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОФЕИНА, КОНСЕРВАНТОВ И  
ПОДСЛАСТИТЕЛЕЙ В ВИНАХ, ЧАЯХ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ  
НАПИТКАХ МЕТОДОМ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки IV курса 411 группы

направления 04.03.01. Химия

Института химии

**Сальковой Дарьи Владимировны**

Научный руководитель

Засл. деятель науки РФ

д.х.н., профессор

\_\_\_\_\_

Р.К. Чернова

подпись, дата

Зав. кафедрой

д.х.н., доцент

\_\_\_\_\_

Т.Ю. Русанова

подпись, дата

Саратов 2016

## Введение

**Актуальность.** С давних времен люди употребляют чай и вина. Со временем их состав меняется, стали популярными такие пищевые добавки как консерванты и красители, которые в ряде случаев приносят вред здоровью человека. В связи с этим их содержание в напитках нормируется и подлежит контролю. Энергетические напитки появились недавно и стали особенно популярны среди молодых людей. Их химический состав намного шире, чем в чаях и винах. Так, помимо консервантов и красителей, энергетические напитки содержат кофеин, который в сочетании с другими пищевыми добавками, может оказывать негативное влияние на здоровье человека. Состав энергетических напитков также нормируется и подлежит контролю.

**Цель работы** – применение метода мицеллярной электрокинетической хроматографии для электрофоретического разделения и определения незаряженных молекул кофеина и отрицательно заряженных ионов ряда подсластителей и консервантов (табл. 1) в винах, чаях и энергетических напитках, выявление нарушений, связанных с превышением ПДК их содержания.

Для достижения цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- установить наиболее подходящие условия проведения анализа (выбор ведущего электролита, выбор поверхностно-активного вещества);
- изучить влияние электроосмотического потока в капилляре на разделение аналитов;
- разработать алгоритм проведения анализа 17 реальных объектов.

**Материалы исследования.** В настоящей работе исследовались 7 проб вин: «CinZano Bianco», «Fragolino», «MUSCAT PATRAS DEUS», «MONETO», «Молоко любимой женщины» и два вина домашнего приготовления; 5 проб энергетических напитков: «Burn», «Strike», «Red Bull», «Flesh», «Hell»; 5 проб чаев: «Nestea», «Lipton Ice tea», черный чай «Принцесса Нури» (с сахаром и без сахара), зеленый чай «Принцесса Ява».

**Описание структуры.** Квалификационная работа состоит из введения, шести глав, выводов, библиографического списка, состоящего из 71 наименования, приложения. Работа изложена на 59 листах, включает 11 таблиц и 22 рисунка.

**Первая глава** содержит обзор литературы по методам определения пищевых добавок;

**Вторая глава** содержит описание использованных в работе реактивов, аппаратуры, методик приготовления растворов;

**Третья глава** посвящена типам и составам исследуемых напитков;

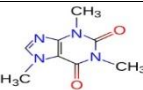
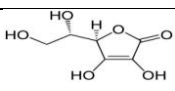
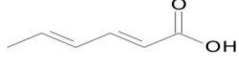
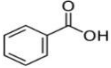
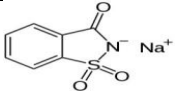
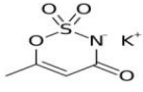
**Четвертая глава** описывает состояние аналитов и физико-химические процессы в исследуемых системах;

**Пятая глава** посвящена описанию построения градуировочных характеристик и проверке их стабильности;

**В шестой главе** описан алгоритм проведения анализа реальных объектов на содержание кофеина, консервантов и подсластителей.

**Приложения** включают примеры электрофореграмм (прил. А), награды, полученные в результате выступлений на научных конференциях, публикации по теме работы (прил. Б).

Таблица 1 – Определяемые компоненты.

№	Название компонента	Формула	Состояние в растворе
1	Кофеин		В боратном буфере находится в недиссоциированной форме.
2	Аскорбиновая кислота		В щелочной среде кислоты находятся в форме анионов.
3	Сорбиновая кислота		
4	Бензойная кислота		
5	Сахаринат натрия		Находятся в ионизированном состоянии в форме анионов в рабочем буферном растворе pH~9.
6	Ацесульфам калия		

## Основное содержание работы

Капиллярный электрофорез (КЭ) – метод, основанный на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля (рис. 1). В капилляр, заполненный буферным электролитом, нами вводился микрообъем (~2 нл) анализируемого раствора пробы. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30кВ) компоненты смеси начинали двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей от заряда и массы иона, и в разное время достигали детектора (так получали электрофореграмму).

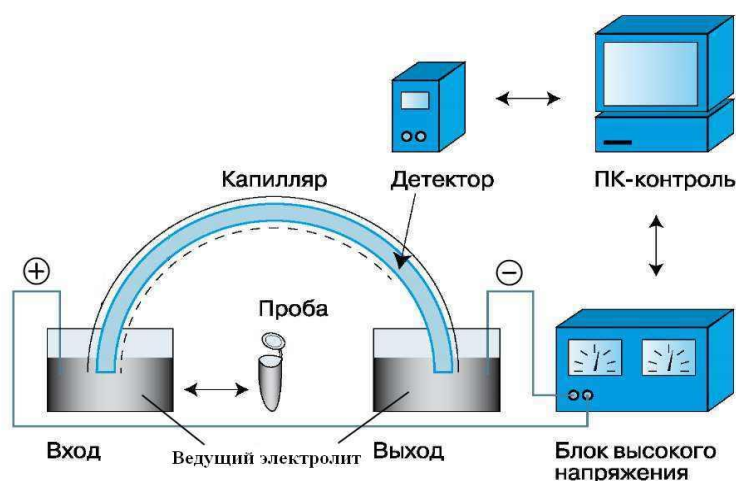


Рисунок 1 – Система капиллярного электрофореза.

**Электроосмотический поток.** Однако в кварцевом капилляре при электрофорезе происходит еще ряд процессов, влияющих на электрофоретическое разделение основных ионов. Прежде всего – это электроосмотический поток (ЭОП), явление специфическое для капиллярного электрофореза. Особенное свойство электрофоретического ЭОП заключается в плоском профиле его потока (рис. 2), в отличие от параболического в капиллярном варианте ВЭЖХ. Поэтому при движении зон компонентов внутри кварцевого капилляра при электрофорезе, не происходит их уширения, благодаря чему метод КЭ характеризуется высокой эффективностью (сотни тысяч теоретических тарелок).

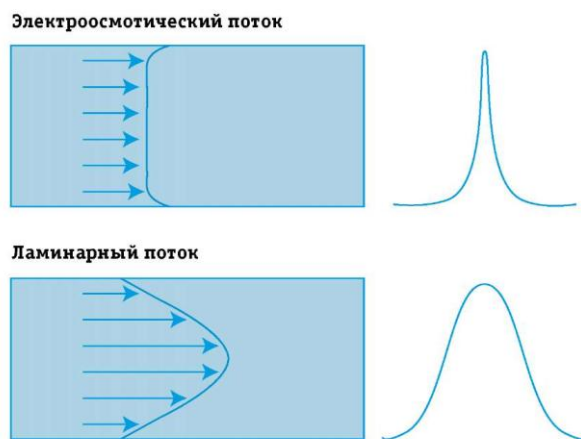


Рисунок 2 – Влияние профиля потока на ширину зоны вещества вверху – капиллярный ЭФ, внизу – ВЭЖХ.

Одним из важных условий воспроизводимости результатов при проведении КЭ является поддержание постоянного значения ЭОП. Это связано с состоянием внутренней поверхности капилляра, которая изменяется при адсорбции на ней аналитов в процессе работы и поэтому требует специальных мер, в нашем случае – это промывка капилляра раствором щелочи, дистиллированной водой и ведущим электролитом.

**Выбор ведущего электролита.** В любом варианте капиллярного электрофореза одной из главных задач обеспечения хорошего разделения аналитов является правильный выбор ведущего электролита (буферного раствора, в который погружаются электроды при электрофорезе). Он играет многогранную роль – изменяет форму нахождения и заряд аналита в растворе; влияет на скорость ЭОП; устраняет влияние побочных процессов при электролизе и др. По свойствам, которым должен обладать ведущий электролит (низкая подвижность основного иона, малое поглощение при длине волны детектирования, достаточная буферная емкость в выбранном диапазоне pH), для работы выбран боратный буферный раствор (pH 9).

Образующиеся гидроксильные и водородные ионы на электродах нейтрализуются буферными компонентами ведущего электролита: в прикатодном слое борной кислотой, в прианодном – борат-ионом. Таким образом, в приэлектродных пространствах происходит только изменение

мольного соотношения компонентов буферной смеси, приводящее к незначительному изменению рН раствора. Таким образом, роль электролита заключается как в стабилизации состояния компонентов пробы в процессе анализа, так и в предотвращении изменения состава раствора в приэлектродных пространствах.

**Выбор ПАВ для успешного разделения и определения кофеина.** В настоящей работе аналитами, подлежащими определению, являлись *анионы* консервантов и подсластителей, кофеин же находился в молекулярной форме и не имел заряда. Именно поэтому нами использовался вариант *мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии (МЭКХ)*, предусматривающий введение в систему соответствующего поверхностно-активного вещества. Наиболее подходящим ПАВ для настоящего исследования явился додецилсульфат натрия (ДДС), который в водной среде имеет критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ)  $8,3 \cdot 10^{-3}$  моль\*л<sup>-1</sup>. При такой концентрации в растворе образуется мицеллярная псевдофаза, он остается прозрачным, что не ведет к засорению капилляра. При подаче высокого напряжения, отрицательно заряженные мицеллы мигрируют к аноду со скоростями меньшими, чем скорость ЭОП. Если со стороны анода в капилляр ввести пробу, то ЭОП будет переносить как нейтральные, так и заряженные частицы пробы к катоду, а навстречу ЭОП будут двигаться мицеллы ДДС, с нейтральными частицами, распределенными между мицеллярной псевдофазой и фазой раствора. В результате на выходе капилляра регистрируется электрофореграмма нейтральных компонентов, а также медленно мигрирующих анионов пробы.

**Определение концентраций пищевых добавок в реальных образцах.** Для определения концентрации пищевых добавок в данной работе применялся метод внешнего стандарта с построением многоточечных градуировочных графиков. Для этого из стандартных растворов были приготовлены 4 градуировочные смеси и снято 8 электрофореграмм этих смесей. Для каждой градуировочной смеси электрофореграммы снимали два раза, так как в

градуировочный график включали две точки для каждого уровня концентрации. После обработки электрофореграмм, согласно программе «МультиХром 1.5», по полученным данным, были построены градуировочные графики для каждого из определяемых компонентов, по которым находили их концентрации в напитках.

Таблица 2 – Массовые концентрации компонентов в растворах стандартов.

Компонент	Массовая концентрация компонента, мг/дм <sup>3</sup>			
	Градуировочные растворы			Контрольный раствор
	№1	№2	№3	
Кофеин	200	80	8	20
Аскорбиновая кислота	100	40	4	10
Сорбиновая кислота	100	40	4	10
Бензойная кислота	200	80	8	20
Сахаринат натрия	200	80	8	20
Ацесульфам калия	200	80	8	20

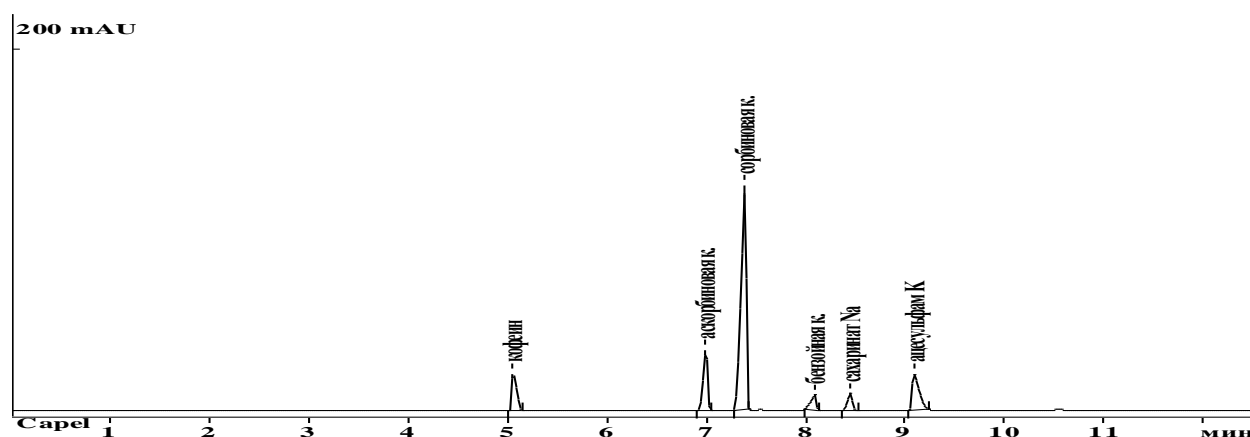


Рисунок 3 – Электрофореграмма градуировочной смеси №1.

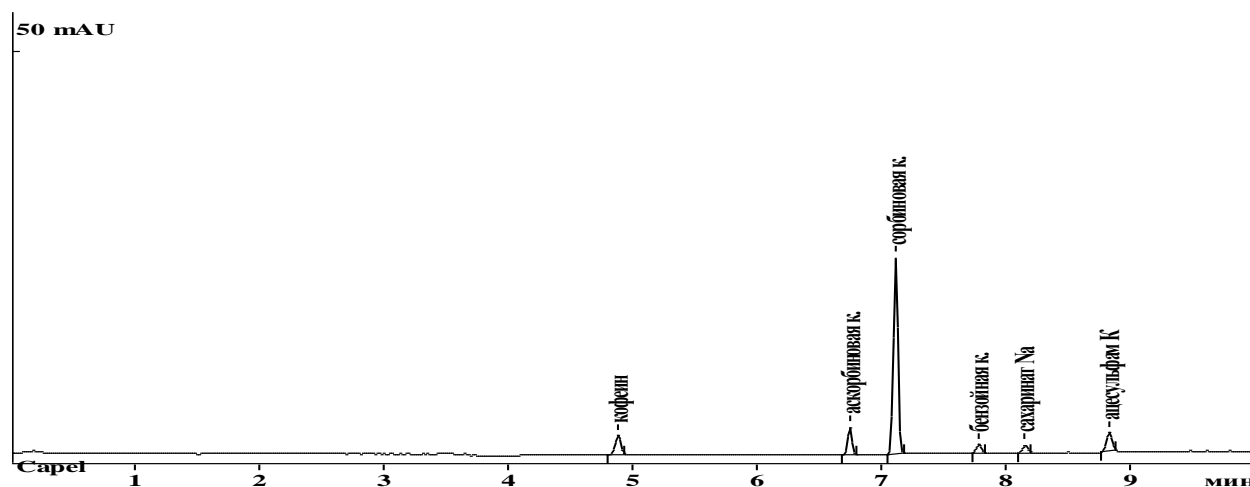


Рисунок 4 – Электрофореграмма контрольной смеси.

Ниже представлена схема предварительных работ для анализа:



Рисунок 5 – Предварительная подготовка к проведению анализа.

Анализ реальных образцов в настоящей работе проводился по разработанному алгоритму (рис. 6).

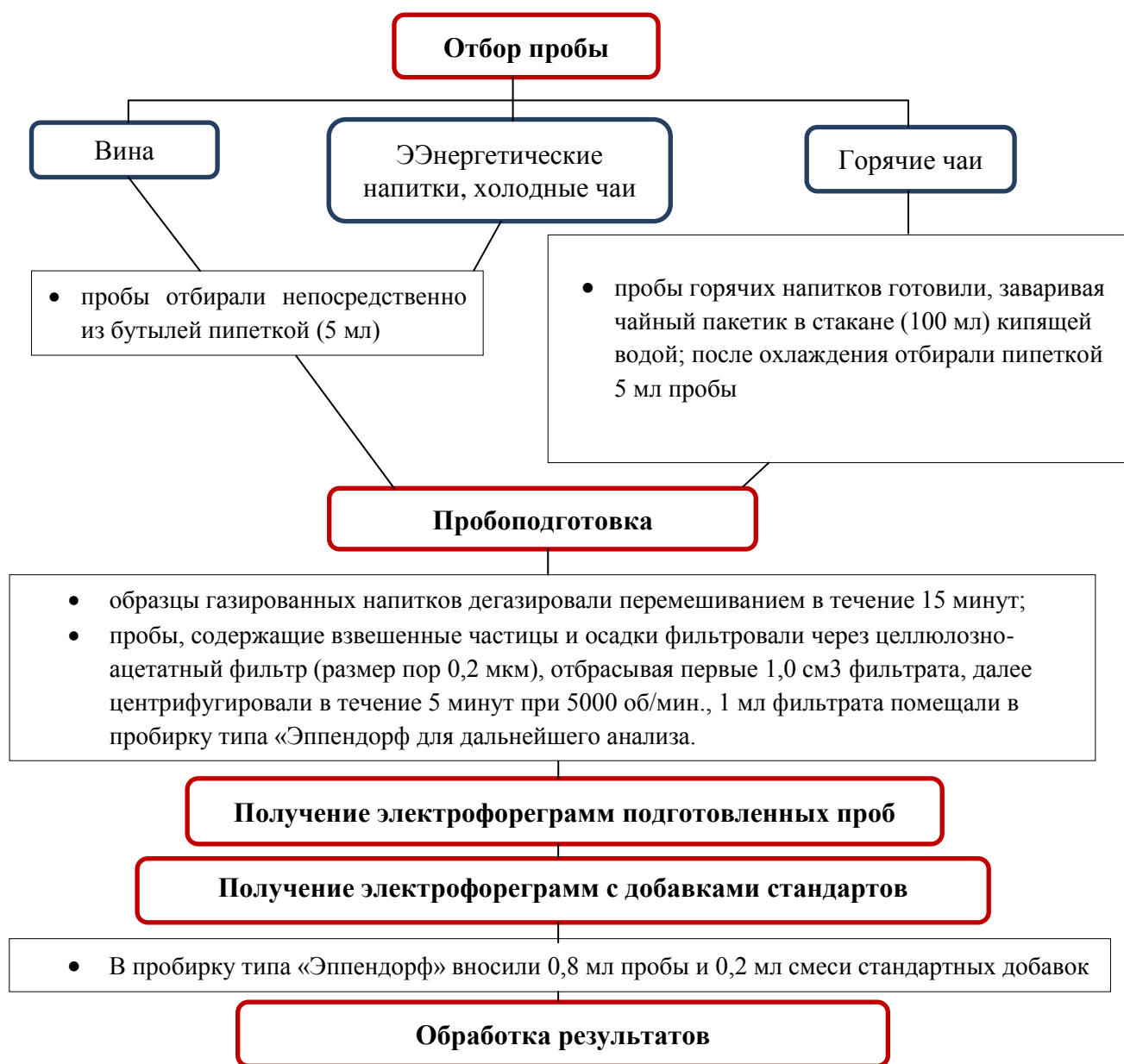


Рисунок 6 – Алгоритм проведения анализа.



Для исследуемых пищевых добавок известен ряд нормативов по допустимым уровням содержания в продуктах питания (табл. 3).

Таблица 3 – Нормативы на содержание исследуемых пищевых добавок.

Объект	Добавка, мг/дм <sup>3</sup>				
	Кофеин	Сорбиновая кислота	Бензойная кислота	Сахаринат натрия	Ацесульфам калия
Энергетические напитки	Не менее 151	300	150	80	350
	Не более 400 ГОСТ Р 52844-2007	Сан Пин 2.3.2.1293-03			
Прохладительные напитки	-	300	150	80	350
		СанПиН 2.3.2.1293-03			
Вина (винные напитки)	-	300	200	80	350
		СанПиН 2.3.2.1293-03			

Таблица 4 – Массовые концентрации компонентов в исследованных винах.

Вина и винные напитки	Кофеин	Аскорбин. кислота	Сорбин. кислота	Бенз. кислота	Сахари-нат Na	Ацесульф. калия
	мг/дм <sup>3</sup>					
«CinZano Bianco»(белый)	—	8,29±1,66	—	—	—	—
«Fragolino»	6,41±0,77	8,03±1,61	1,85±0,52	—	—	—
Домашнее (купленное)	—	3,49±0,70	1,84±0,52	—	—	—
«MUSCAT P. D.»	—	—	1,94±0,54	—	21,1±2,5	—
«MONETO»	—	7,61±1,52	130±36	498±100	—	192±38
Домашнее	—	12,7±2,5	32,0±9,0	—	—	—
«Молоко люб.жен.»	—	6,39±1,28	15,8±4,4	50,4±10,1	—	48,1±9,6

Анализ данных таблицы 4 показал, что большое количество консервантов (бензойная кислота выше предельно допустимой: 498 мг/л), по сравнению с другими пробами вин, находилось в напитке «MONETO», в нём же обнаружено большое содержание ацесульфама калия. Консервантов не было обнаружено

лишь в «CinZano Bianco», а подсластители содержались только в «MUSCAT PATRAS DEUS», «MONETO» и белом вине «Молоко любимой женщины».

Таблица 5 – Массовые концентрации исследуемых компонентов в энергетических напитках.

Энергетически е напитки	Кофеин	Аскорб. кислота	Сорбин. кислота	Бензойная кислота	Сахари- нат Na	Ацесульф. калия
	мг/дм <sup>3</sup>					
«Burn»	333±40	7,94±1,59	170±48	129±26	—	17,7±3,5
«Strike»	145±17	—	—	129±26	6,87±0,82	22,7±4,5
«Red Bull»	396±48	5,12±1,02	3,09±0,87	—	—	69,1±13,8
«Flesh»	286±34	530±106	14,5±4,1	172±34	—	—
«Hell»	386±46	—	5,02±1,41	—	—	45,7±9,1

При исследовании энергетических напитков обнаружено большое содержание кофеина в напитке «Red Bull», он близок к предельно допустимой концентрации (табл. 3). Бензойная кислота, выше предельно допустимой концентрации, содержится в напитке «Flesh» – 172 мг/л, допустимо 150 мг/л.

Таблица 6 – Массовые концентрации компонентов в исследованных чаях.

Чай	Кофеин	Аскорб. кислота	Сорбин. кислота	Бензойная кислота	Сахари- нат Na	Ацесульфам К
	мг/дм <sup>3</sup>					
«Принцесса Нури» (черный без сахара)	159±19	7,28±1,46	1,58±0,44	—	—	—
«Принцесса Ява» (зеленый без сахара)	180±22	7,09±1,42	1,34±0,38	—	—	—
«Принцесса Нури» (черный с сахаром)	140±17	7,51±1,50	1,73±0,48	—	—	16,5±3,3
«Lipton Ice tea»	52,2±6,3	29,0±5,8	1,63±0,46	10,3±2,1	32,2±3,9	—
«Nestea»	49,1±5,9	3,66±0,73	1,36±0,38	—	—	176±35

Среди исследованных видов чая было обнаружено, что максимальное количество кофеина содержится в зеленом чае «Принцесса Ява», а минимальное – в прохладительном напитке «Nestea». Прохладительные напитки «Lipton Ice tea» и «Nestea» содержат меньше кофеина, чем обычные чаи, которые нужно заваривать. Кофеин, консерванты, подсластители во всех пробах содержались в пределах допустимых норм.

## Заключение

1. Обоснован выбор варианта МЭКХ для разделения и одновременного определения кофеина и 5 пищевых добавок с мицеллообразующими ПАВ додецилсульфата натрия.
2. Рассмотрены физико-химические процессы, протекающие в исследуемых системах (электроосмотический поток, влияние состава ведущего электролита, выбор ПАВ). Проведено сопоставление с характером получаемых аналитических сигналов.
3. Обоснован выбор оптимальных условий проведения МЭКХ и применен метод внешнего стандарта для определения кофеина, трех консервантов и двух подсластителей в 17 напитках.
4. Применены метрологические критерии для оценки стабильности 4 многоточечных градуировочных характеристик и оценки правильности полученных результатов.
5. Разработан алгоритм проведения анализа пяти энергетических напитков: «Burn», «Strike», «Red Bull», «Flesh», «Hell», семи проб вин: «CinZano Bianco», «MONETO», «Fragolino», «Молоко любимой женщины», «MUSCAT PATRAS DEUS» и пяти проб чая: «Lipton», «Nestea», чай черный «Принцесса Нури» с сахаром и без сахара, чай зеленый «Принцесса Ява» без сахара на содержание кофеина, аскорбиновой, сорбиновой, бензойной кислот и подсластителей.
6. Проведено сопоставление полученных результатов с нормативными значениями, показано, что концентрацию бензойной кислоты, выше ПДК, имели: энергетический напиток Flesh – 172 мг/л, вино MONETO – 498 мг/л. Кофеин, консерванты, подсластители в остальных пробах содержались в пределах допустимых норм. Однако в пробах «Burn» и «Flesh» присутствовали одновременно аскорбиновая и бензойная кислоты, что может приводить к образованию бензола – канцерогена.

### **Список публикаций по теме квалификационной работы**

1. Селифонова, Е. И. Определение кофеина и некоторых пищевых добавок в винах, энергетических и тонизирующих напитках / Е. И. Селифонова, Д. В. Салькова, Р. К. Чернова // Изв. Саратов. ун-та. Новая серия. 2016. Т. 16: Сер. Химия. Биология. Экология, вып. 1. С. 28-35.
2. Салькова, Д. В. Электрофоретическое определение консервантов в энергетических напитках / Д. В. Салькова, Е. И. Селифонова, Р. К. Чернова // Символ науки. 2016. № 3-4. С. 46-49.
3. Салькова, Д. В. Исследование тонизирующих и энергетических напитков на содержание подсластителей методом капиллярного электрофореза / Д. В. Салькова, Е. И. Селифонова, Р. К. Чернова // Символ науки. 2016. № 4-4. С. 32-35.