

SEPARAREA COLORANȚILOR ALIMENTARI PRIN CROMATOGRAFIE ÎN STRAT SUBȚIRE

Cromatografia este o tehnică de separare a componentelor unui amestec pe baza distribuției lor selective între două faze: faza staționară și faza mobilă. Faza mobilă, după cum îi spune și numele, este o fază care se deplasează, ea poate fi lichidă sau gaz, în funcție de tipul de cromatografie. Faza staționară poate lichidă sau solidă. O separare eficientă a componentelor unui amestec se realizează atunci când acestea prezintă afinități diferite pentru faza mobilă, respectiv pentru faza staționară. Afinitatea unei substanțe pentru o anumită fază este influențată de mulți factori, de exemplu polaritate, solubilitate, dimensiunea particulelor, sarcina electrică.

Cele mai importante metode cromatografice sunt:

- Cromatografia în strat subțire CSS (thin layer chromatography TLC),
- Cromatografia pe coloană,
- Cromatografia de gaze (gas chromatography GC),
- Cromatografia de lichide de înaltă performanță (High-Performance Liquid Chromatography HPLC).

Cromatografia în strat subțire este o tehnică de separare simplă, rapidă, ieftină, care necesită cantități mici de probă, de aceea este una dintre tehnicile cele mai des utilizate. Faza staționară (adsorbant), solidă, este depusă în strat subțire pe o bandă sau pe o placă din plastic, aluminiu sau sticlă. Ca adsorbanți se folosesc cel mai adesea alumina (Al_2O_3), silicagelul (SiO_2) și celuloza ($(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$). Faza mobilă este lichidă și se numește eluent.

Etaple separării prin cromatografie în strat subțire

1. Alegerea fazei staționare (adsorbantul) și a fazei mobile (eluentul)

Alegerea fazei mobile este esențială pentru o separare cromatografică eficientă. Un rol important în alegerea eluentului este polaritatea. Astfel pentru a realiza o separare eficientă eluentul ar trebui să aibă o polaritate similară cu cea a componentelor de separat, iar adsorbantul ar trebui să aibă activitate redusă (putere de adsorbție mică) pentru componente polare și activitate mare (putere de adsorbție ridicată) în cazul componentelor nepolare.

2. Aplicarea probei

Amestecul care se dorește a fi separat se solubilizează într-un solvent adecvat. Ca solvenți pentru solubilizarea probelor este de dorit să se folosească solvenți mai volatili (acetona, metanol, etanol, acetat de etil etc) pentru a se evapora rapid de pe plăcuța cromatografică. Pentru aplicarea probei se trasează o linie de start cu un creion cu vârf moale astfel încât să nu se deterioreze stratul de adsorbant. Spot-urile se aplică la distanțe suficient de mari (aprox 1-1,5 cm) atât între ele, cât și față de marginile plăcuței cromatografice astfel încât la migrare să nu se intersecteze (Figura 1). Aplicarea se realizează prin preluarea unei mici cantități din soluția de probă cu un tub capilar deschis la ambele capete și atingerea foarte fină a acestuia în locul marcat, perpendicular pe plăcuță, astfel încât diametrul să nu depășească 3-4 mm. După evaporarea solventului se mai poate efectua o nouă aplicare în același loc în funcție de cât de concentrată este soluția probei.

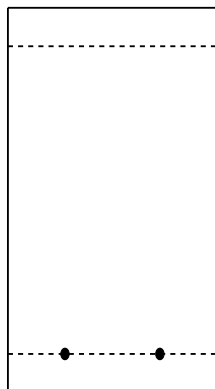


Figura 1. Plăcuță cromatografică înainte de dezvoltare

3. Dezvoltarea

Dezvoltarea este procesul de eluare a fazei staționare de către faza mobilă și constă în introducerea plăcuței cromatografice într-o cameră de dezvoltare care conține eluentul (solventul de dezvoltare). Camera de dezvoltare trebuie să fie saturată cu vaporii eluentului, iar nivelul de lichid trebuie să fie sub linia de start, în caz contrar componentele din spoturi sunt extrase direct în solventul de dezvoltare (Figura 2). De asemenea este foarte important ca solventul în care s-a solubilizat proba să fie complet evaporat din spoturile aplicate înainte de a introduce plăcuța cromatografică în camera de dezvoltare. După introducerea plăcuței cromatografice, camera de dezvoltare se acoperă și nu se mai mișcă. Linia frontului solventului poate fi trasată înainte de introducerea plăcuței, caz în care când solventul atinge nivelul trasat plăcuța este scoasă. Dacă nu a fost trasată anterior, după ce solventul migrează aprox. 85-95% din lungimea plăcuței, aceasta se scoate din camera de dezvoltare și se trasează linia frontului solventului în dreptul nivelului la care a ajuns solventul.

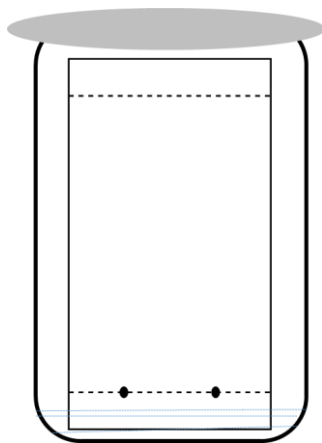


Figura 2. Plăcuță cromatografică într-o cameră de dezvoltare

4. Vizualizarea și analiza

Spoturile colorate pot fi vizualizate direct, cu ochiul liber. În caz contrar pentru a putea vizualiza spoturile este necesară alegerea unei plăcuțe cromatografice care să conțină indicatori fosforescenți (UV_{254} sau F_{254}) sau fluorescenți distribuiți uniform pe plăcuță, astfel încât la iradiere cu radiație din domeniul UV (254 nm sau 366 nm) spoturile apar sub forma unor zone închise la

culoare, în timp ce restul plăcuței este fosforescentă. Spoturile se încercuiesc cu un creion pentru a rămâne marcate și în absența radiației UV.

Există multe alte metode de vizualizare a spoturilor în funcție de tipul de compus separat, dintre care cele mai cunoscute sunt

- prin introducerea într-o cuvă acoperită saturată cu vapori de iod, când se obțin spoturi de culoare galben-marou ca urmare a formării de complecși cu iod a majorității compușilor organici. Spoturile dispar rapid în timp din cauza sublimării iodului.
- prin aplicare unor reactivi de vizualizare direct pe suprafața plăcii cromatografice (prin pulverizare sau prin imersie), urmată de obicei de încălzirea plăcuței
- prin stropire cu acid sulfuric, urmată de încălzire la temperaturi înalte astfel încât are loc carbonizarea compușilor separați rezultând spoturi negre-cenușii.

Cel mai important parametru care se poate calcula după vizualizarea spoturilor este factorul de retenție R_f , definit ca raportul dintre distanța parcursă de fiecare component măsurată în centrul spotului corespunzător și distanța parcursă de solvent (Figura 3).

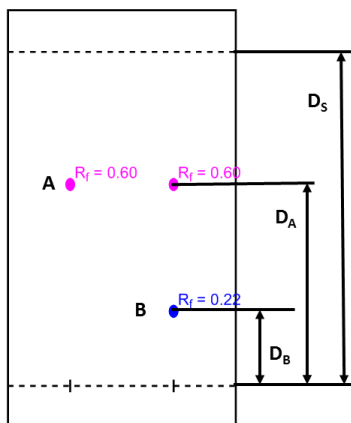


Figura 3. Exemplu de calcul al factorilor de retenție pentru componentele A și B

$$R_{fB} = \frac{D_B}{D_S} \quad R_{fA} = \frac{D_{BA}}{D_S}$$

Unde D_B este distanța parcursă de componentul B, D_A este distanța parcursă de componentul A și D_S este distanța parcursă de solvent.

Coloranți alimentari

Coloranții utilizați în industria alimentară pot fi naturali (Figura 4) sau sintetici (Figura 5).

Curcumin	Lutein	Annatto	Carotene	Paprika	Carminic Acid	Carmin	Cochineal Extract AP	Beet	Grape Skin Extract	Anthocyanins	Cu Chlorophyll	Sodium Chlorophyll	Apo Carotenal	Iron Oxide	Titanium Dioxide	
E100	E161b	E160b	E160a	E160c	E120	E120	E120	E162	E163	E163	E141	E140	E160e	E172	E171	
Powder, Liquid, Lake	Liquid	Powder, Liquid, Lake	Powder, Liquid	Powder, Liquid	Powder, Liquid	Powder, Liquid, Lake	Powder, Liquid	Powder, Liquid	Powder, Liquid	Powder, Liquid	Powder, Liquid, Lake	Powder, Liquid	Powder, Liquid	Powder	Powder	
Barbican root	Tagetes	Rixa Orellana	Nature Identical	Pain	Peppers	Coccus Cacti	Coccus Cacti	Coccus Cacti	Red Beet	Grape Skins	Red Fruit & Veg	Green Plants	Green Plants	Synthetic	Synthetic	Synthetic
Curcumin	Lutein	Bixin/norbixin	B Carotene	Chlared Carotenes	Capsanthin	Carminic Acid	Carminic Acid	Carminic Acid	Betainin	Anthocyanins	Anthocyanins	Cu Phaeophytin	Phaeophytin	Apo Carotenal	Iron Oxide	Titanium Dioxide
Pst*	Fair	Fair	Fair	Fair	Good	Good	Good	Poor	Good	Good	Good	Poor	Fair	V Good	V Good	
Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	V Poor	Good	Good	V Good	Poor	Good	V Good	V Good	
Fair	Good	Ppt in acid*	Good	Good	Stable in acid	Wide range dependent upon form	Stable pH 3-10	Stable pH 3-5	Good in acid	Good in acid	Ppt in acid*	Ppt in acid	Good	V Good	V Good	
Water Soluble Oil Soluble Insoluble Lake	Water Dispersible Oil Soluble	Water Soluble Oil Soluble	Water Dispersible Oil Soluble	Water Soluble Oil Soluble	Water Soluble	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble	Water Soluble	Water Soluble	Water Soluble	Water Soluble Oil Soluble	Water Soluble	Water Dispersible Oil Soluble	Insoluble	Insoluble	
100 300 300 150 150 100/200 100 150 150 500 500	300 150 100/200 100 150 100 150 500 500	10 10 10/20 15 20 10 20 500	QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS	QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS	100 200 300 100 500	200 300 150 100/200 100 500 500	100 200 300 100 500	100 200 300 100 500	QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS	QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS	QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS	QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS QS	100 200 300 150 100/200 100 150 150 500 500	100 200 300 150 100/200 100 150 150 500 500	100 200 300 150 100/200 100 150 150 500 500	

Figura 4. Coloranți naturali utilizați în industria alimentară

Indigotine	Quinoline Yellow	Sunset Yellow	Carmoisine	Amaranth	Ponceau 4R	Erythrosine	Red 2G	Allura Red	Patent Blue V	Indigo Carmine	Brilliant Blue	Green S	Brilliant Black	Brown HT
E102	E104	E110	E122	E123	E124	E127	E128	E129	E131	E132	E133	E142	E151	E155
Powder, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid	Powder, Liquid	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Granular, Liquid	Powder, Granular, Liquid, Lake	Powder, Liquid, Lake
Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic	Synthetic
Good	Good	Good	Good	Good	Good	Poor/Fair	Good	Good	Good	Fair/Good	Good	Good/Fair	Good	Good
Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Poor	Good	Good	Poor	Good
Good	Good	Good	Fair	Fair	Poor Alkali	Ppt <4	Good	Good	Yellow in acid	Poor/Fair	Good	Good	Good/Fair	Good
Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble	Water Soluble Insoluble Lake	Water Soluble Insoluble Lake
100 300 300 150 100/200 100 150 150 500 500	100 200 300 150 100/200 100 150 100 500 500	50 200 50 100/200 100 50 100 500	50 200 50 100/200 100 50 100 500	50 200 50 100/200 100 50 100 500	50 200 50 100/200 100 50 100 500	50 200 50 100/200 100 50 100 500	50 200 50 100/200 100 50 100 500	100 200 300 150 100/200 100 150 150 500 500	100 200 300 150 100/200 100 150 150 500 500	300 200 300 100/200 150 100/200 150 500 500	100 200 300 150 100/200 100 150 150 500 500	100 200 300 150 100/200 100 150 150 500 500	100 200 300 150 100/200 100 150 150 500 500	50 200 50 100/200 100 50 100 500

Figura 5. Coloranți sintetici utilizați în industria alimentară

În funcție de culoare se pot clasifica astfel:

- galbeni: curcumina (E 100), riboflavina (E 101), tartrazina (E 102), galben de quinoleină (E 104);
- oranj și roși: galben oranj (E 110), coșenilă-acid carminic (E 120), azorubină (E 122), amarant (E 123), panceau 4R (E 124), eritrozină (E 127), roșu allura AC (E 129);
- albaștri: bleu patent V (E 131), indigotină (E 132);

- verzi: clorofile, clorofile și complexe cuprice (E 140 și E 141); verde acid brilliant (E 142);
- bruni și negrii: caramel (E 150); brun FK (E 154), cărbune vegetal (E 153), negru brillant BN (E 151);
- de nuanțe diverse: corotenoide (E 160), xantofile (E 161), roșu de sfeclă (E 162), antocianine (E 163).

Spectrele UV-Vis ale unor coloranți alimentari sunt prezentate în figurile 6 și 7.

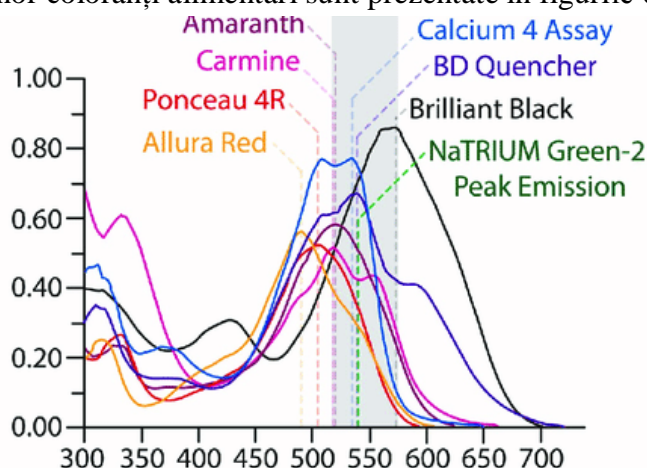


Figura 6. Spectrele UV-Vis ale unor coloranți alimentari sintetici

Tabel 1. Maximele de absorbție ale unor coloranți alimentari sintetici

Colorant alimentar	Cod	Maxim de absorbție (nm) (EU)
Allura Red	E129	504
Amaranth	E123	520
Azorubine	E122	510
Brilliant Black PN	E151	570
Brilliant Blue FCF	E133	630
Brown HT	E155	460
Erythrosine	E127	526
Fast Green FCF	E143	625
Green S	E142	632
Indigotine	E132	610
Patent Blue V	E131	638
Ponceau 4R	E124	505
Quinoline Yellow	E104	415
Red 2G	E128	532
Sunsent Yellow FCF	E110	485
Tartrazine	E102	426

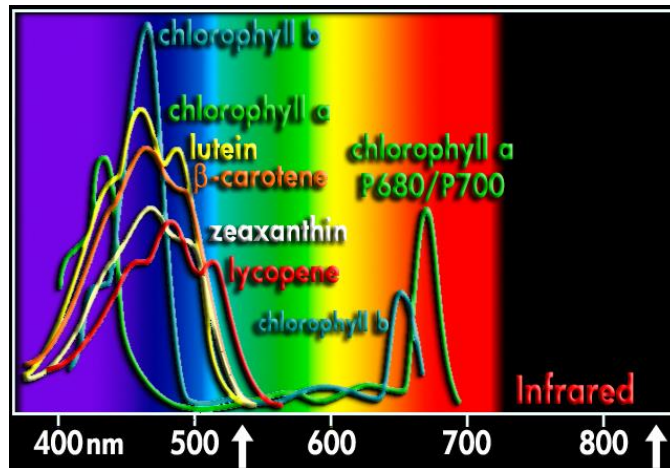


Figura 7. Spectrele UV-Vis ale unor coloranți alimentari naturali

În cadrul lucrării se vor realiza:

- extragerea coloranților alimentari din bomboane glazurate (de tipul M&Ms sau Skittles) utilizând un solvent potrivit.
- separarea acestora prin cromatografie în strat subțire, calcularea coeficienților de retenție.
- testarea a diferite sisteme de eluție astfel încât să se obțină o separare eficientă.
- analize pe baza separării cromatografice astfel încât să se aprecieze dacă pentru culorile portocaliu și verde s-au utilizat combinații de coloranți sau culoarea este dată de un singur colorant, iar pentru culoarea mov se vor separa coloranții care sunt responsabili pentru culoare.
- înregistrări ale spectrelor UV-Vis ale coloranților extrași din bomboane și se va încerca identificarea acestora pe baza maximelor de absorbție obținute (comparându-le cu cele existente în literatură). Se va verifica dacă rezultatele obținute corespund cu datele regăsite în lista de ingrediente.