

УДК 543.559-543.544.5.068.7

АНАЛИЗ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ НАПИТКОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

© 2013 г. В. В. Хасанов, Ю. Г. Слижов, В. В. Хасанов

Томский государственный университет, химический факультет
634050 Томск, просп. Ленина, 36

Поступила в редакцию 16.08.2011 г., после доработки 30.06.2012 г.

Метод капиллярного электрофореза использован для определения содержания кофеина, витаминов С, РР и В6 в энергетических напитках. Рассмотрены его достоинства и недостатки по сравнению с высокоэффективной жидкостной хроматографией, оценено влияние условий анализа на погрешность определений и источники ошибок в технике капиллярного электрофореза.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, электрокинетическая хроматография, электроосмотический поток, энергетические напитки.

DOI: 10.7868/S004445021304004X

В настоящее время все большее распространение в анализе различных пищевых продуктов получает капиллярный электрофорез (КЭ), и в этой связи представляет интерес изучение его возможностей и границ применимости в определении количественного состава энергетических напитков [1].

В обзоре по применению КЭ для анализа пищевых продуктов [2] рассмотрены основы теории и приведены описания различных режимов капиллярного электрофореза, даны характеристики образцов и анализируемых соединений. Так, метод мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) использовали для разделения и определения кофеина и его гомологов в различных объектах многие исследователи [3–8]. Проведено [9, 10] разделение пуриновых оснований, катехинов и ксантинов с помощью КЭ. ГОСТ Р 52844-2007 рекомендует диапазоны концентраций некоторых биологически активных соединений в энергетических напитках, при этом содержание кофеина ограничено концентрациями от 151 до 400 мг/л [11]. Методы испытания тонизирующих напитков описаны ГОСТ Р 53185-2008 [12] и предусматривают использование техники ВЭЖХ для определения большинства биологически активных соединений. Определение кофеина, сахарината натрия, ацесульфама К, бензойной, аскорбиновой (АК) и сорбиновой (СК) кислот в алкогольных и безалкогольных напитках методом КЭ регламентировано впервые введенным ГОСТ Р 53193-2008 [13]. Предполагается, что главными источниками ошибок в КЭ является

непостоянство электроосмотического потока (ЭОП) и дозирование образца [14].

Цель данной работы – исследование возможностей КЭ для определения азотсодержащих органических соединений и аскорбиновой кислоты в энергетических напитках, изучение влияния параметров электрофореза на аналитические характеристики метода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура и материалы. Использовали прибор PrinCE 460 (Нидерланды), имеющий опции гидродинамического и электрокинетического ввода пробы, а также создания избыточного давления на стороне питающей пробирки, снабженного ультрафиолетовым детектором и термостатом капилляра. Для разделения использовали пустотелый кварцевый капилляр с полиамидным покрытием, внутренний диаметр капилляра составлял 75 мкм, общая длина – 60 см, рабочая длина (эффективная длина) – 48 см. Детектирование – прямое, $\lambda = 254$ нм. Рабочий буферный раствор, обеспечивающий режим МЭКХ, содержит 10 мМ тетрабората натрия и 40 мМ додецилсульфоната натрия (рН 9.0). После полного растворения компонентов растворов фильтровали через капроновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и заполняли приемную и дозирующую пробирки.

Подготовка образцов. Дегазировали образцы вакуумированием при встряхивании и воздействии ультразвука. Непрозрачные напитки после дегазации центрифугировали (при 10000 мин⁻¹) и

Таблица 1. Содержание определяемых компонентов в некоторых энергетических напитках и относительная погрешность (δ_x) их определения

Напиток		Витамин РР	Витамин В6	Кофеин	Витамин С
Red Devil	<i>c</i> , мг/л	68 ± 2	7.7 ± 0.8	321 ± 2	31 ± 5
	δ_x , %	3.0	8.0	0.6	16
Red Devil, спиртованный	<i>c</i> , мг/л	—	—	308 ± 2	—
	δ_x , %	—	—	0.66	—
Jaguar	<i>c</i> , мг/л	—	—	320 ± 3	—
	δ_x , %	—	—	0.98	—
Bacchus	<i>c</i> , мг/л	98 ± 3	25 ± 3	318 ± 5	13 ± 1.5
	δ_x , %	2.2	10	1.4	10
Bullit	<i>c</i> , мг/л	—	—	296 ± 5	—
	δ_x , %	—	—	1.4	—
Adrenalin Rush	<i>c</i> , мг/л	32 ± 3	21 ± 4	295 ± 4	431 ± 12
	δ_x , %	11	19	1.3	2.8
Strike, спиртованный	<i>c</i> , мг/л	—	—	260 ± 2	—
	δ_x , %	—	—	0.63	—
Hooch	<i>c</i> , мг/л	—	—	296 ± 4	—
	δ_x , %	—	—	1.2	—
Flash Energy	<i>c</i> , мг/л	71 ± 3	7.8 ± 0.6	258 ± 4	744 ± 35
	δ_x , %	2.1	8.3	1.6	4.8
Fise Bull	<i>c</i> , мг/л	—	—	198 ± 4	—
	δ_x , %	—	—	1.8	—

фильтровали. Образцы перед анализом смешивали с рабочим буфером (от 1 : 1 до 1 : 9). Для определения компонентов использовали метод добавок. Диапазон линейной калибровки по растворам стандартов в буфере составил от 1 до 1000 мг/л по кофеину, никотинамиду и витамину В6, с величинами достоверности аппроксимации $R^2 > 0.9997$ для каждого соединения.

Для стабилизации стандартов и образцов, содержащих АК, в них добавляли динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) до концентрации 0.02–0.5%.

Для ускорения анализа спустя 5 мин после начала электрофореза на входном конце капилляра создавали избыточное давление 100 мБар. Оптимальное сочетание разрешения компонентов и времени анализа обеспечивается при напряжении +20 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа состава некоторых энергетических напитков на содержание кофеина, витамина В6, никотинамида и АК приведены в табл. 1. Данные получены для трех параллельных определений, выполненных без промежуточного промывания капилляра щелочью. Точность анализов связана, прежде всего, с уровнем определяемой

концентрации. Относительная погрешность определения (δ_x) малых концентраций может быть $\geq 20\%$. На точность определения влияет и состав матрицы напитка. Относительная погрешность определений кофеина в экспериментах без промежуточных промываний капилляра щелочью не превышает 2% ($n = 3$), а его содержание практически соответствует заявленным производителями концентрациям. Образцы, содержащие АК, нужно стабилизировать добавками ЭДТА, в противном случае наблюдается существенная систематическая погрешность, вызванная быстрым распадом АК. Стабилизированные же растворы АК теряют при хранении в холодильнике при +4°C не более 5% от исходного содержания АК через 5 суток. Механизм защитного действия ЭДТА заключается в связывании ионов тяжелых металлов, катализирующих быстрое окисление АК кислородом воздуха. Эта стабилизация эффективна также и для витаминизированных соков.

Удовлетворительная погрешность определений, получаемая в анализах без промывания капилляров, может свидетельствовать о том, что достигается некое динамическое равновесие в процессах сорбции–десорбции компонентов образца на капилляре.

Воспроизводимость времени миграции компонента (кофеин) оценивали, промывая капилляр

перед каждым определением 0.1 М раствором NaOH в течение 1 мин (под давлением 2000 мБар) и без промывания:

С промыванием			Без промывания		
μ	S_x	$\delta_x, \%$	μ	S_x	$\delta_x, \%$
3.577	0.023	1.45	3.659	0.042	2.65

μ – время миграции (среднее значение), мин; S_x – стандартное отклонение, мин; δ_x – относительная погрешность, %.

Из приведенных данных видно, что погрешность не превышает 3% даже и без промежуточных промываний, вероятно, по описанной выше причине.

Воспроизводимость площади пика компонента (кофеин) в зависимости от способа ввода пробы. Результаты сравнения влияния способов ввода пробы (табл. 2) свидетельствуют о том, что гидродинамический способ ввода образца обладает лучшей повторяемостью результатов, хотя разница может достигать величины погрешности измерений. Поскольку исследовали однокомпонентные образцы, вклад влияния матрицы образца на ЭОП в этом случае минимизируется, а погрешность составляет около 1%. Измерения проводили без промежуточных промываний капилляра.

Зависимость измеряемой площади от скорости миграции компонента. Проведение электрофореза при разных напряжениях изменяет скорость миграции компонентов. Существенный вклад в это изменение вносит ЭОП. Повышение разности потенциалов ускоряет ЭОП, понижение – уменьшает. В табл. 3 представлены результаты определения кофеина в образце напитка, полученные при разных напряжениях электрофореза. Видно, что различие в величинах регистрируемых площадей компонента составляет около 33% при изменении на такую же величину скорости миграции компонента. Общей тенденцией является значительное увеличение площади пика с уменьшением скорости миграции компонента. Одновременно повышается погрешность измерения на малых скоростях миграции. Это объясняется тем, что УФ-детекторы являются концентрационными и величина регистрируемого сигнала зависит от скорости миграции компонента мимо окна детектора. В вариантах ВЭЖХ, где скорость продвижения компонентов образца мимо окна детектора постоянна, этот эффект практически незаметен. Таким образом, непостоянство ЭОП кроме изменения времени миграции компонентов может приводить также и к существенной погрешности измерения площади пика. Для устранения этого недостатка капилляр промывают щелочью перед каждым новым анализом, но получаемый результат не всегда удовлетворите-

Таблица 2. Воспроизводимость площади пика кофеина (263 мкг/мл, при 25 кВ)

Электрокинетический ввод (10 кВ · 0.05 мин)		Гидродинамический ввод (25 мБар · 0.05 мин)	
Площадь пика компонента, (В · мин · 10 ⁵)	33290	Площадь пика компонента, (В · мин · 10 ⁵)	26598
	34102		26425
	33495		26727
	34035		26659
	34105		26121
μ	33805	μ	26506
S_x	385	S_x	243
$\Delta(0.95)$	337	$\Delta(0.95)$	213
$\delta_x, \%$	1.1	$\delta_x, \%$	0.92

Таблица 3. Зависимость регистрируемой площади пика от величины ЭОП (кофеин в энергетическом напитке, УФ 254 нм)

Напряжение, кВ	20	25	30
Скорость миграции, мм/с	1.7	2.3	3.0
Площадь пика компонента, (В · мин · 10 ⁵)	39766	30190	22600
	39205	29950	22985
	41634	29000	23356
μ	41235	29713	22980
S_x	1272	629	378
$\Delta(0.95)$	1439	712	428
$\delta_x, \%$	3.5	2.4	1.9

лен, поскольку сорбция из образца на очищенной поверхности капилляра может протекать особенно быстро и скорость ЭОП меняется еще до окончания анализа. В ряде случаев, при анализах относительно простых образцов, можно не промывать капилляр, сокращая трудоемкость анализов и добываясь удовлетворительной погрешности. Очевидно, это становится возможным благодаря установившемуся динамическому равновесию в процессах сорбции/десорбции, поскольку рабочий буфер также обладает определенной моющей способностью.

Преимуществами КЭ по сравнению с ВЭЖХ являются экономичность и экологичность анализов, отсутствие асимметричных пиков при анализе органических кислот или оснований. При соблюдении ряда простых условий (разбавление образца в рабочем буфере, поддержание постоянства состава буфера, термостатирование среды разделения) КЭ обеспечивает определение лабильных соединений в сложных матрицах с удовлетворительной точностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Reissig C.J., Strain E.C., Griffiths R.R.* // Drug and Alcohol Dependence. 2009. V. 99. P. 1.
2. *Lindeberg J.* // Food Chem. 1996. V. 55. P. 73.
3. *Sun P., Mariano G.J., Barker G., Hartwick R.* // Anal. Lett. 1994. V. 27. P. 927.
4. *Meinhart A.D., Bizzotto C.S., Ballus C.A., Prado M.A., Bruns R.E., Filho J.T., Godoy H.T.* // Food Chem. 2010. V. 120. P. 1155.
5. *Zhao Y., Lunte C.E.* // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 1997. V. 688. P. 265.
6. *Pomilio A.B., Trajtemberg S.P., Vitale A.A.* // J. Sci. Food Agric. 2004. V. 85. P. 622.
7. *Walker J.C., Zaugg S.E., Walker E.B.* // J. Chromatogr. A. 1997. V. 781. P. 481.
8. *Mallampati S., Pauwels J., Hoogmartens J., Van Schepdael A.* // Sep. Sci. Technol. 2008. V. 9. P. 259.
9. *Geldart S.E., Brown P.R.* // J. Chromatogr. A. 1999. V. 831. P. 123.
10. *Bonoli M., Colabufalo P., Pelillo M., Toschi T.G., Lerccker G.* // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 1141.
11. ГОСТ Р 52844-2007. Напитки безалкогольные тонизирующие. Общие технические условия. М.: Стандартинформ, 2008. 10 с.
12. ГОСТ Р 53185-2008. Напитки безалкогольные и слабоалкогольные тонизирующие. Методы испытания. М.: Стандартинформ, 2010. 50 с.
13. ГОСТ Р 53193-2008. Напитки алкогольные и безалкогольные. Определение кофеина, аскорбиновой кислоты и ее солей, консервантов и подсластителей методом капиллярного электрофореза. М.: Стандартинформ, 2010. 15 с.
14. *Heiger D.* High performance capillary electrophoresis – An introduction / Publication 5968-9963E. Agilent Technologies, 2000. P. 85.