

METODY OZNACZANIA BARWNIKÓW SPOŻYWCZYCH

METHODS FOR THE DETERMINATION OF FOOD DYES

Klaudia Kałwa*, Artur Mazurek

*Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Skromna 8, 20-704 Lublin
e-mail: klaudia.kalwa91@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. Metody oznaczania barwników

- 1.1. Przygotowanie próbek do analizy
- 1.2. Metody spektrofotometryczne
- 1.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)
- 1.4. Elektroforeza kapilarna
- 1.5. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Podsumowanie

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Klaudia Kałwa absolwentka Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, aktualnie doktorantka III roku w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności, gdzie wykonuje pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. Radosława Kowalskiego.

W swojej pracy zajmuje się wpływem czynników fizyko-chemicznych na zawartość substancji aktywnych w ekstraktach z ziół oraz oceną wydajności ekstrakcyjnej wybranych układów hydrofilowych i liofilowych pod względem izolacji składników olejku eterycznego. Obszar zainteresowań: choroby dietozależne, farmakognozja, chemia.

Dr Artur Mazurek, adiunkt w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Zainteresowania naukowe Autora obejmują badania w obrębie analityki żywności ze szczególnym uwzględnieniem opracowania nowych metodyk analitycznych w zakresie analizy całkowitej zawartości witaminy C.

ABSTRACT

Food dyes are chemical substances that were developed to enhance the appearance of food by giving it artificial color. People have added colorings to food for centuries, but the first artificial food colorings were created in 1856 from coal tar. Over the years, hundreds of artificial food dyes have been developed, but a majority of them have since been found to be toxic. There is only a handful of artificial dyes that are still used in food. Food manufacturers often prefer artificial food dyes over natural food colorings, such as beta carotene and beet extract, because they produce a more vibrant color [1]. However, there is quite a bit of controversy regarding the safety of artificial food dyes. All of the artificial dyes that are currently used in food have gone through testing for toxicity in animal studies. Regulatory agencies, like the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Food Safety Authority (EFSA), have concluded that the dyes do not pose significant health risks. Not everyone agrees with that conclusion. Interestingly, some food dyes are deemed safe in one country, but banned from human consumption in another, making it extremely confusing to assess their safety [2]. Undesirable effects of azo dyes used for coloring food products led to the development of very sensitive and selective analytical methods successfully used for their determination in various food matrices. Many different methods have been employed for the determination of synthetic dyes in food and beverages including thin layer chromatography and capillary electrophoresis [3]. However, these methods can be time consuming and may not be applicable for the simultaneous analysis of many dyes. Conventional HPLC methods have been employed for the analysis of synthetic colorants and while useful, these methods require long analysis times and large amounts of expensive solvents [4, 5].

Preparation of the test sample involves the use of various techniques such as membrane filtration due to the complexity of food products. Therefore, the development of simple, selective extraction methods together with the combination of chromatographic and spectrophotometric techniques are of great importance [6].

One of the most difficult stages of the analysis is the appropriate selection of the method for the determination of food colors. In the case of spectrophotometric methods, the main advantage is the low cost of the determination, however, the lack of specificity of the absorption spectrum usually makes it difficult to apply this method in the case of a mixture of different absorbing dyes due to the overlap of the spectra. The CE (Capillary Electrophoresis) analysis is faster and more economical compared to conventional electrophoresis and chromatography. The production of cheap capillaries and the development of on-line detection systems contributed to the development of modern capillary electrophoresis. Capillary electrophoresis has a number of types of separation. Ultimately, it is impossible to determine the one particular appropriate specific method for the determination of food dyes due to their diverse structure and chemical composition [4, 7].

Keywords: food dyes, HPLC, spectrophotometry, TLC, capillary electrophoresis

Słowa kluczowe: barwniki spożywcze, HPLC, spektrofotometria, TLC, elektroforeza kapilarna

WPROWADZENIE

Barwa jest jedną z najważniejszych właściwości, na podstawie, której oceniana jest żywność. Stosowany jest szeroki zakres barwników, zarówno naturalnych jak i syntetycznych, do produktów spożywczych w celu poprawy ich wyglądu. Wprowadza się je również do żywności w celu przywrócenia produktom pierwotnego wyglądu, który został zmieniony podczas procesu produkcyjnego. Barwniki dodawane są także w celu zamaskowania niekorzystnych przebarwień lub ograniczenia strat związków zapachowych i witamin wrażliwych na działanie światła. Większość barwników, otrzymanych ze źródeł naturalnych, jest nietrwała i może łatwo ulegać degradacji podczas przetwarzania. W związku z tym barwniki pochodzenia syntetycznego są powszechnie stosowane, nie tylko ze względu na ich trwałość, ale także koszt produkcji, który jest bardzo niski w porównaniu do barwników pochodzenia naturalnego [7]. Dodatek substancji barwiących do żywności praktykowany był już w Średniowieczu i często wynikał z chęci jej zafałszowania. W XIX wieku, wraz z rozwojem syntezy organicznej, na rynku pojawiło się wiele syntetycznych barwników do tkanin, które dodawano również do żywności [8]. Także obecnie się zdarza, iż barwniki są dodawane do produktów spożywczych w celu zafałszowania lub zmiany ich właściwości, co wprowadza konsumenta w błąd, a nawet może mieć negatywny wpływ na jego zdrowie [9]. Jedną z podstawowych grup spośród substancji dodawanych do żywności są barwniki spożywcze a w latach 2010–2015 ich produkcja wzrosła o ponad 40% [8].

Wśród syntetycznych barwników stosowanych w przemyśle spożywczym, barwniki azowe stanowią około 65% związków obecnych na rynku [10]. Są to barwniki charakteryzujące się występowaniem grupy azowej ($-N=N-$) w strukturze cząsteczek. Barwniki te mają silne, żywe kolory i są wykorzystywane do barwienia różnych produktów spożywczych [11]. Zostały otrzymane po raz pierwszy przez Greissa w 1858 roku z odkrytych przez niego związków diazoniowych. Synteza barwników azowych jest bardzo prosta i niedroga. Są wysoko lub średnio odporne na działanie ciepła, tlenu, światła i wilgoci oraz są stabilne w pełnym zakresie pH żywności [12]. Barwniki azowe są zazwyczaj odporne na warunki tlenowe, ale mogą być łatwo zredukowane przez mikroflorę jelitową do amin aromatycznych [13]. W 2007 roku naukowcy z Uniwersytetu w Southampton odkryli związek pomiędzy konsumpcją produktów zawierających syntetyczne barwniki a występowaniem objawów nadpobudliwości u dzieci. Badanie zostało przeprowadzone na 153 dzieciach w wieku 3 lat oraz 144 dzieciach w wieku 8 i 9 lat. Dzieciom podawano napoje zawierające benzoesan sodu oraz mieszaninę czterech z sześciu barwników (żółcień pomarańczową FCF, żółcień chinolinową, azorubinę, czerwień Allura, tartrazynę i czerwień koszenilową A) lub placebo [12]. Obie mieszaniny zawierały żółcień pomarańczową w ilości 5 mg lub 7,5 mg. Wyniki badań wykazały, że spożycie napoju zawierającego konserwant oraz mieszaninę barwników, powodowało nadaktywne zachowanie u dzieci z obu grup wiekowych. U badanej grupy zaobserwowano takie objawy jak wiercenie się, impulsywność, przerywanie cudzych rozmów,

gadatliwość, nadpobudliwość ruchową, niepokój oraz problemy z koncentracją. Badania były analizowane przez niezależne organizacje naukowe: Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz Komitet Toksykologiczny Wielkiej Brytanii. Obie organizacje stwierdziły, że badanie zostało przeprowadzone prawidłowo [12, 14]. W wyniku badań w Southampton, w krajach Unii Europejskiej został wprowadzony obowiązek umieszczania na etykiecie produktów spożywczych, adnotacji o treści: „może mieć szkodliwy wpływ na aktywność i skupienie uwagi u dzieci”. Wszystkie produkty przywiezione do Polski z państw trzecich oraz żywność wprowadzona do obrotu i oznakowana po 20 lipca 2010 roku musi zawierać tę informację po nazwie lub numerze E barwnika z tej grupy [10, 14]. Ze względu na coraz częstsze stosowanie barwników syntetycznych do żywności oraz niekiedy ich niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka na szczególną uwagę zasługują metody, które pozwolą nam poprawnie oznaczyć ich zawartość w produktach spożywczych.

1. METODY OZNACZANIA BARWNIKÓW

1.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY

Nie ma ogólnie przyjętej, standardowej metody stosowanej do ekstrakcji barwnika. Niemniej jednak większość procedur przygotowania próbki do analizy polega na zastosowaniu odpowiedniej metody ekstrakcji w celu uwolnienia pożądaných analitów z matrycy, a następnie usunięciu substancji obcych [15, 16].

W celu oznaczenia zawartości barwników spożywczych w napojach, stosuje się procedurę przygotowania próbki obejmującą jednoetapową ekstrakcję membranową przy użyciu wody, jako rozpuszczalnika [17, 18].

Ekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid-phase extraction*, SPE) jest najczęściej stosowaną techniką w oznaczaniu barwnika spożywczego, ze względu na jej zalety, takie jak prostota i szybkość. Technika ta umożliwia oznaczenie dużej ilości próbek z wymaganą dokładnością [19]. Do analizy barwników wykorzystywane są różne rozpuszczalniki organiczne, więc wybór odpowiedniego rozpuszczalnika nie zawsze jest prosty. Struktura matrycy analitycznej i jej elementy odgrywają kluczową rolę przy wyborze rozpuszczalnika do ekstrakcji. Rozpuszczalniki, takie jak metanol, kwas octowy, etanol, octan etylowy, fosforan tetrabutylamonowy są odpowiednie do ekstrakcji barwników [9].

Do oznaczenia naturalnych i syntetycznych barwników w liofilizowanych produktach spożywczych zastosowano automatyczną ekstrakcję do fazy stałej, używając amoniaku i metanolu, jako eluentów i oktadecylosilanowej (C_{18}) fazy stacjonarnej [20]. Przeprowadzono ekstrakcję siedemnastu barwników spożywczych w czterdziestu siedmiu produktach spożywczych, stosując prosty proces SPE. Do skutecznej ekstrakcji wykorzystano wodę, aby wyekstrahować barwnik z galaretek, cukierków, napojów i mieszanek w proszku oraz kwas octowy do ekstrakcji barw-

nika z ciastek, wafli i makaronu [21]. W innym badaniu zastosowano ekstrakcję do fazy stałej do oznaczenia szesnastu barwników syntetycznych w daniach typu instant z dużą zawartością oleju. Na podstawie badania stwierdzono, że połączenie metanolu z acetonem w stosunku 1:1 (v/v) i 2 molowym roztworem mocznika zawierającego 5% amoniaku w metanolu wykazało doskonałą wydajność podczas oczyszczania za pomocą kolumny do chromatografii żelowej [22]. Badano użycie NH₂-LDC-MP (sieciowany polimer magnetyczny), jako sorbentu w SPE z zastosowaniem pola magnetycznego w celu zwiększenia odzysku ekstrakcji siedmiu syntetycznych barwników spożywczych przy użyciu wody o pH 9,0 jako rozpuszczalnika. Wyniki badania wykazały, że NH₂-LDC-MP może mieć zastosowanie do szybkiego i skutecznego usunięcia zanieczyszczeń [19].

Z kolei w innych badaniach zajmowano się spektrofotometrycznym oznaczeniem czerwieni Allura w próbkach wody poprzez efektywną procedurę ekstrakcji do fazy stałej na szklanej kolumnie zawierającej wysoce porowaty polimer styrenu i diwinylobenzenu MCL GEL CHP20P. Opracowano prostą i dokładną metodę o niskich kosztach analizy [23]. SPE jest techniką preferowaną przez wielu naukowców ze względu na swoje zalety. Charakteryzuje się wysokim współczynnikiem koncentracji oraz może być stosowana do obróbki próbek o dużej objętości. Technika ekstrakcji do fazy stałej jest powszechnie stosowana do zateżenia lub oddzielenia śladowych ilości pierwiastków i ultra śladowych ilości związków organicznych i nieorganicznych, w celu oddzielenia składników matrycy oraz obniżenia dolnej granicy oznaczalności [24, 25].

Ekstrakcja typu ciecz–ciecz (ang. Liquid-Liquid Extraction, LLE, znana również, jako ekstrakcja rozpuszczalnikowa) polega na oddzieleniu związków w oparciu o ich względną rozpuszczalność w dwóch płynach niemieszających się. Zazwyczaj jest to faza organiczna i woda. Najbardziej powszechnymi rozpuszczalnikami (zarówno same, jak i w połączeniu) używanymi do ekstrakcji barwnika z produktów spożywczych są woda, etanol, metanol, alkohol izopropylowy, roztwór amoniaku w etanolu, octan etylu, amoniak, cykloheksan i fosforan tetrabutylamoniowy [26, 12].

Przeprowadzono badania z użyciem różnych rozpuszczalników do jednoczesnej ekstrakcji czterdziestu barwników spożywczych w napojach i cukierkach. Stwierdzono, że roztwór amoniaku i etanolu w proporcji 1:1 (v/v) wykazał dobrą skuteczność ekstrakcji po ultrasonikacji i odparowaniu próbki [26]. Zaobserwowano, że trójskładnikową mieszaniną etanolu, amoniaku i wody w proporcji 80:1:19 można osiągnąć wysoką wydajność ekstrakcji siedmiu barwników z próbek paszy dla zwierząt oraz w mięsie [27]. W literaturze analizowano zawartość czternastu syntetycznych barwników spożywczych w kawiorze stosując połączenie wodnego roztworu amoniaku (25%) i metanolu w stosunku 1:9 [28]. W innym badaniu oznaczono siedem certyfikowanych barwników spożywczych w czterdziestu czterech produktach spożywczych metodą chromatografii cieczowej, za pomocą wodorotlenku amonu i metanolu zastosowanych jako rozpuszczalników do ekstrakcji [21].

Pomimo, że metody ekstrakcji ciało stałe–ciecz i ciecz–ciecz są najczęściej stosowanymi technikami do próbek żywnościowych, do analizy barwników stosowane są również inne metody ekstrakcji, np. ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE) oraz ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (UAE). Mają one zastosowanie, jako ekologiczne, alternatywne metody ekstrakcji. Opcje te są korzystne w laboratorium, ponieważ konwencjonalne metody ekstrakcji z rozpuszczalnikami organicznymi charakteryzują się użyciem dużej ilości rozpuszczalnika oraz są czasochłonne. Dodatkowo często charakteryzują się niskim odzyskiem barwnika, niską selektywnością i precyzją [9]. Badano ekstrakcję dwudziestu jeden syntetycznych barwników w mięsie stosując metodę MAE, używając metanolowego roztworu kwasu octowego (95:5), jako rozpuszczalnika [29]. Opracowano również metodę ekstrakcji za pomocą dwuskładnikowego rozpuszczalnika (metanol i aceton) używając UAE, co pozwoliło na osiągnięcie poprawy odzysku ekstrakcji pigmentów hydrofilowych i hydrofobowych [30].

Do oznaczania barwników stosowana jest również technika ekstrakcji w punkcie zmętnienia. Jest alternatywą dla innych technik rozdziału i może być stosowana na różnych matrycach do wstępnego oznaczania śladowych związków organicznych i związków nieorganicznych. Ekstrakcja w punkcie zmętnienia charakteryzuje się wieloma zaletami, w porównaniu z tradycyjną ekstrakcją typu ciecz–ciecz. Do tej ekstrakcji używana jest woda i nietoksyczne środki powierzchniowo-czynne, co pozwala na uniknięcie stosowania toksycznych, rakotwórczych i łatwopalnych rozpuszczalników organicznych. Jest zgodna z zasadami zielonej chemii. Może doprowadzić do wzrostu wydajności odzysku i dużego współczynnika wstępnego zaťažania, ponieważ obecność środków powierzchniowo czynnych może zmniejszyć straty analitu z powodu ich adsorpcji na pojemniku. Ekstrakcja w punkcie zmętnienia daje bardzo niski limit detekcji i dobrą powtarzalność otrzymanych wyników. Jest metodą ekologiczną, a do tego czułą, prostą, selektywną i o względnie krótkim czasie analizy [31, 32]. Dla kontrastu, istnieje również kilka dostępnych metod, w których nie jest wymagana ekstrakcja przed analizą [33].

1.2. METODY SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Barwniki spożywcze są substancjami absorbującymi falę elektromagnetyczną w obszarze widzialnym, więc spektrofotometria jest najbardziej odpowiednia do ich oznaczania ilościowego. Jest to jedna z najczęściej stosowanych technik analitycznych ze względu na niskie koszty oprzyrządowania. Ta metoda nie wymaga również wysoce wykwalifikowanych operatorów. Jednakże brak swoistości widma absorpcyjnego zwykle utrudnia stosowanie tej metody w przypadku mieszaniny różnych barwników absorbujących, z powodu nakładania się widm [9].

W literaturze dokonano przeglądu metod spektrofotometrycznych do oznaczania syntetycznych barwników spożywczych metodą spektrofotometrii pochodnej widma oraz metody dodatku wzorca w punkcie H (HPSAM). Spektrofotometria

ta znalazła szerokie zastosowanie w analizie próbek wieloskładnikowych. Technika ta opiera się na wykorzystaniu pochodnych widma, wynikających z tworzenia pochodnych rzędu zerowego, rzędu pierwszego, rzędu drugiego itd. z widma absorpcji. W przypadku tej metody próbki muszą być starannie oczyszczone, aby jednoczesne oznaczanie było możliwe i dawało satysfakcjonujące efekty [34].

Drugą opisaną metodą w spektrofotometrii jest metoda dodatku wzorca w punkcie H. W tej metodzie kalibracyjnej rozwiązywany jest problem nakładania się widm dwóch analitów co pozwala otrzymać prawidłowe stężenie analitu, gdy zarówno analit, jak i związki zakłócające są obecne w próbce. Metoda wykorzystuje analityczne sygnały otrzymane przy dwóch wybranych długościach fali, dając dwie linie proste, które mają wspólny punkt o współrzędnych H ($-C_H$, A_H), gdzie $-C_H$ jest poszukiwanym stężeniem analitu, a A_H jest sygnałem analitycznym spowodowanym obecnością substancji interferującej. Metoda ta jest bardzo uniwersalna i może być stosowana w wielu systemach. Największą zaletą HPSAM jest to, że przekształca nieusuwalny błąd, wynikający z bezpośredniego zakłócenia, w błąd systematyczny [34]. Dzięki temu może być jednocześnie określone stężenie analitu oraz wielkość zakłócenia. Metoda HPSAM jest nową, prostą i czułą metodą do jednoczesnego oznaczania azorubiny i czerwieni koszenilowej A, których widma bardzo się pokrywały [34]. W innych badaniach, oznaczono jednocześnie azorubinę i czerwień koszenilową w napojach za pomocą czwartej pochodnej widma absorpcji i porównano wyniki z metodą HPLC. Zaobserwowano, że metoda spektrofotometryczna okazała się prosta, bezpośrednia, szybka i uniwersalna [33].

W literaturze opisano ekonomiczną metodę do jednoczesnego oznaczania pięciu barwników spożywczych w handlowych produktach poprzez zastosowanie dwuwiązkowego fotokolorymetru. Pomiar oparty jest na różnicy stosunków absorbancji przy analitycznej długości fali dla dwóch lub trzech analizowanych substancji. Multi-kolorowe diody LED (czerwony-zielony-niebieski, RGB) zostały użyte, jako źródła światła w celu uzyskania danych przy dwóch lub trzech długościach fali. Metoda ta opiera się na podzieleniu absorbancji mieszaniny przez absorbancję roztworu wzorcowego związków zakłócających i odjęciu otrzymanych danych. Opracowana procedura została z powodzeniem zastosowana do równoczesnego oznaczania barwników spożywczych w produktach handlowych. Uzyskane wyniki wskazują na bardzo dobrą dokładność i precyzję metody. Urządzenie do analizy ma prostą budowę i jest łatwe do obsługi. Charakteryzuje się również niskim kosztem [34]. Ponadto, w literaturze dostępne są badania opierające się na dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz wspomaganą ultradźwiękami połączonej ze spektrofotometrią pochodnej (UAS-DLLME-UV-vis) jako użytecznej techniki selektywnego oznaczania fioletu krystalicznego (CV) i lazuru b (Az-B). Opracowana metoda charakteryzuje się minimalną interferencją spowodowaną innymi substancjami obecnymi w matrycy próbki, a odzysk analizowanych barwników zawiera się w zakresie 86–100% [36].

1.3. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC)

Chromatografia cienkowarstwowa jest to najprostsza, ekonomiczna i najbardziej odpowiednia technika chromatograficzna do jakościowej analizy mieszaniny analitów. Jej cechą jest możliwość uzyskania bardzo dobrych wyników w stosunkowo krótkim czasie. Dokonano przeglądu różnych technik i warunków przygotowania próbki do analizy chromatograficznej barwników spożywczych w różnych matrycach żywnościowych poprzez technikę chromatografii cienkowarstwowej. W odpowiednich warunkach możliwe jest rozdzielenie mieszaniny kilku barwników oraz ich identyfikacja za pomocą porównania: współczynnika migracji R_f , kształtu i koloru plamki z wzorcami [37, 38]. Najczęściej w chromatografii cienkowarstwowej, jako fazę ruchomą stosuje się rozpuszczalniki organiczne. Niestety zazwyczaj mają intensywny, nieprzyjemny zapach i wykazują działanie kancerogenne. Alternatywnym rozwiązaniem jest zastosowanie jako fazy ruchomej roztworu cyklodekstryny poliamidowego sorbentu jako fazy stacjonarnej. Ten układ chromatograficzny umożliwił rozdział następujących barwników: eozyny, erytrozyny i rodaminę 6G [38].

Pochodną chromatografii cienkowarstwowej jest wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC). Metoda ta opiera się na wykorzystaniu odpowiednich płytek, co zapewnia lepszą separację związków i daje zadowalający wynik na krótkiej drodze rozdziału. Technika ta została wykorzystana do oznaczania syntetycznych barwników w napojach alkoholowych. Separacja była przeprowadzona na Whatman LHP-K, Analtech HETLC i Analtech HERPS za pomocą następujących faz ruchomych: butanol/2-butanol/acetonytryl/tetrahydrofuran/keton aceto-metylowy/0,5% wodny roztwór NaCl/amoniak w stosunku 10:10:25:15:20:18:2 lub propanol/acetonytryl/ tetrahydrofuran/keton etylowo-metylowy/octan etylu/ 0,5% wodny roztwór NaCl/ amoniak w proporcji 20:15:25:20:10:8:2 [39]. W innym przypadku, jako fazę stacjonarną użyto porowaty żel krzemionkowy połączony z 3-aminopropylową grupą funkcyjną. Jako eluent zastosowano mieszaninę izopropanolu/ eteru dietylowego/amoniaku w stosunku 2:2:1 [6]. Technika HPTLC zapewnia lepszy rozdział substancji, plamki są mniej rozmazane i bardziej wyraźne.

Analiza ilościowa powoduje więcej trudności, które związane są z wydzieleniem analitów z fazy stacjonarnej. Można to osiągnąć poprzez zdrapanie plamy i ekstrakcję barwnika za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika a następnie pomiar absorbancji roztworu z wykorzystaniem spektrofotometru. Niemniej jednak jest to bardzo pracochłonne. Intensywność barwy wydobytego barwnika może być słaba i nie gwarantuje wysokiej precyzji. Znacznie lepsze wyniki można uzyskać przy zastosowaniu cyfrowego przetwarzania obrazów. Płytki chromatograficzne są skanowane na densytometryrze skanerowym i przetwarzane za pomocą odpowiedniego oprogramowania. [7]. Intensywność plam jest mierzona w trybie RGB (wiązka czerwona, zielona i niebieska). Długość i szerokość są określane za pomocą elektronicznej linijki i ostatecznie obliczane w umownych jednostkach poprzez odpowiednie równanie. Jest to prosta, szybka i precyzyjna metoda ilościowego oznaczania barwników spożywczych. Technika TLC gwarantuje prawidłową interpretację wyników

analizy, ponieważ trzeba wziąć pod uwagę kilka elementów: kształt i kolor plamki, współczynnik RF i odporność na światło (naturalne barwniki narażone na światło zanikają w miarę upływu czasu). Chromatografię cienkowarstwową zastosowano do określenia występowania oraz sprawdzenia zgodności z etykietą, barwników spożywczych w gazowanym napoju bezalkoholowym. Metoda wykazała granicę wykrywalności dla żółcieni pomarańczowej na poziomie 0,024 mg/L [40].

1.4. ELEKTROFOREZA KAPILARNA

Elektroforeza kapilarna (ang. capillary electrophoresis, CE) jest to elektroforetyczna metoda wykorzystująca kapilarę do skutecznego rozdziału zarówno małych, jak i dużych cząsteczek. Analiza CE jest szybsza i bardziej ekonomiczna w porównaniu z konwencjonalną elektroforezą i chromatografią. Do rozwoju nowoczesnej elektroforezy kapilarnej przyczyniła się produkcja tanich kapilar oraz rozwój systemów detekcji on-line. Elektroforeza kapilarna jest stosowana w wielu wariantach, należą do niej kapilarna elektroforeza strefowa, micelarna chromatografia elektrokinetyczna (ang. micellar electrokinetic chromatography, MEKC) oraz izotachoforeza kapilarna, wykorzystująca wysokie napięcie w celu osiągnięcia efektywnej separacji [41].

Zostały opublikowane liczne metody analizy barwników spożywczych metodą CE. Oznaczono jedenaście syntetycznych barwników w napojach alkoholowych, bez przygotowania próbki, za pomocą CE-UV/Vis. Ta metoda elektroforezy kapilarnej, zastosowana do syntetycznych barwników, wykazała zadowalające wyniki rozdziału tych dodatków. Granica wykrywalności dla żółcieni pomarańczowej FCF wyniosła 2,5 mg/L a jej granica oznaczalności wyniosła 8,3 mg/L. Wydajność odzysku dla żółcieni pomarańczowej wyniosła w badaniu metodą CE-UV/Vis 104%. Zalecono stosowanie tej metody w celu określenia obecności barwników syntetycznych w napojach [42].

Zaproponowano metodę elektroforezy kapilarnej z zastosowaniem detektora z matrycą diodową (CE-DAD) do ilościowej oceny żółcieni pomarańczowej FCF, azorubiny, czerwieni koszenilowej A w lodach. W badaniu tym opisano analizę tych barwników oddzielnie lub równocześnie poprzez strefową elektroforezę kapilarną (CZE). Jest to metoda, która może być rutynowo stosowana, a jednocześnie daje korzyści w postaci większej czułości, lepszej separacji i zwiększonej dokładności. Wykrycie trzech syntetycznych barwników dozwolonych tylko w niskich stężeniach (max. 0,05 mg/kg) w domowych i przemysłowych lodach poprzez CZE stanowi bardzo prostą alternatywę dla innych technik analitycznych stosowanych dotychczas. Jako technika rozdzielania CZE daje w tym przypadku bardzo dobre wyniki jest optymalnym, wstępnym narzędziem sprawdzania. Analiza jakościowa metodą elektroforezy kapilarnej z zastosowaniem detektora z matrycą diodową jest porównywalna pod względem powtarzalności, czułości i liniowości do metod chromatograficznych. W oznaczeniu żółcieni pomarańczowej FCF, przeprowadzo-

nym za pomocą strefowej elektroforezy kapilarnej granica wykrywalności wyniosła 0,005 mg/kg. Rzeczywiste koszty analizy są jedną z głównych zalet metody CZE, w porównaniu z innymi technikami. Kapilarna elektroforeza strefowa ze względu na swoją elastyczność, niski koszt i całkowitą automatyzację jest lepszą techniką niż HPLC do oznaczania barwników w lodach [43].

Zaproponowano szybką i ekonomiczną metodę oznaczania dziesięciu powszechnie stosowanych syntetycznych barwników spożywczych dozwolonych w słodyczach i środkach nasercowych metodą micelarnej chromatografii elektrokinetycznej. MEKC wykazuje lepszą zdolność rozdzielczą niż wysokosprawna chromatografia cieczowa, podobną powtarzalność oraz jest szybsza i mniej kosztowna niż metody HPLC [16, 42]. W technice tej, bufor elektroforetyczny jest modyfikowany jonowym środkiem powierzchniowo czynnym. Anionowe i kationowe środki powierzchniowo czynne stosowane są, jako modyfikatory miceli do rozdziału mieszanin, które nie mogą być łatwo rozdzielane z zastosowaniem tradycyjnej kapilarnej elektroforezy strefowej [45]. W literaturze opisano rozdział barwników metodą MEKC przy użyciu buforu fosforan/boran modyfikowanego dezoksycholanem sodu i acetonitrylem. Azorubinę, która jest rzadko stosowana, jako sztuczny barwnik, użyto, jako wewnętrzny standard w oznaczeniach ilościowych [14].

Opisano metodę analizy ośmiu barwników spożywczych za pomocą mikroemulsyjnej chromatografii elektrokinetycznej (MEEKC) stosując roztwór mikroemulsji. Stosując MEEKC badano wpływ stężenia środka powierzchniowo czynnego SDS, rodzaju modyfikatora organicznego, kosurfaktanta i oleju pod kątem optymalizacji rozdzielenia barwników. Finalnie, wyniki rozdzielenia analizy próbek barwników spożywczych według MEEKC zostały porównane do tych metod CE, które były już znane. Stężenie modyfikatora organicznego silnie determinuje wydajność rozdzielenia. Stwierdzono, że faza olejowa i kosurfaktant również mogą mieć niewielki wpływ na separację barwnika. Wreszcie, optymalne warunki dla MEEKC zostały wykorzystane do rozdziału barwników w kilku próbkach rzeczywistych bez przygotowania próbki za pomocą SPE. W porównaniu z innymi metodami CE stosowanymi do analizy barwników, w których zastosowanie SPE jest niezbędne do zmniejszenia interferencji matrycy przed rozdziałem analitów, MEEKC wykazuje większą zdolność rozdzielczą, w czasie analizy niektórych próbek żywności. Granica wykrywalności w przypadku mikroemulsyjnej chromatografii elektrokinetycznej do oznaczenia żółcieni pomarańczowej FCF wynosi 0,78 mg/L, a w przy zastosowaniu klasycznej elektroforezy kapilarnej ta granica wynosi 0,45 mg/L [46].

1.5. WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA (HPLC)

Techniki analityczne w oparciu o chromatografię cieczową mają szeroki zakres zastosowań do analizy syntetycznych barwników spożywczych. Większość z tych metod stosowana jest w połączeniu z detektorami absorpcji w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-Vis), fotodiodowym (DAD) oraz spektrometrem mas (MS). Naj-

powszechniej stosuje się metodę chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, kiedy faza stacjonarna jest niepolarna (oktadecyl C_{18} , monomer oktylowy C_8), a faza ruchoma jest polarna [9]. Ponieważ barwniki spożywcze są polarne, były one bardzo szybko wymywane w pobliżu objętości martwej. W takich przypadkach zastosowanie kolumny C_{18} z polarnie modyfikowanym ligandem zwiększa czas retencji związku barwnika azowego. Wysokosprawna chromatografia par jonowych (HPLC-IP) jest również stosowana, aby poprawić retencje barwników. [9]. Do oznaczenia analitów zastosowano bromek heksadecylotrimetyloamoniowy, jako kationowy środek powierzchniowo czynny w postaci pary jonowej w fazie ruchomej. Zaproponowana metoda, obejmuje prosty sposób ekstrakcji barwnika z żywności i zapewnia połączenie czułości i selektywności, prostoty i krótkiego czasu analizy. Metoda ta pozwala na wykrywanie barwników w bardzo małym stężeniu [47].

W innych badaniach oznaczano czerwone barwniki w słodyczach stosując chromatografię par jonowych z użyciem fosforanu oktyloamoniowego, jako modyfikatora fazy ruchomej [40]. W innym badaniu wykorzystano automatyczną metodę ekstrakcji w oparciu o ługowanie i ekstrakcję do fazy stałej w celu oznaczenia zarówno barwników naturalnych i syntetycznych w produktach mlecznych i tłustych potrawach metodą HPLC. Rozdzielenie barwników uzyskano w trybie elucji gradientowej na kolumnie C_{18} , stosując jako fazę ruchomą roztwór bromku cetylotrimetyloamoniowego w wodzie i etanolu [20]. Opracowano również prostą metodę do jednoczesnego oznaczenia czerwieni Allura i czerwieni koszenilowej w napojach poprzez zastosowanie wody i acetonitrylu, jako fazy ruchomej. Metoda ta pozwoliła uzyskać wiarygodne wyniki, jest precyzyjna i dokładna, daje zadowalającą granicę oznaczalności (0,3 mg/L) w stosunkowo krótkim czasie (14 minut) oraz charakteryzuje się krótkim procesem przygotowania próbki do analizy [48].

W innym badaniu zaproponowano jednoczesne oznaczanie czerwonych i żółtych barwników w stałych matrycach żywnościowych oraz czerwonych, żółtych i niebieskich barwników w napojach podczas jednego cyklu ekstrakcji i chromatografii. Zastosowano fazę stacjonarną C_8 a fazą ruchomą była mieszanina acetonitrylu i buforu octanowego. Analizę przeprowadzono w trybie elucji gradientowej. Metoda wykazała się dobrymi parametrami liniowości, powtarzalności i odtwarzalności, biorąc pod uwagę różnorodność analizowanych matryc i dużą liczbę analitów [49]. W innym badaniu opracowano metodę gradientową RP-LC do jednoczesnej oceny dodatków do żywności, w tym barwników, sztucznych słodzików i konserwantów przy minimalnym przygotowaniu próbki. Zastosowano kolumnę C_{18} , eluent składający się z 0,1 M buforu fosforanowego (pH 4,0) z dodatkiem metanolu oraz detektor spektrofotometryczny. Opracowana procedura równoczesnego oznaczania różnych typów dodatków w napojach okazuje się zapewniać wiarygodne i powtarzalne wyniki, stosując prostą ekstrakcję i krótki czas analizy. Te atrakcyjne cechy, wraz z granicami wykrywalności (od 0,1 do 3 mg/L dla wszystkich dodatków), które są znacznie poniżej maksymalnych poziomów, sprawiają, że metoda ta szczególnie nadaje się do rutynowych pomiarów [48].

W artykule opublikowanym przez Yildirim i Yaşar [50] pierwszy raz opisano zastosowanie kolumn z wypełnieniem C18 typu „core-shell” do analizy ośmiu sztucznych barwników w żywności. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 100 mM buforu octanu amonu (pH 7) i acetonitrylu w trybie elucji gradientowej. Zastosowana kolumna umożliwiła skrócenie czasu analizy do 5,5 minut w porównaniu do czasu uzyskiwanego na klasycznej kolumnie C18 rzędu 30–40 minut. Opracowana metoda charakteryzowała się granicą wykrywalności w zakresie 58–69,1 ng/mL, odzyskiem analizowanych barwników na poziomie 97,95–102,89% a względne odchylenie standardowe otrzymanych wyników analiz próbek żywności było mniejsze od 3%. Otrzymane wartości parametrów walidacyjnych oraz szczególnie bardzo krótki czas analizy pozwalają na rekomendowanie tej metody do rutynowych analiz.

W literaturze opisano analizę ośmiu rozpuszczalnych w wodzie oraz ośmiu rozpuszczalnych w tłuszczach barwników syntetycznych czułą metodą LC-DAD z wykorzystaniem kolumny C₈ jako fazy stacjonarnej oraz mieszaniny metanolu i buforu fosforanowego, jako fazy ruchomej w trybie elucji gradientowej. Syntetyczne barwniki w daniach typu instant, z dużą zawartością oleju, kolejno wyekstrahowano 2-molowym roztworem mocznika, zawierającym 5% amoniaku (rozpuszczonego w metanolu) oraz mieszaniną metanolu z acetonem, oddzielono za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz, oczyszczono i jednocześnie oznaczono metodą HPLC z użyciem detektora diodowego. Metoda ta skutecznie zmniejsza zakłócenia matrycy oraz charakteryzuje się wysoką precyzją i niskimi granicami wykrywalności [22].

W większości metod LC używa się, jako fazy ruchomej, rozpuszczalników organicznych, które negatywnie wpływają na zdrowie człowieka i środowisko. Problem ten można rozwiązać poprzez rozwój ekologicznych metod analitycznych. Jednym ze sposobów jest użycie tritonu X-100 (środek powierzchniowo czynny), jako fazy ruchomej [31]. W badaniu dowiedziono, że następująca po sobie ekstrakcja próbki metanolem i acetonem wspomagana ultradźwiękami, zwiększa odzysk pigmentów hydrofilowych i hydrofobowych w różnych produktach. Zoptymalizowana metoda HPLC może zidentyfikować i oznaczyć ilościowo żółte i czerwone pigmenty sztuczne i naturalne karotenoidy z wysoką czułością i powtarzalnością [31]. Opracowano i zoptymalizowano efektywne i dokładne, ekologiczne metody analizy do jednoczesnego oznaczania barwników spożywczych. Sposób ten zapewnia znaczne korzyści ekologiczne, bez stosowania rozpuszczalników organicznych w procedurze ekstrakcji oraz metodach chromatograficznych. Zaproponowana metoda obejmuje prostą procedurę obróbki wstępnej, aby wyodrębnić barwniki z żywności i leków. Oferuje połączenie czułości, selektywności i prostoty. Pozwala na wykrywanie barwników w niskich stężeniach (0,18 mg/L dla żółcieni pomarańczowej). Należy jednak podkreślić, czas analizy próbki jest wydłużony z powodu konieczności przemywania kolumny. Ponadto, jeśli wszystkie barwniki zostaną rozdzielone w jednym cyklu, metoda ta staje się bardziej przyjazna dla użytkownika [48, 49].

Chromatografia cieczowa połączona z detekcją spektrofotometryczną jest najczęstszą metodą analityczną do oznaczania jakościowego i ilościowego barwników

spożywczych. W przypadku systemów chromatograficznych z detektorem UV-Vis lub DAD trudne jest zapewnienie prawidłowej identyfikacji barwnika, zwłaszcza w złożonych matrycach żywnościowych. Wiele widm barwników spożywczych jest bardzo do siebie podobnych, dlatego wielu naukowców uzupełniło identyfikację barwników w oparciu o spektrometr mas. Wśród technik jonizacji zgodnych z chromatografią cieczą, najbardziej optymalną do analizy barwników jest jonizacja metodą elektrorozpylania (ESI). Wydajność jonizacji związków zależy od matrycy obecnej w próbce oraz zastosowanej fazy ruchomej. Większość barwników może być skutecznie jonizowana w trybie jonów ujemnych, stosując jako bufor octan amonu i mrówczan amonu [11].

Za pomocą LC-DAD-MS oznaczono jednocześnie barwniki syntetyczne rozpuszczalne w wodzie i w tłuszczach. Materiałem do badań były napoje bezalkoholowe, imbir i chilli. Zastosowano jonizację w trybie jonów dodatnich i ujemnych do jednoczesnej analizy barwników syntetycznych. Jako rozpuszczalnika, do ekstrakcji barwników, użyto dimetylosulfotlenku. Ta metoda okazała się zapewniać jednoznaczność identyfikacji i dokładne określenie badanych barwników w próbkach, bez konieczności pracochłonnego przygotowania próbki. Uzyskano również dobrą powtarzalność i wysoką dokładność przy niskich granicach wykrywalności oraz niskich granicach oznaczalności. Wykazano, że opisana metoda może być efektywnym narzędziem w wykrywaniu zafałszowań [29].

Opracowano metodę UFLC-MS/MS (ultraszybka chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas) do analizy siedmiu barwników spożywczych w winie i napojach bezalkoholowych z wykorzystaniem kolumny C_{18} i mieszaniny octanu amonu w acetonitrylu i wodzie, jako fazy ruchomej. Barwniki jonizowano techniką elektrorozpylania (ESI) w trybie jonów ujemnych a spektrometr mas pracował w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji. Dokładność metody wyrażona jako odzysk siedmiu barwników zawierała się między 84,0 a 116,2%. Granice oznaczalności (LOQ) dla oznaczanych barwników mieściły się w zakresie od 1,51 do 5,0 $\mu\text{g/L}$ [19].

W kolejnych badaniach porównano granicę wykrywalności 7 barwników spożywczych oznaczonych metodą HPLC-DAD i HPLC-MS/MS. Metoda HPLC-DAD charakteryzowała się granicą wykrywalności w zakresie 6,43–74,81 $\mu\text{g/L}$ a HPLC-MS/MS w zakresie 0,02–21,83 $\mu\text{g/L}$. Wykazano, że metoda HPLC-DAD jest wystarczająco selektywna i czuła do oznaczania siedmiu powszechnie stosowanych barwników sulfonowych w próbkach paszy oraz mięsa. Tymczasem, metoda HPLC-MS/MS służyła jako kolejny krok potwierdzający poprawność identyfikacji oznaczanych barwników [27].

PODSUMOWANIE

Substancje dodatkowe nie mają wartości odżywczej, ale nadają żywności określone cechy np. smakowe, czy zapachowe. Są to oczywiście substancje chemiczne

i jako takie wywołują określony wpływ na zdrowie człowieka. Barwniki spożywcze są jedną z podstawowych grup dodatków do żywności. Ich obecność znacząco wpływa na wygląd produktu, co w oczywisty sposób zwiększa popyt na ten produkt. Rynek barwników spożywczych, zatem stale się rozwija i z roku na rok wzrasta ilość spożywanych produktów z ich dodatkiem.

Ważnym zadaniem analizy żywności jest analiza jakościowa i ilościowa podstawowych składników odżywczych, przede wszystkim białek, sacharydów, lipidów, witamin, składników mineralnych, oznaczanie dodatków funkcjonalnych, wykrywanie zafałszowań i zanieczyszczeń żywności oraz rodzaju i ilości substancji szkodliwych dla zdrowia. Ostatecznie nie można wyznaczyć odpowiedniej konkretnej metody oznaczania barwników spożywczych ze względu na ich różnorodną strukturę i skład chemiczny. Jednak można wywnioskować, że dobrą metodą jest metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odpowiednio dobranymi parametrami w zależności od oznaczanego barwnika. Metoda ta charakteryzuje się dobrą czułością i selektywnością. Kolejną odpowiednią metodą może być TLC ze względu na szybkość oznaczenia badanej próbki. Podstawowe zalety chromatografii cienkowarstwowej to możliwość przechowywania płytek z rozdzielonymi substancjami a także możliwość obserwacji stopnia rozdzielania na każdym jego etapie i przerwanie procesu w dowolnym czasie jak również detekcja w każdym etapie rozwijania chromatogramu. W przypadku kolumny chromatograficznej, można dokonać detekcji i ocenić stopień rozdzielania dopiero po opuszczeniu kolumny przez składniki rozdzielanej mieszaniny.

UWAGI KOŃCOWE

Przegląd badań nad ilością barwników spożywczych w żywności wskazuje, że w większości przypadków związki te stosowane są na znacznie niższych stężeniach niż obowiązujące limity. Bezpieczeństwo zdrowotne tych związków podlega ocenie przez m.in. Europejski Urząd d/s Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Powstała w wyniku tego opiniowania lista zawiera kilkadziesiąt substancji, z których około 30% stanowią barwniki naturalne. Uznane są one za bezpieczne dla naszego zdrowia pod warunkiem przyjmowania ich z żywnością w ilości nieprzekraczającej podanych dla części substancji wartości ADI, czyli dopuszczalnego dziennego spożycia. Wspomniana lista nie jest zamknięta. Może być weryfikowana w miarę pojawiania się nowych faktów naukowych dotyczących wpływu danych substancji na zdrowie człowieka. Niepożądane działanie barwników azowych stosowanych do barwienia produktów spożywczych doprowadziły do opracowania bardzo czułych i selektywnych metod analitycznych z powodzeniem stosowanych do ich oznaczania w różnych matrycach spożywczych. Przygotowanie próbki do badań obejmuje stosowanie różnych technik takich jak filtracja membranowa, ekstrakcja ciecż–ciecż (LLE), ekstrakcja do fazy stałej (SPE), mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME), ekstrakcja ciecż–ciecż w otwartej kolumnie ekstrakcyjnej (OCLLE). Konieczność takiego

postępowania wynika ze złożoności produktów spożywczych. Stąd też rozwój prostych, selektywnych metod ekstrakcji wraz z połączeniem technik chromatograficznych i spektrofotometrycznych ma ogromne znaczenie.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] L.E. Arnold, N. Lofthouse, E. Hurt, *Neurotherapeutics*, 2012, **9**(3), 599.
- [2] J.P. Harley, C.G. Matthews, P. Eichman, *Pediatrics*, 1978, **62**(6), 975.
- [3] S.L.J. Burgess, J.R. Stochelski, M.A. Kuczek, *Clin. Pediatr.*, 2014, **3**, 156.
- [4] T. Zou, P. He, A. Yasen, Z. Li. *Food Chem.*, 2013, **138**, 1742.
- [5] L.H. Ahlstrom, C. Sparr, E.E. Bjorklund. *TrAC*, 2005, **24**, 49.
- [6] B. Bateman, J.O. Warner, E. Hutchinson, T. Dean, P. Rowlandson, C. Gant, J. Grundy, C. Fitzgerald, J. Stevenson, *Arch. Dis. Child.*, 2004, **89**(6), 506.
- [7] F. Soponar, A. Cătălin Moț, C. Sârbu, *J. Chromatogr. A.*, 2008, **1188**, 295.
- [8] A. Rutkowski, *Przem. Spoż.*, 2003, **3**(57), 2.
- [9] L.H. Ahlström, C.S. Eskilsson, E. Björklund, *Tr AC*, 2005, **24**, 49.
- [10] K. Kozłowska, M. Jeruszka-Bielak, L. Piwowarczyk, A. Brzozowska, *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, **4**, 1157.
- [11] M. Ziarno, D. Zaręba, *Forum Mleczarskie Biznes.*, 2012, **3**, 24.
- [12] K. Yamjala, M.S. Nainar., N.R. Ramiseti, *Food Chem.*, 2016, **92**, 813.
- [13] D. McCann, A. Barrett, A. Cooper, D. Crumpler, L. Dalen, K. Grimshaw, E. Kitchin, K. Lok, L. Porteous, E. Prince, *Lancet*, 2007, **370**(9598), 1560.
- [14] F. Rafii, J.D. Hall, C.E. Cerniglia, *Food Chem. Toxicol.*, 1997, **35**, 8.
- [15] C.O. Thompson, V.C. Trenerry, *J. Chromatogr. A*, 1995, **704**, 195.
- [16] H. Wu, J.B. Guo, L.M. Du, H. Tian, C.X. Hao, Z.F. Wang, J.Y. Wang, *Food Chem.*, 2013, **141**, 182.
- [17] F. Gosetti, P. Frascarolo, E. Mazzucco, V. Gianotti, M. Bottaro, M.C. Gennaro, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1202**, 58.
- [18] K.S. Minioti, C.F. Sakellariou, N.S. Thomaidis, *Anal. Chim. Acta.*, 2007, **583**, 103.
- [19] X.H. Chen, Y.G. Zhao, H.Y. Shen, L.X. Zhou, S.D. Pan, M.C. Jin, *J. Chromatogr. A*, 2014, **1346**, 123.
- [20] M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Agr. Food Chem.*, 2003, **51**, 2121.
- [21] B.P. Harp, E. Miranda-Bermudez, J.N. Barrows, *J. Agr. Food Chem.*, 2013, **61**, 3726.
- [22] B. Tang, C. Xi, Y. Zou, G. Wang, X. Li, L. Zhang, D. Chen, J. Zhang, *J. Chromatogr. B*, 2014, **960**, 87.
- [23] M. Soylak, Y.E. Unsal, M. Tuzen, *Food Chem. Toxicol.*, 2011, **49**, 1183.
- [24] K. Farhadi, R. Maleki, N.M. Nezhad, N. Samadi, *Spectrosc Lett.*, 2010, **43**, 101.
- [25] M. Tuzen, M. Soylak, *J. Hazard. Mater.*, 2006, **129**, 266.
- [26] N. Yoshioka, K. Ichihashi, *Talanta*, 2008, **74**, 1408.
- [27] T. Zou, P. He, A. Yasen, Z. Li, *Food Chem.* 2013, **138**, 1742.
- [28] J. Kirschbaum, C. Krause, H. Brückner, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **222**, 572.
- [29] M. Ma, X. Luo, B. Chen, S. Su, S. Yao, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1103**, 170.
- [30] H. Sun, N. Sun, H. Li, J. Zhang, Y. Yang, *Food Anal. Method.*, 2013, **6**, 1291.
- [31] Y. Shen, X. Zhang, W. Prinyawiwatkul, Z. Xu, *Food Chem.* 2014, **157**, 553.
- [32] A.D. Kaur, U. Gupta, G.U. *Journal of Science*, 2012, **25**, 579.
- [33] M. Hajimahmoodi, M.R. Oveisi, N. Sadeghi, B. Jannat, E. Nilfroush, *Food Anal. Method.*, 2008, **1**, 214.

- [34] M.H. Sorouraddin, A. Rostami, M. Saadati, *Food Chem.*, 2011, **127**, 308.
- [35] F. Turak, M.U. Ozgur, *AOAC*, 2013, **96**, 1377.
- [36] D.E. Alipanahpour, M. Ghaedi, A. Asfaram, *Ultrason Sonochem.*, 2017, **34**, 27.
- [37] K. Rovina, S. Shafiqzaman, S.M. Shaarani, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2017, **47**, 4, 309.
- [38] V.Z. Atayan, E.G. Sumina, S.N. Shtykov, *J. Anal. Chem.*, 2003, **58**, 3.
- [39] J.A. Steele, *JAOAC*, 1984, **58**, 540.
- [40] F.I. Andrade, M.I.F. Guedes, I.G.P. Vieira, F.N.P. Mendes, P.A.S. Rodrigues, C.S.C. Maia, M.M.M. Ávila, L. Matos Ribeiro, *Food Chem.*, 2014, **157**, 193.
- [41] Y. Xu, *The Chemical Educator*, 1996, **1**(2), 11.
- [42] H. Qu, S.W. Linder, T.K. Mudalige, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 979.
- [43] H.Y. Huang, C.L. Chuang, C.W. Chiu, M.C. Chung, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 867.
- [44] L. Del Giovine, A.P. Bocca, *Food Control*, 2003, **14**, 131.
- [45] N.A. Zatar, *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2007, **5**, 220.
- [46] M.C. Gennaro, E. Gioannini, S. Angelino, R. Aigotti, D. Giacosa, *J. Chromatogr. A.*, 1997, **767**, 87.
- [47] M.M. Jurcovan, E. Diacu, *Revista De Chimie*, 2014, **65**, 137
- [48] S. Bonan, G. Fedrizzi, S. Menotta, C. Elisabetta, *Dyes and Pigments*, 2013, **99**, 36.
- [49] M.A. Prado, L.F.V. Boas, M.R. Bronze, H.T. Godoy, *J. Chromatogr. A.*, 2006, **1136**, 231.
- [50] S. Yıldırım, A. Yaşar, *Food Anal. Method.*, 2018, **11**, 1581.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 czerwca 2018

