

Fak. za naravoslovje in tehnološko
Zj.

75880111

ANALITIKA BARVIL, KI SE RABIJO ZA BARVANJE

ŽIVIL IN NEKATERIH PREDMETOV SPLOŠNE RABE

Delo je bilo izvedeno v okviru študijskega programa za varstvo v Kranju in na Katedri za organsko kemijo Fakultete za naravoslovje in tehnološko varstvo v Ljubljani.

Anton Perdih

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. ing. Mariji Perpar za vse pomoč, nasvete in kritične pripombe.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem Katedre za organsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri delu.

Enako se zahvaljujem sodelavcem na Zavodu za zdravstveno varstvo v Kranju, zlasti dr. Ani Kraker, za razsvetljevanje in omogočenje dela.

Prav tako tudi sodelavcem Zavoda za zdravstveno varstvo ZRS v Ljubljani - ing. Matiji Letonja, ing. Jožetu Hošvar in Blažanu Prihovec, ki so mi posredovali številne probleme in svoje dolgoletne analitske prakse.

Kranj - Ljubljana 1965

II 196327

II 196327

ANALITIKA BAHVIL, KI SE HABILO ZA BAHVANJE

ŽIVIL IN NEKATERIH PRIMEROV EPLOŠNE BAHVE

Anton Ferdiš



v 2333/1966

Kraj - Ljubljana 1965

Delo je bilo izvršeno na Zavodu za zdravstveno varstvo v Kranju in na Katedri za organsko kemijo Fakultete za naravoslovje in tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. ing. Mariji Perpar za vso pomoč, nasvete in kritične pripombe.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem Katedre za organsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri delu.

Enako se zahvaljujem sodelavcem na Zavodu za zdravstveno varstvo v Kranju, zlasti še dr. Ani Kraker, za razumevanje in omogočenje dela.

Prav tako tudi sodelavcem Zavoda za zdravstveno varstvo SRS v Ljubljani - ing. Emiliji Letonja, ing. Jožetu Hočevar in Dušanu Prihavec, ki so mi posredovali številne probleme in svoje dolgoletne analitske prakse.

Jerdih

U V O D

1. Splošna načela o lastnostih barvil

Že v davnini so si ljudje lepšali telo pa tudi živež. Tedaj so lahko uporabljali le barvila, ki so jih dobili v naravi. Dandanes imamo na razpolago precej anorganskih pigmentov, pa tudi naravnih organskih barvil. Poleg tega proizvaja industrija še na tisoče sintetskih barvil.

Ali so vsa ta barvila primerna za barvanje živil, pijač, človekovega telesa, predmetov, ki pridejo s telesom v tesen kontakt?

Idealno barvilo bi moralo imeti naslednje lastnosti:

- 1) primerno pa tudi dovolj intenzivno barvo, tako da za barvanje zadoščajo čim manjše količine
- 2) definirano in stalno isto strukturo
- 3) ne sme biti preveč občutljivo na svetlobo, toploto, pH, reducente, oksidante, ne sme sčasoma razpadati
- 4) imeti mora odgovarjajočo topnost in se mora dati dobro mešati z drugimi sestavinami izdelkov
- 5) ne sme imeti neprijetnega vonja ali okusa
- 6) ne sme vsebovati večje količine izhodnih snovi, intermediatov in drugih primesi, kot je to dopustno.
- 7) namensko uporabljeno ne sme povzročiti škodljivih sprememb na človeku in njegovih potomcih.

Proizvajalci so v glavnem sami ugotovili, katera barvila izpolnjujejo prvih pet pogojev in so tudi sami omejili izbor barvil. Metodika raziskav, ki naj bi nam pomagala ugotoviti, katero barvilo izpolnjuje tudi sedmi pogoj, je še v razvoju in se preiskusi opravljajo po različnih konceptih, ker v svetu še vedno ni popolnoma enakih mnenj o vrednosti oziroma umestnosti metod pri različnih preiskusih.

Vedno večje število rakastih obolenj, levkemije in zadnje čase še izkušnje z nekaterimi sintetičnimi preparati

(emulgatorji, talidomidom itd.), so prisilile strokovnjake in zakonodajalce, da vedno bolj upoštevajo načela (podatki iz l. 1963), da se sme barvilo uporabiti le, če pri tem načinu uporabe

- 1) ni strupeno, ne povzroča alergij, sprememb v organih
- 2) ne povzroča raka
- 3) ne povzroča mutagenih sprememb
- 4) ne povzroča kakršnihkoli sprememb na organih potomcev

2. Posebne zahteve

a - barvila za barvanje živil

Posebno stroge so zahteve za barvila, ki naj bi se uporabljala za barvanje živil. Pri njih je treba ugotoviti:

- 1) akutno in oralno toksičnost (na dveh različnih živalskih vrstah)
- 2) kronično toksičnost (na pseih, 2 leti)
- 3) kronično toksičnost (en rod podgan, 2 leti)
- 4) vpliv podkožnih injekcij (podgane, 2 leti)
- 5) vpliv na mutacije (n.pr. pri kvasovkah, bakterijah, mušicah)
- 6) vpliv na organe potomcev (vsaj na dveh generacijah ene živalske vrste)

Med strokovnjaki so še deljena mnenja o tem, kako naj se obravnavajo škodljive posledice, ki nastanejo, če barvila apliciramo drugače kot skozi prebavilo. Posebno sporno je upoštevanje rezultatov, ki se dobijo, če se barvilo vbrizgava pod kožo na enem in istem mestu. Na takem mestu nastanejo pri uporabi nekaterih, toda ne vseh barvil, ki so uspešno prestala preiskuse s krmljenjem, močne rakaste tvorbe. Podobne tvorbe pa povzročata tudi n.pr. sladkor in olje. Nasprotniki takih poskusov pravijo, da naj se snov, ki se uživa

s hrano, preiskuha le s krmljenjem, ne pa na vse mogoče načine. Zagovorniki opozarjajo na to, da se ta barvila v zdravem prebavnem traktu, pri tako skrbno izpolnjeni dieti kot jo imajo poskusne živali, res ne morejo resorbirati. Mnogo pa je ljudi, katerih prebavila so zaradi različnih bolezni v nenormalnem stanju ali pa uživajo hrano, ki pospešuje resorbcijo barvil, tako da njihova prebavila delujejo precej drugače kot prebavila poskusnih živali. Zato zahtevajo, da se brez-pogojno upoštevajo vsi poskusi in da se prepove uporaba vsakega barvila, ki povzroča spremembe v drugih delih telesa, dovolj pa naj se le tisto, ki tudi na mestu vbrizgavanja ne povzroča bistvenih sprememb. Ta neena-kost mnenj se je najbolj pokazala pri trifenilmetanskih barvilih: Guinea Green B, Light Green SF Yellowish, Fast Green FCF, Patentblau AE, Patentblau VF, Benzyl violet 4B. Vsa ta barvila so se izkazala pri krmljenju za neškodljiva, pri podkožni aplikaciji pa so povzročila sarkome na mestu vboda (prvih pet), levkemijo (Patentblau VF), kožni rak (Benzylviolet 4B - zadnje čase tudi pri krmljenju). Kljub temu pa se še vedno uporabljajo v večjem delu zapadnega sveta.

Pri drugih vrstah sintetskih barvil so biološki poiskusi nakazali takle izbor:

bazična barvila so vsa po vrsti strupena, nekatera so tudi kancerogena, zato se za barvanje živil sploh ne bi smela uporabljati. Isto velja za nitrozo - in nitro barvila.

Pri azo barvilih je treba upoštevati, da se barvila v telesu lahko reduktivno razcepijo v amine. Ti so lahko strupeni, pa tudi kancerogeni. Sistematične raziskave so pokazale, da se te lastnosti ponavadi popolnoma odpravijo z uvedbo dveh meta ležečih OH skupin, ali še bolje z uvedbo sulfonskih skupin. V poštev pridejo torej le barvila, ki so v vseh aromatskih sistemih dovolj sulfonirana in še to le, če so sulfonske skupine tako

trdno vezane, da se v telesu ne odcepijo. Biološki preiskusi so to potrdili. Posebno so sumljiva barvila: derivati 2-naftilamina, benzidina in difenilamina. Ti amini in njihove orto hidroksi spojine so močno kancerogene snovi, zato je treba stabilnosti in vplive njihovih derivatov - barvil posebno strogo preveriti. V maščobah topna barvila povčini nimajo sulfonskih skupin, zato je treba izbirati med barvili, ki imajo na aromatskih jedrih proste ali pa zaetrene OH skupine.

Po dosedanjih ugotovitvah se lahko smatrajo za dovolj neškodljiva naslednja azo barvila:

Echtgelb (C.I. 13 015), Tartrazin (C.I. 19 140),
Chrysoin S (C.I. 14 270), Azorubin (C.I. 14 720),
Amaranth (C.I. 16 185), Cochenillerot A (C.I. 16 255),
Echtrot E (C.I. 16 045), Ponceau 6R (C.I. 16 290),
Scharlach GN (C.I. 14 815), Gelborange S (C.I. 15 985),
Orange GGN (C.I. 15 980), Brilliantschwarz BN (C.I. 28 440),
Schwarz 7984 (C.I. še nima),
Sudanorange G (C.I. 11 920), Sudanrot G (C.I. 12 150).

Zadnji dve - v maščobah topni barvili - res nista strupeni in kancerogeni, vendar povzročata spremembe v beljakovinah eritrocitov (tako imenovana Heinzova telesca) in zato njihova uporaba za barvanje živil ni priporočljiva.

Izmed ostalih skupin sintetskih barvil bi glede na strukturo in rezultate toksikoloških preiskav prišla v poštev še po eno trifenilmetansko barvilo: Patentblau V (C.I. 42 051), eno antrakinonsko: Indanthrenblau RS (C.I. 69 800), indigoidno: Indigotin IA (C.I. 73 015), kinolinsko: Chinolingelb (C.I. 47 005) in ksantensko barvilo Erythrosin extra (C.I. 45 430).

Za sedaj bi imeli na razpolago naslednje število v vodi topnih sintetskih barvil: 4 rumena, 2 oranžni, 7 rdečih, 3 modra, 2 črni. Zajeti so torej skoraj vsi barvni odtenki in bi moralo tako število barvil zadostovati.

Če pogledamo tehnološke lastnosti barvil, vidimo, da pri vseh barvah ni tako. Rumenih barvil je dovolj in tudi njihove lastnosti so zadovoljive. Rdečih je celo preveč, saj so morale nekatere tovarne opustiti proizvodnjo barvila Echtrot E, ker ni bilo povpraševanja. Oranžni barvili tudi popolnoma ustrezata. Težave se začnejo pri modrih barvilih. Indanthrenblau RS je v resnici pigmentno barvilo, topno le v nekaterih organskih topilih, zato za barvanje raztopin ni uporabno. Indigotin IA je v vodi dovolj topen in daje z dovoljenimi rdečimi in rumenimi barvili lepe zelene, vijoličaste ali rjave odtenke. Toda:

- 1) ni obstojen na svetlobi
- 2) zelo je občutljiv na oksidante
- 3) počasi se razbarva v raztopinah kislin in sladkorjev
- 4) v alkalnem hitro in popolnoma razpade
- 5) razbarvanje katalizirajo že tako majhne količine težkih kovin, ki so normalno prisotne v vodi in hrani ter drugih dodatkih živilom.

Patentblau V je zelenkasto moder, dovolj obstojen, toda uporaben je le za dobivanje zelenih tonov.

Edino modro barvilo, ki ustreza vsem t e h n o l o š k i m zahtevam, je Patentblau AE in zaradi tega je pritisk industrije na zakonodajne organe v nekaterih državah n.pr. ZDA tako močan, da je tam uporaba tega barvila kljub dokazani kancerogenosti še vedno dovoljena.

Podoben je položaj pri črnih barvilih. Brilliantsschwarz BN je v resnici temno modrovijolično barvilo, ki opazno spreminja barvo s pH. Barvilo samo nima sprejemljive barve; da se ga pa zadovoljivo kombinirati z drugimi barvili in so mešanice dobro uporabne za barvanje živil, ki vsebujejo malo beljakovin in slabe reducente. V zmesih z močnejšimi reducenti pa barvilo razpada v nova, rdeča barvila. O barvilu Schwarz 7984 še ni podrobnih podatkov, ker je bilo šele pred kratkim uvedeno v uporabo. Po strukturi je zelo podobno barvilu Brilliantsschwarz BN.

Kaj pa naravna barvila?

Vsa naravna barvila tudi niso primerna za uživanje. Nekatera izmed njih n.pr. klorofil, karotenoide, antociane, flavone itd. uživamo vsakodnevno s hrano in očitvidno ne puščajo posledic na ljudeh. Za druga barvila, ki niso že prisotna v hrani, temveč jih vanjo šele dodajamo, pa veljajo iste zahteve kot za sintetska barvila. Tehnološka uporabnost v vodi topnih naravnih organskih barvil je v primerjavi s sintetskimi manjša, ker imajo manjšo barvilnost, so manj stabilna itd. Pač pa se za barvanje maščob (margarina!) uporabljajo le naravna barvila - karoteni, ker za te namene tehnološko in zdravstveno bolj ustrezajo kot sintetska barvila.

Pri svojem delu se z analitiko naravnih barvil nisem ukvarjal, ker je uporaba naravnih barvil mnogo bolj redka slučaj kot uporaba sintetskih in tudi v prodaji se jih le redko dobi.

b - Barvila za barvanje predmetov splošne rabe

Z ozirom na namen uporabe jih razdelimo v več skupin:

- 1) barvila za predmete, ki pridejo v stik s sluznicami in ki lahko zaidejo v notranjost telesa (ustna voda, zobne paste, rdečila za ustnice)
- 2) barvila za predmete, ki pridejo v stik s kožo
- 3) barvila in optična belila za pralna in čistilna sredstva
- 4) barvila za posebne namene (barvanje las itd.).

Dalje jih razdelimo z ozirom na topnost na:

- a) barvila topna v vodi
- b) barvila topna v maščobah
- c) lake in pigmente

Toksikološke zahteve

Zahteve za topna barvila iz skupine 1) so podobne zahtevam za živilska barvila. Zlasti priporočajo toksi-

kologi, naj se v te namene uporabljajo samo živilska barvila. Za barvanje oči celo izrecno dovoljujejo le mineralne in živalske pigmente. Vse šminke se z živilskimi barvili sploh ne dajo ustrezno pobarvati in je njihova proizvodnja brez uporabe ksantenskih barvil nemogoča. Ker so ksantenski derivati precej nevarne snovi (alergoze, kancerogenost, mutageni vplivi), priporočajo, naj se uporabljajo le derivati hidroksiksantena in sicer kot proste kisline, ki niso topne v vodi. Uporabljajo naj se čim manjše količine teh barvil. Večji del barvila pa naj bodo laki in pigmenti, ki so zaradi netopnosti manj nevarni kot ksantenska barvila. Za ugotavljanje škodljivosti barvil, ki naj bi se uporabljala za barvanje te vrste predmetov, velja povsod po svetu načelo, da zadostuje 90-dnevno krmljenje podgan s hrano, ki vsebuje 1 do 2 % barvila in dermatološki preiskus.

V ostalih dveh skupinah so barvila, ki se ne resorbirajo skozi zdravo kožo in tudi pri občutljivih ljudeh ne povzročajo reakcij na njej; večina barvil naj bi imela tako strukturo, da bi ona, pa tudi njihovi razkrojni produkti, ki bi nastali v telesu potem, ko bi se barvilo resorbiralo skozi ranjeno kožo, ne mogli povzročiti škodljivih sprememb.

Tehnološke zahteve

I. Izmed lastnosti, ki se zahtevajo na splošno za vsa barvila (str. 1), je pri barvilih za kozmetične preparate še posebno važna obstojnost na prisotne dišave. Za lake in pigmente za barvanje predmetov splošne rabe pa so zelo važne še naslednje lastnosti:

- 1) zelo dobra obstojnost proti svetlobi in toploti, mnogo boljša kot jo je mogoče doseči pri barvilih, ki so topna v vodi.

Najbolj obstojni so ftalocianini in redukcijška barvila,

slabše pigmentna azo barvila in laki, najmanj pa ksantenska barvila.

2) Velika sposobnost prekritja, čim finejši in čim bolj enakomerno veliki delci barvila.

Tudi tej zahtevi najbolj ustrezajo ftalocianini, sledijo ostala barvila v skoraj istem vrstnem redu.

3) Obstoynost proti izluževanju n.pr. s slino, znojem, kožno maščobo.

Najbolj netopni so spet ftalocianini in redukcijska barvila.

II. Izbor barvil za posamezne izdelke

1) Oljne raztopine: za barvanje tekočih izdelkov se uporabljajo le v maščobah topna barvila; za barvanje poltrdih in trdih pa tudi v maščobah disperzibilni pigmenti.

2) Vodne in alkoholne raztopine:

barvilo se izbira glede na: vrsto parfuma

pH

ostale prisotne snovi

a) šamponi in tekoča čistila:

kisla barvila se uporabljajo, kadar so prisotni anionski detergenti in maščobne kisline;

bazična pa, če so prisotni kationski detergenti.

b) alkoholne raztopine:

tu se uporabljajo topna barvila, neobčutljiva na reducente.

3) Tekoče suspenzije (n.pr. emajli in laki za nohte)

laki in pigmenti, ki so netopni v uporabljenih topilih in tekočinah, ki pridejo z lakom v dotik.

4) Emulzije

barvajo se z barvili topnimi v maščobah ali v vodi.

Izbira v vodi topnih barvil je odvisna od emulgatorjev, pH in reducentov. V prisotnosti kationskih emulgatorjev se uporabljajo bazična barvila, v prisotnosti anionskih pa kislina. Če so prisotni reducenti, se uporabljajo kinonska in ksantenska barvila.

5) Trdne suspenzije (n.pr. rdečila za ustnice)

Ti izdelki so v bistvu suspenzija lakov in pigmentov v voskih in trdnih maščobah.

Barvila morajo biti:

- a) zelo disperzibilna in imeti veliko sposobnost prekritja
- b) popolnoma obstojna proti izluževanju z vodo in maščobami
- c) sposobna, da se dobro oprimejo sluznice (indelebile)
- č) obstojna proti višji temperaturi

Najbolj so uporabna ksantenska barvila - proste kisline, poleg njih se uporabljajo še pigmentna barvila in v manjši meri v maščobah topna barvila.

6) Pudri

Ti se barvajo z laki in pigmenti; večinoma so to azo barvila, v izjemnih primerih (parfumi!) se uporabljajo tudi kinonska barvila.

7) Mila in podobni izdelki

Barvila za barvanje mil morajo biti:

- a) neobčutljiva za alkalije
- b) zelo obstojna na svetlobo in toploto
- c) ne smejo se izlužiti z vodo

Uporabljajo se pigmenti (ftalocianini, redukcijska barvila itd), v masteh topna barvila, pa tudi v vodi topna barvila in optična belilna sredstva.

Z A K O N O D A J A

I. V SFRJ

a) Splošni predpisi

Osnovna načela o lastnostih in sestavi živil daje Temeljni zakon o zdravstvenem nadzorstvu nad živili (Ur. l. SFRJ, št. 44/65). Na barvanje živil se nanašajo naslednji člani:

čl. 6: prepovedano je proizvajati ali dajati v promet:

- 1) živila, ki po svoji sestavi ne ustrezajo predpisom
- 2) živila, ki niso higiensko neoporečna
- 3) živila, ki so ponarejena

čl. 9: Za živila, ki higiensko niso neoporečna, se štejejo:

- 1) živila, ki so zdravju škodljiva
- 2) živila, ki so pokvarjena

čl.10: Za zdravju škodljiva veljajo živila, ki zaradi svoje sestave ali lastnosti lahko škodljivo vplivajo na zdravje potrošnikov, zlasti pa:

tč. 7: če so pobarvana . . . z barvili . . ., ki niso dovoljena za barvanje . . . živil, ali če vsebujejo večjo količino barvil . . . kot je dovoljeno.

čl.12: Za ponarejena veljajo živila, ki po svoji sestavi ne ustrezajo pogojem, predpisanim za živila z imenom, s katerim se proizvajajo ali dajejo v promet.

čl.14: Z naravnimi ali umetnimi barvili, oz. z zmesmi naravnih ali umetnih barvil se smejo barvati samo tista živila, za katera je to v predpisih o zdravstveni neoporečnosti živil izrecno dovoljeno.

Barvila, ki se uporabljajo za barvanje živil, ne smejo biti zdravju škodljiva in ne smejo vsebovati zdravju škodljivih snovi.

Živila, ki so pobarvana z naravnimi ali umetnimi barvili ali zmesmi umetnih barvil, morajo biti v prometu deklarirana kot pobarvana.

Določbe prvega, drugega in tretjega odstavka tega člena veljajo smiselno tudi za barvanje surovin, ki so namenjena za proizvodnjo živil.

Prepovedano je barvanje živil z namenom, da bi se prikrila njihova zdravstvena oporečnost.

čl. 17; drugi odstavek: Material za pakiranje, ki pride v neposreden dotik z živilom, sme biti pobarvan samo z barvili, za katere je po posebnih predpisih dovoljeno, da se smejo uporabljati v ta namen.

Podrobnejši predpisi so zbrani v pravilnikih o kakovosti živil. Tudi pravilniki na splošno prepovedujejo barvanje živil. Tista, ki se smejo barvati, so izrecno navedena.

To so: margarina, ki se sme barvati le s karotenoidi
bonboni, ratluk, masa za polnjenje čokolade, prašek za puding, masa za polnjenje keksov in sorodnih izdelkov

skorja trdega sira; sredica pa le s karotenoidi
kandirano sadje, umetno žganje, nekateri likerji, umetne brezalkoholne pijače, umetni sirupi.

Osnovna načela o barvanju predmetov splošne rabe daje temeljni zakon o zdravstvenem nadzorstvu nad predmeti splošne rabe (Ur.l. SFRJ, št. 16/65). Ti predmeti so:

- 1) posoda, pribor, embalaža za živila
- 2) igrače
- 3) kozmetična sredstva

- 4) sredstva za dezinfekcijo, dezinsekcijo in deratizacijo v gospodinjstvu
- 5) tobačni izdelki
- 6) umetno cvetje, umetno listje in umetno sadje
- 7) maske in tapete
- 8) sveče in vžigalice
- 9) petrolej in bencin za rabo v gospodinjstvu.

Predmeti splošne rabe, ki se dajejo v promet na domačem trgu, morajo ustrezati pogojem, ki jih predpisuje zakon, kot tudi posebnim pogojem, ki so predpisani za proizvodnjo in promet oziroma uvoz posameznih predmetov splošne rabe.

čl. 5: Da so škodljivi za zdravje prebivalstva, se štejejo po tem zakonu predmeti splošne rabe:

- 1) če vsebujejo tolikšne količine strupenih sestavin ali snovi, da bi lahko škodljivo vplivale na zdravje prebivalstva
- 2) če so pobarvani z barvili, ki niso dovoljena za barvanje predmetov splošne rabe ali če vsebujejo nedovoljene količine barvil.

čl. 6: Barvila, ki se uporabljajo za barvanje predmetov splošne rabe, ne smejo biti škodljiva za zdravje in ne smejo vsebovati za zdravje škodljivih snovi.

Z določenimi naravnimi ali umetnimi barvili oziroma z zmesmi naravnih ali umetnih barvil se smejo barvati samo tisti predmeti splošne rabe, za katere poseben predpis to izrecno dovoljuje.

Kateri predmeti se smejo barvati in s katerimi barvili, določa Pravilnik o zdravstvenem nadzorstvu nad predmeti splošne rabe (Ur. l. SFRJ, št. 3/64 s popravki v št. 7/64, 23/64, 6/65, 21/65). Njegov šesti člen določa naslednje: "Barvati se smejo samo tisti predmeti splošne rabe, za katere to izrecno dopušča ta pravilnik.

Pri barvanju predmetov splošne rabe iz prvega odstavka tega člena smejo biti uporabljena samo tista barvila, ki so izrecno dovoljena s tem pravilnikom.

Embalaža, ki pride v neposreden dotik z živilom, sme biti pobarvana le z barvili za živila."

Kozmetična sredstva je dovoljeno barvati z barvili, ki so za to izrecno dovoljena. (Šminko za obrvi in trepalnice je n.pr. dovoljeno barvati le z barvili živalskega izvora.) Isto velja za pralna in čistilna sredstva.

Cigaretni papir in cigaretni ustniki se smejo barvati le z barvili za živila.

b) Barvila za barvanje živil in predmetov splošne rabe

Pravilnik o kakovosti kave in kavnih nadomestkov, ... in aditivov (Ur. l. SFRJ, št. 22/63)

čl. 113: Barvila za barvanje živil morajo biti kemično čista.

Barvila in redčila za barvila (polnila), ki se uporabljajo za barvanje živil, ne smejo vsebovati več kot:

- 1) 5 mg As/kg
- 2) 200 mg/kg: Sb, Ba, Pb, Cr, Hg, Se, Cd, Cu, Tl, Zn, CN', NO₂' bodisi vsakega posebej ali vseh skupaj.

Barvila, ki se topijo v vodi, ne smejo vsebovati več kot 0,2 % v etru topnih snovi.

Barvila in redčila zanje ne smejo vsebovati prostih aromatskih aminov in ne prostih aromatskih ogljikovodikov.

Redčila za barvila ne smejo imeti fiziološkega učinka na organizem.

čl. 114: Za barvanje živil se smejo uporabljati tale naravna barvila:

Kemično ime	C.I.1956
Karoteni in karotenoidi	75 130
Klorofil in bakrov klorofilni kompleks	75 810
Naravni pigment košenilje (karminova ksl.)	75 470
Antociani iz živil	-
Laktoflavin	-
Rastlinsko oglje (Carbo medicinalis)	77 266
Karamel	-
Anato	75 120

Bakrov klorofilni kompleks ne sme vsebovati več kot 0,02 % Cu ionov.

čl. 115: Za barvanje živil se smejo uporabljati tale sintetična barvila: 1) barvila, ki se topijo v vodi:

Trgovsko ime	barva	C.I. 1956
Echtgelb	rumena	13 015
Tartrazin	rumena	19 140
Chinolingelb	rumena	47 005
Azorubin	rdeča	14 720
Amaranth	rdeča	16 185
Cochenillerot A	rdeča	16 255
Scharlach GN	rdeča	14 815
Erythrosin extra	rdeča	42 430
Gelborange S	oranžna	15 985
Indigotin IA	modra	73 015
Brilliantsschwarz BN	črna	28 440

Za barvanje prevlek na skorji sira se smejo uporabljati aluminijevi laki sintetičnih barvil iz tega člena.

2) Barvila, ki se topijo v masteh in oljih:

Trgovsko ime	barva	C.I.1956
Sudanorange G	oranžna	11 920
Sudanrot G	rdeča	12 150

3) Barvila za barvanje jaje, šampiljk za meso, skorje sirov in ovitkov za suhomesnate proizvode

Trgovsko ime	barva	C.I.1956
Methylviolette	vijoličasta	42 535
Victoriablau R	modra	44 040
Victoriablau B	modra	44 045
Brilliantgrün	zelena	42 040
Brilliantrocein MOO	rdeča	27 290
Brilliantgrünblau FFR	modra	42 735
Acilan Echtgrün loG	zelena	42 170
Naphtholgrün B	zelena	10 020

čl. 116: Za barvanje embalaže, ki prihaja s pobarvano površino v neposreden dotik z živili, se smejo uporabljati samo barvila ali barvne zmesi, ki se smejo po 114. in 115. členu tega pravilnika uporabljati za barvanje živil.

Pravilnik o zdravstvenem nadzorstvu nad predmeti splošne rabe

čl. 116: Kozmetična sredstva je dovoljeno barvati z naravnimi barvili ali s sintetičnimi organskimi barvili, ki so dovoljena za barvanje živil. Posamezna kozmetična sredstva je dovoljeno barvati z naslednjimi barvili:

Skupina	Trgovsko ime	C.I.1956
<u>RDEČA</u>		
B	Flaming Red	12 085
B	Alba Red	13 058
A	Ponceau SX	14 700
A	Lithol Rubin BN	15 850
B	Lackbordeaux N	15 880
B	Ponceau 2R	16 150
B	Dichlorofluorescein	45 365
B	Eosin YS	45 380
CDE	Eosin 5GI	45 370
B	Phloxine B	45 410
B	Erythrosine Yellowish NA	45 425
B	Toluidine Red	12 120
C	Ponceau 3RN	16 155
C	Pigment Scarlet Na	16 105
C	Amido Naphthol Red 6B	18 055
C	Crocein Scarlet N	27 290
CDE	Rhodamin B	45 170
CDE	Litholrot R	15 630
G	Braun Mauresque	77 491
CDE	Red 10B	17 200
CD	Sudanrot G	12 150
C	Permanentrot F-4 RA	12 420
D	Permanentcarmin FB	12 490
C	Bordeaux Red	14 830
C	Permanentrottoner NCR	15 525
CDE	Ponceau 3R	15 585
C	Permanentrot BB	15 865
CD	Pigment Red 65	18 020
D	Bengalrosa DCI	45 435
D	Bengalrosa	45 440
B	Alizarin	58 000

Skupina Trgovsko ime C.I.1956

BELA

G	Litopon	77 115
G	Kreda	77 220
G	Titandioksid	77 891
G	Cinkovo belilo	77 947
F	Biserna esenca	
G	Barit	77 120
G	Sadra	77 231
FG	Al, Zn, Mg-stearat	

MODRA

G	Ultramarin	77 007
C	Methylene Blue	52 015
C	Patent Blue AS	42 080
E	Patent Blue VF special	42 045

ZELENA

B	Alizarin Cyanine Green F	61 571
A	Light Green SF Yellowish	42 095
B	Quinizarin Green SS	61 565
G	$\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	77 288/89

ČRNA

G	Fe_3O_4	77 499
F	Aktivno oglje	77 266
B	Amidoschwarz loB	20 470

RJAVA

B	Resorcinbraun	20 170
G	Bronse	77 440
C	Sudanbraun B	12 010
C	Permanentbraun FG	12 480

Skupina Trgovsko ime C.I.1956

VIJOLIČASTA

A	Benzyl Violet 4B	42 640
C	Violamine R	45 190

ORANŽNA

CDE	Orange G	16 230
B	Orange GGN	15 980
CDE	Orange II	15 510
CD	Permanentrot GG	12 075

RUMENA

C	Naphtol Yellow S	10 316
C	Hansa Yellow	11 680
C	Hansa Orange	11 725
B	Quinoline Yellow SS	47 000
G	Cosmetic Umber N ^o 2781	77 492
C	Fluorescein	45 350
C	Methanil Yellow	13 065
C	Fast Light Yellow 3G	18 820
BD	Chrysoin S	14 270
CD	Sudangelb GRN	21 230
C	Hansagelb loG	11 710
C	Hansagelb GR	11 730

Z barvili, ki so navedena v drugem odstavku tega člena, je dovoljeno barvati naslednja kozmetična sredstva:

- 1) z barvili skupine A in B - vsakovrstna kozmetična sredstva
- 2) z barvili skupine C- sredstva, ki se uporabljajo samo za kožo
- 3) z barvili skupine D - rdečila za ustnice in sicer samo do 6 %
- 4) z barvili skupine E - sredstva za nego ust in zob, vendar jih sme biti v loo g gotovega izdelka največ 25 mg.

Barvila iz skupine F so barvila pridobljena iz naravnega materiala, barvila iz skupine G pa so neorganska barvila.

čl. 158 - četrty in peti odstavek

Pri izdelavi sredstev iz drugega in tretjega odstavka tega člena (milni praški in detergenti) so dovoljena tale optična belila:

Trgovsko ime	C.I.1956
Blancophor RG	40 600
Blancophor B	40 620
Tinopal B	40 630
Blankol WT	40 640
Uvitex GS	49 015
Kondenz. prod. cimetove ksl. z o-aminobenzentiolom	
Kondenz. prod. 2-metilbenzotiazola z benzaldehidom v navzočnosti $ZnCl_2$	

Sredstva iz 153., 156. člena ter iz prvega, drugega in tretjega odstavka tega člena je dovoljeno barvati z barvili iz 116. člena tega pravilnika pa tudi z naslednjimi barvili:

Trgovsko ime	C.I.1956
Pigmentgrün	74 255
Lithol Fast Red Toner R	12 455
Tinofil-brillant-blau	74 160
Pigmentblau 4	74 100
Indanthren brillantblau 4G	74 140
Durazol Blue 8G	74 180
Tinofil-brillant-grün	74 260

II. Pregled zakonodaje po svetu

a) barvila za živila

Pregled barvil s katerimi je dovoljeno barvati živila po posameznih državah, daje tabela št. 1. Tabela ni absolutno točna, ker ni bilo mogoče dobiti najnovejših podatkov za vse države; pa tudi če bi jih imel, bi bilo treba tabelo čez nekaj mesecev že popravljati, ker se zakonodaja živilskih barvil še ni ustalila. Nasprotno, pričakovati je, da bodo morale še mnoge države, ki posnemajo ZDA in Veliko Britanijo, skupaj z vzornikoma črtati iz seznama še nekaj barvil in jih zamenjati z manj škodljivimi.

Po dosedanjem stanju človeškega znanja imajo s toksikološkega stališča gledano najboljše sestavljene liste barvil države članice Evropske gospodarske skupnosti in države, ki so jih posnemale.

V ZDA so izdelali seznam barvil, ki naj bi ustrezala tehnološko in zdravstveno, že pred več kot 25 leti, ko kronično, ireverzibilno toksično delovanje večine barvil še ni bilo znano. Po dosedanjih spoznanjih pa je videti, da bodo morali seznam barvil za živila skoraj v celoti spremeniti. Skoraj v celoti pa veljajo še njihovi normativi za najvišje dovoljene koncentracije izhodnih snovi, intermediatov in drugih primesi v barvilih.

Velika Britanija je imela v začetku tudi precej samosvojih barvil, pozneje pa je čedalje bolj prevzemala barvila zapadnoevropske skupine. Sedaj se njena zakonodaja razlikuje od zapadnoevropske v glavnem po tem, da je v Veliki Britaniji dovoljena uporaba rjavih, neškodljivih barvil. Druge države ta barvila odklanjajo z motivacijo, da naj čokoladno rjava barva izvira iz čokolade, ne pa iz sintetičnih barvil. V tabeli št. 2 so prikazani zadnji trije sezname dovoljenih barvil v Veliki Britaniji, ker so spremembe

Tabela št. 1

Država / C. I. 1956		Trgovsko ime barvila	
		13015	Echtgelb
		19140	Tartrazin
		47005	Chinolingelb
		14720	Azorubin
		16185	Amaranth
		16255	Cochenillerot A
		14815	Scharlach GN
		45430	Erythrosin extra bläulich
		15985	Gelborange S
		73015	Indigotin I
		28440	Brilliant schwarz BN
		11920	Sudanorange G
		12150	Sudanrot G
		14270	Chrysoin S
		15980	Orange GGN
		16045	Echtrot E
		16290	Ponceau 6R
		14700	Ponceau SX
		16150	Ponceau R
		16155	Ponceau 3R
		18055	Alcionaphtholrot 6B
		17200	Echtsturefuchsin B
		18050	Alcionaphtholrot G
		16250	Kristallponceau
		15620	Echtrot A
		16190	Echtrot B
		14780	Thiazinrot
		42000	Malachitgrün
		42040	Brilliantgrün extra
		42045	Patentblau VP
		42051	Patentblau V
		42053	Past Green FCF
		42085	Guinea Green B
		42090	Patentblau AE
		42095	Light Green SF yellowish
		44090	Wellgrün 88
		42640	Hensyl Violet 4B
		42650	Acid Violet 4B (BNP)
		42535	Methylviolett B
		42685	Säurefuchsin S
		59800	Indanthrenblau RS
		10316	Naphtholgelb S
		11380	Yellow AB
		11390	Yellow U3
		13011	Yellow RFS
		14330	Yellow FY
		12740	C11 Yellow XP
		- - -	Chocolate Brown FB
		- - -	Brown FX
		20285	Chocolate Brown HF
		12055	Sudan I
		12141	Sudan II
		14600	Orange I
		12100	Orange SS
		16230	Orange GG
		11270	Chrysoidin
		15970	Ponceau 4GB
		- - -	Brilliantorange R
		41000	Auramin O
		35445	Schwarz 5410
		45170	Rhodamin B
		45380	Rosin
		- - -	Rosin 3
		45405	Phloxin F
		45435	Rose bengale
		- - -	Spritzblau
		42755	Fasserblau
		50405	Indolin
		58000	Alizarin
		- - -	Alizarinblau
		18695	Supralichtgelb GL
		45160	Rhodamin 6G
		42510	Fuchsin
		- - -	Schwarz 7984

Opomba : Podatki o državah brez letnice niso popolnoma zanesljivi.

značilne za vsi svet. Pričakovati je treba, da bodo temu vzgledu sledile še mnoge države, ki posnemajo Veliko Britanijo in ZDA.

Tabela št. 2

Barvila za barvanje živil v Veliki Britaniji

Barvila	1. 1957	1961	1964
Fast Red E	+	+	+
Brilliant Black BN	+	+	+
Azorubin	+	+	+
Ponceau 4R	+	+	+
Erythrosine	+	+	+
Amaranth	+	+	+
Gelborange S	+	+	+
Tartrazin	+	+	+
Indigotine	+	+	+
-----	-----	-----	-----
Chocolate Brown FB	+	+	+
Brown FK	+	+	+
Chocolate Brown HT	+	+	+
Oil Yellow XP	+	+	+
Acid Green G	+	+	+
-----	-----	-----	-----
Yellow RY	+	+	
Yellow RFS	+	+	
Naphthol Yellow S	+	+	
Ponceau 3R	+	+	
Ponceau SX	+	+	
Blue VRS	+	+	
-----	-----	-----	-----
Violet BNP	+		
Yellow 2G	+		
Red 10 G	+		

Barvila	1. 1957	1961	1964
Amidonaphthol Red G	+		
Sudan G	+		
Orange G	+		
Orange crocein	+		
Ponceau R	+		
Thiazin Red	+		
Amidonaphthol Red 6B	+		

b) Barvila za barvanje predmetov splošne rabe

Več kot 10 let so bile ZDA edine, ki so imele z zakonom urejeno barvanje kozmetičnih preparatov. Sledila jim je Zapadna Nemčija in za njo Evropska gospodarska skupnost. O drugih državah ni zanesljivih podatkov. V Jugoslaviji je urejal barvanje Pravilnik o zdravstvenem nadzorstvu nad predmeti splošne rabe. V svoji prvotni obliki je dovoljeval barvanje večine predmetov le z barvili za živila in nekaterimi anorganskimi pigmenti. V dveh letih je doživel veliko popravkov. Trenutno velja v taki obliki, kot je prepisan spredaj. Ker pa je med tem stopil v veljavo Temeljni zakon o zdravstvenem nadzorstvu nad predmeti splošne rabe, lahko pričakujemo, da se bo Pravilnik v kratkem precej spremenil; možne so tudi spremembe pri barvilih.

c) Barvanje farmacevtskih preparatov in zdravil

V številnih državah je to urejeno podobno kot barvanje živil in predmetov splošne rabe, le da so kriteriji pri zdravilih, ki se ne uživajo redno, milejši kot pri živilih in se ti izdelki lahko barvajo tudi z nekaterimi kozmetičnimi barvili (n.pr. v ZDA).

NALOGA DISERTACIJSKEGA DELA

Naloga mojega dela je bila izdelati analitske metode, s katerimi bo mogoče tudi s sredstvi, ki so na razpolago tudi laboratorijem, ki opravljajo analize živil in predmetov splošne rabe, ugotoviti, ali so ti izdelki obarvani v skladu z zahtevami zakonodaje.

Zakonodaja predvideva z ozirom na barvanje tri kategorije živil in predmetov splošne rabe:

- 1) izdelki, ki niso pobarvani in tisti, ki smejo biti pobarvani z dovoljenimi barvili - taki izdelki se smejo prodajati
- 2) izdelki, ki ne smejo biti pobarvani, a so kljub temu pobarvani z neškodljivimi barvili - taki izdelki se obravnavajo, kot da so ponarejeni ali pa da ne ustrezajo predpisom
- 3) izdelki, ki so pobarvani s škodljivimi barvili ali pa s prevelikimi količinami dovoljenih barvil - taki izdelki se obravnavajo kot zdravju škodljivi.

Ker se vsaka kategorija pravno bistveno drugače obravnava, mora analitik nedvoumno ugotoviti:

- 1) ali je izdelek umetno barvan ali ne
- 2) s katerimi barvili je pobarvan
- 3) kolikšna je koncentracija teh barvil

Da bi to ugotovil, bi bili potrebni ti-le analitski postopki:

- 1) dokaz prisotnosti umetnih barvil
- 2) izolacija barvil
- 3) ločitev barvil
- 4) identifikacija barvil
- 5) kvantitativna določitev barvil

Lastnosti sintetskih barvil so take, da je dostikrat mogoče ali celo potrebno, da se istočasno z dokazom prisotnosti barvila izvrši tudi delna ali popolna izo-

lacija in ločitev v posamezne skupine.

Prav tako je izolacija in ločitev že lahko del identifikacije barvila. Ker se večina analitskih postopkov vrši v raztopinah, so analitiki že zdavnaj ločili barvila v več skupin:

- 1) barvila topna v maščobah
- 2) barvila topna v vodi
- 3) laki in pigmenti, to je netopna v vodi in maščobah.

V svojem delu sem se te razdelitve držal, zlasti pri iskanju analitskih postopkov.

Za poznejšo uporabo pa se mi je zdelo, da je bolj primerno razdeliti barvila v več skupin glede na to, za kaj se smejo uporabljati.

I. PREGLEDNICA IN LASTNOSTI BARVIL

Barvila, ki se smejo uporabljati.

Pri barvilih za barvanje živil sem obdržal isti vrstni red, kot je naveden v zakonodaji. Barvila za barvanje predmetov splošne rabe sem razdelil v več skupin glede na uporabo, v teh skupinah sem jih razdelil na v vodi topna in v vodi netopna. V vsaki podskupini pa po barvi na rumena, oranžna, rdeča, modra, zelena, vijoličasta. Vse podatke, ki so važni pri ugotavljanju lastnosti in identitete barvil sem zbral v nekaj tabelah. Za osnovni kriterij identitete barvila sem izbral številko strukture po Colour Indexu 1956, ker se v naši zakonodaji kemično ime, trgovsko ime in številka po C.I. ne ujemajo vedno.

Najbolj drastičen primer:

<u>Kemično ime</u>	<u>Trgovsko ime</u>	<u>C.I.1956</u>
1-psevdokumilazo-2-naftol-3,6- disulfonska kislina in soli	Ponceau 3 RN	16 155
1-psevdokumilazo-2-naftol-3,6- disulfonska kislina in soli	Ponceau 3 R	15 585

V tabelah nisem navedel sinonimov; naštetih so v Colour Indexu 1956, nekateri pa tudi v Galenica Acta (157,158).

Vsebina tabel

Tabela št. 3

- 1) zaporedna številka barvila
- 2) topnostna skupina: V - barvilo je topno v vodi
M - barvilo je topno v maščobah
L - barvilo se uporablja v obliki lakov
P - barvilo je pigmentno
- 3) trgovsko ime: v glavnem sem se držal imen navedenih v zakonodaji; le v primerih, ko se ime in številka v C.I.1956 nista ujemala, sem uporabil ime, ki je za barvilo s to strukturo najbolj pogosto v rabi.
- 4) zakaj se sme barvilo uporabljati:
A in B - za barvanje vsakovrstnih kozmetičnih sredstev
C - za barvanje sredstev, ki se uporabljajo samo za kožo
D - za barvanje rdečil za ustnice (samo do 6 %)
E - za barvanje sredstev za nego ust in zob (do 25 mg/100 g)
Z - za barvanje jajc, štamplik za meso, skorje sira in ovitkov za suhomesnate proizvode
Ž - za barvanje živil
- 5) številka po Colour Indexu
- 6) proizvajalec vzorca barvila, ki sem ga uporabljal
BASF Badische Anilin- und Sodafabrik
Bayer Farbenfabriken Bayer

CIBA	
D&H	Durand & Huguenin (Basel)
ICI	Imperial Chemical Industries
Kem	Kemika Zagreb
R.H.	Riedel de Haën

Tabela št. 4

- 1) zaporedna številka barvila in ime
 - 2) strukturna formula po C.I.1956
 - 3) λ_{\max} v CHCl_3
 - 4) topnost: a/ barvilo je topno v teh topilih:
b/ barvilo ni topno v teh topilih:
- navedena so le najvažnejša topila za barvila, ki se ne topijo v vodi in maščobah.

Tabela št. 3

Št.	Topnost	Trgovsko ime	Uporaba	C.I.1956	Proizv.
1	V	Echtgelb	Ž	13 015	Bayer
2	V	Tartrazin	Ž	19 140	D&H
3	V	Chinolingelb	Ž	47 005	D&H
4	V	Azorubin	Ž	14 720	D&H
5	V	Amaranth	Ž	16 185	D&H Bayer
6	V	Cochenillerot A	Ž	16 255	D&H Bayer
7	V	Scharach GN	Ž	14 815	Bayer
8	V	Erytrosin extra	Ž	45 430	D&H
9	V	Gelborange S	Ž	15 985	D&H
10	V	Indigotin IA	Ž	73 015	D&H BASF Ciba ICI
11	V	Brilliantsschwarz BN	Ž	28 440	D&H Bayer

Št.	Top- nost	Trgovsko ime	Upor.	C.I.1956	Pro- izv.
12	M	Sudanorange G	Ž	11 920	BASF
13	M	Sudanrot G	Ž, C, D	12 150	BASF Bayer
14	V	Methylviolette	Z	42 535	BASF
15	V	Victoriablau R	Z	44 040	BASF
16	V	Victoriablau B	Z	44 045	BASF
17	V	Brilliantgrün	Z	42 040	neznan
18	V	Brilliantcrocein MOO	Z, C	27 290	D&H
19	V	Brilliantgrünblau FFR	Z	42 735	
20	V	Alkali Echtgrün 10G	Z	42 170	
21	V	Naphtolgrün B	Z	10 020	BASF D&H
22	V	Chrysoin S	B, D	14 270	Bayer Kem
23	V	Orange GGN	B	15 980	Bayer
24	V	Ponceau SX	A	14 700	
25	L	Lithol Rubin BN	A	15 850	BASF D&H
26	L	Lack Bordeaux N	B	15 880	D&H
27	V	Ponceau 2R	B	16 150	Bayer ICI
28	V	Alba Red	B	13 058	
29	V	Dichlorofluorescein	B	45 365	Kem
30	V	Eosin YS	B	45 380	D&H
31	V	Phloxine B	B	45 410	D&H
32	V	Erytrosine Yellowish	B	45 425	D&H
33	V	Resorcine Brown	B	20 170	neznan
34	V	Amidoschwarz 10 B	B	20 470	Kem
35	V	Light Green CF Yellowish A		42 095	Bayer
36	V	Benzyl Violet 4B	A	42 640	Bayer
37	M	Chinolingelb SS	B	47 000	
38	P	Flaming Red	B	12 085	D&H
39	P	Toluidine Red	B	12 120	D&H
40	M	Alizarin Cyanine Green F	B	61 570	
41	M	Quinizarin Green SS	B	61 565	

Št.	Top- nost	Trgovsko ime	Upor.	C.I.1956	Pro- izv.
42	V	Naphtholgelb S	C	10 316	neznan
43	V	Methanil gelb	C	13 065	D&H
44	V	Fast Light Yellow 3G	C	18 820	
45	V	Fluorescein	C	45 350	D&H
46	V	Orange II	C, D, E	15 510	sinteza
47	V	Orange G	C, D, E	16 230	D&H
48	V	Eosin 5GI	C, D, E	45 370	D&H
49	V	Rhodamin B	C, D, E	45 170	neznan
50	V	Ponceau 3R	C	16 155	neznan
51	V	Pigment Scarlet Na	C	16 105	
52	V	Red 6B	C	18 055	
53	V	Bordeaux Red	C	14 830	
54	L	Permanentrottoner NCR	C	15 525	
55	L	Permanentrot BB	C	15 865	
56	L	Litholrot R	C, D, E	15 630	D&H
57	V	Red 10B	C, D, E	17 200	
58	L	Lake Red C	C, D, E	15 585	
59	L	Pigmentrot 65	C, D	18 020	
60	V	Methylene Blue	C	52 015	R.H.
61	V	Patent Blue AS	C	42 080	
62	V	Violamine R	C	45 190	BASF
<hr/>					
63	P	Hansa Yellow	C	11 680	D&H
64	P	Hansa Orange	C	11 725	
65	P	Hansagelb 10G	C	11 710	
66	P	Hansagelb GR	C	11 730	
67	M	Sudangelb GRN	C, D	21 230	Bayer
68	M	Permanentrot GG	C, D	12 075	
69	M	Permanentrot F-4 RA	C	12 420	
70	M	Sudanbraun B	C	12 010	D&H Bayer
71	M	Permanentbraun FG	C	12 480	
<hr/>					
72	V	Bengal rosa DCI	D	45 435	
73	V	Bengal rosa	D	45 440	D&H
74	M	Alizarin	D	58 000	Kem
75	M	Permanentcarmin FB	D	12 490	

Št.	Top-nost	Trgovsko ime	Uper.	C.I.1956	Pro-izv.
76	V	Patent Blue VF	E	42 045	ICI nezn.
77	P	Lithol Fast Red Toner R		12 455	
78	P	Pigmentgrün		74 255	
79	P	Tinofilbrillantblau		74 160	BASF
80	P	Pigmentblau 4		74 100	BASF
81	P	Indanthren brillantblau 4G		74 140	
82	V	Durazol Blue 8G		74 180	D&H BASF
83	P	Tinofilbrillantgrün		74 260	BASF

Op.: Barvila št. 77 do 83 se smejo uporabljati le za barvanje pralnih in čistilnih sredstev.

Za primerjavo sem včasih uporabljal tudi naslednja barvila. Uporaba teh barvil pri nas ni dovoljena, razen nekaterih barvil iz mešanic (št. 175, 176, 180, 182).

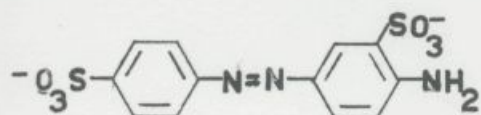
Št.	Top-nost	Trgovsko ime	C.I.1956	Proizv.
111	V	Brilliantorange GN	15 970	Bayer
118	V	Echtrot E	16 045	Bayer
125	V	Ponceau 6R	16 290	Bayer
145	V	Schwarz 54lo	35 445	nezn.
153	V	Patentblau AE	42 090	nezn.
154	V	Patentblau V		nezn.
155	V	Patentblau V	42 051	D&H
170	V	Kristallviolett	42 555	Kem
175	V	Jodo Eosin		Coleman & Bell
176	V	Eosin plavkasti		Kem
178	V	Phloxine P	45 405	D&H
180	V	Bengalroza		Kem
181	V	Chrysolin	45 360	D&H
182	V	Phloxine		nezn.

Št. nost	Top- nost	Trgovsko ime	C.I.1956	Proizv.
188	M	Ceresblau GN		
190	M	Sudanblau II		D&H BASF
191	M	Frobenogelb GL		D&H
192	M	Ceresgelb RRN		
	V	Edicol Supra Pea Green H		ICI

Tabela št. 4

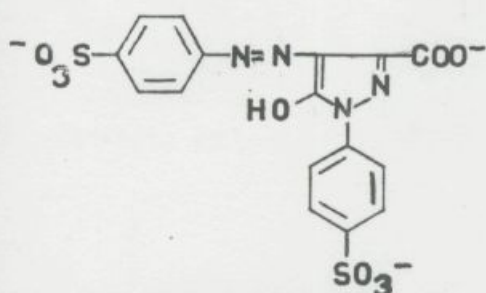
1) Echtgelb

$$\lambda_{\max} = 390 \text{ m}\mu$$



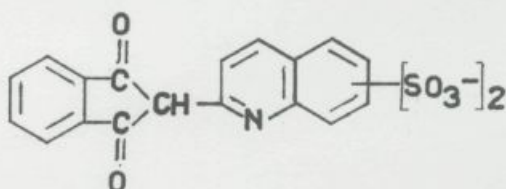
2) Tartrazin

$$\lambda_{\max} = 435, 850 \text{ m}\mu$$



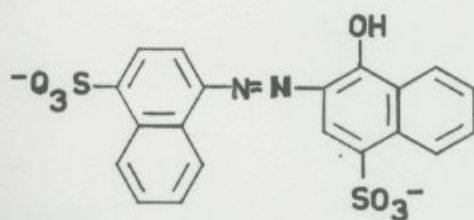
3) Chinolingelb

$$\lambda_{\max} = 423 \text{ m}\mu$$



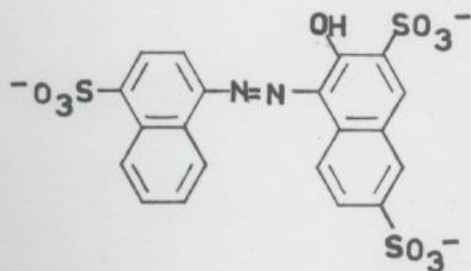
4) Azorubin S

$$\lambda_{\max} = 525 \text{ m}\mu$$



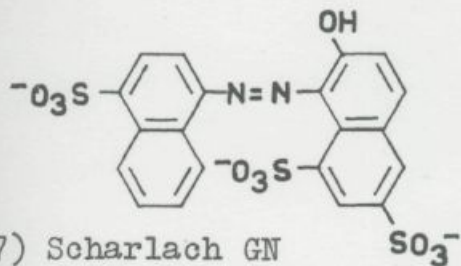
5) Amarant

$$\lambda_{\max} = 525 \mu$$



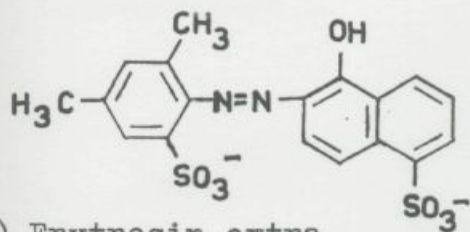
6) Cochenillerot A

$$\lambda_{\max} = 515 \text{ m}\mu$$



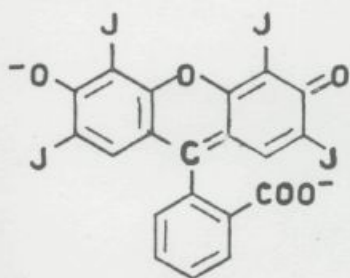
7) Scharlach GN

$$\lambda_{\max} = 493 \text{ m}\mu$$



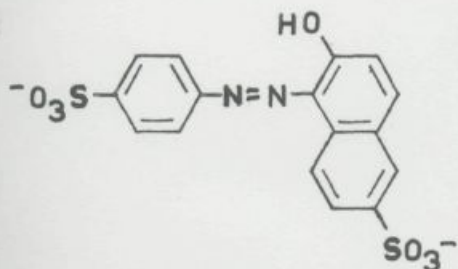
8) Erytrosin extra

$$\lambda_{\max} = 400 \text{ m}\mu$$



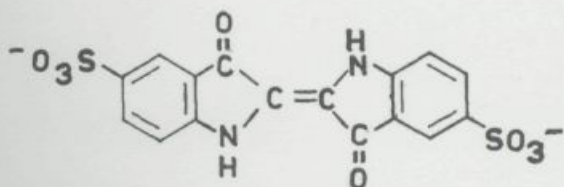
9) Gelborange S

$$\lambda_{\max} = 490 \text{ m}\mu$$



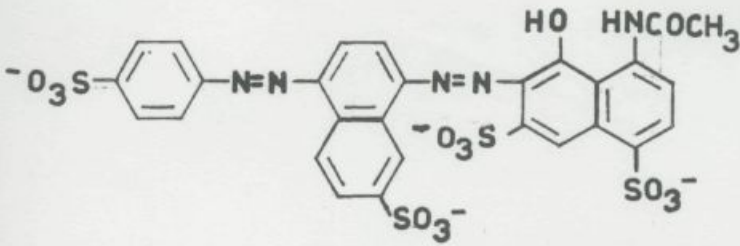
10) Indigotin IA

$$\lambda_{\max} = 605 \text{ m}\mu$$



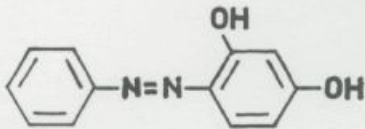
11) Brilliantschwarz BN

$\lambda_{\max} = 415,585 \text{ m}\mu$



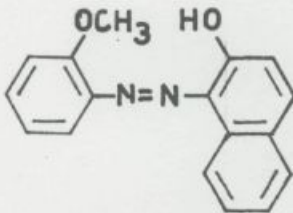
12) Sudanorange G

$\lambda_{\max} = 390 \text{ m}\mu$

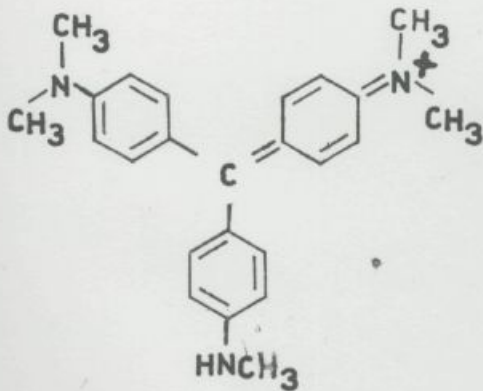


13) Sudanrot G

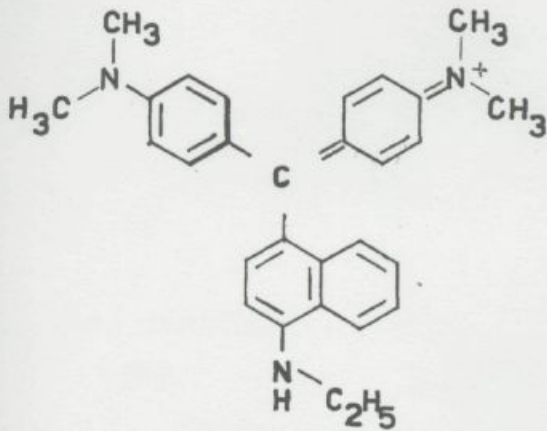
$\lambda_{\max} = 500, 850 \text{ m}\mu$



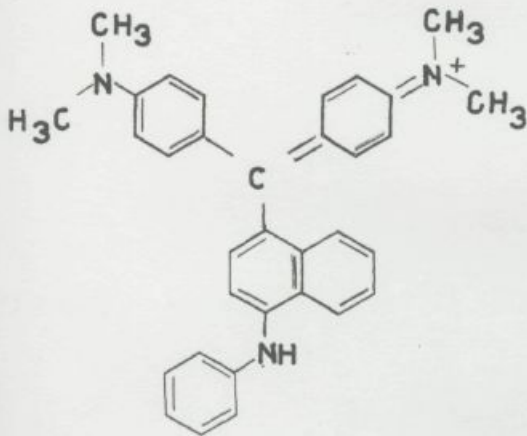
14) Methylviolette



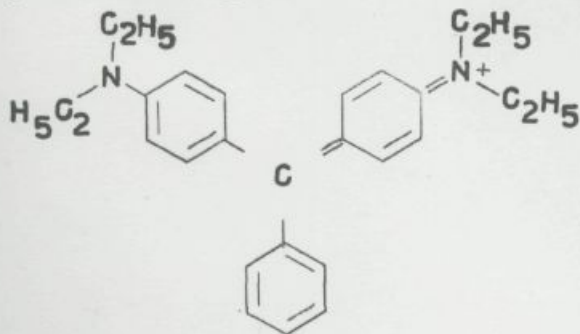
15) Victoriablau R



16) Victoriablau B

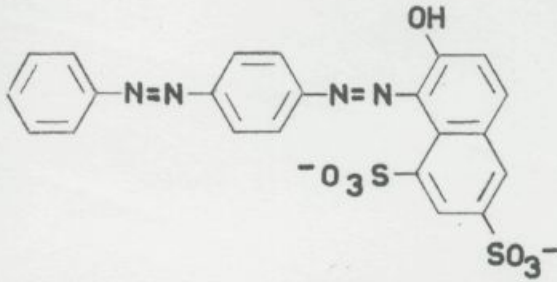


17) Brilliantgrün

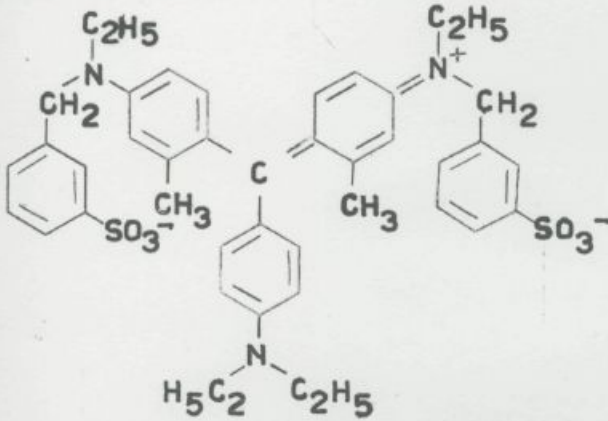


18) Brilliantcrocein MOO

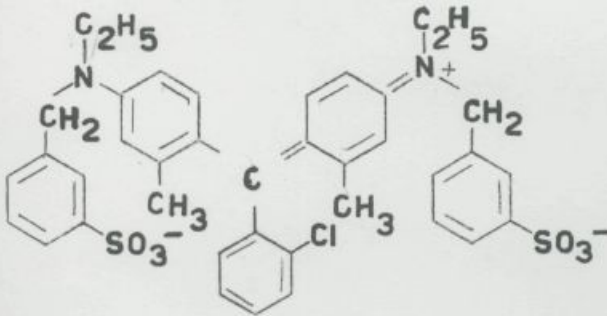
$\lambda_{\max} = 350, 523 \text{ m}\mu$



19) Brilliantgrünblau FFR

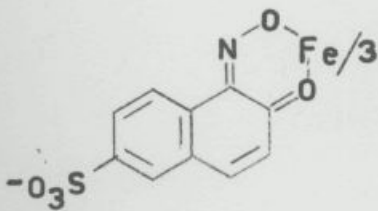


20) Alkali Echtgrün 10G



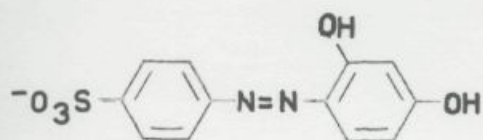
21) Naphtolgrün B

$\lambda_{\max} = 350, 660 \text{ m}\mu$



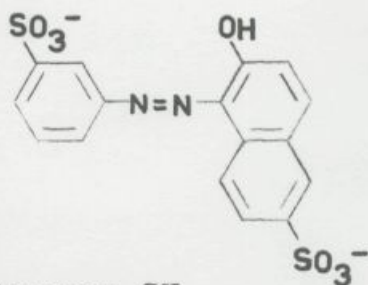
22) Chrysoin S

$$\lambda_{\max} = 427 \text{ m}\mu$$

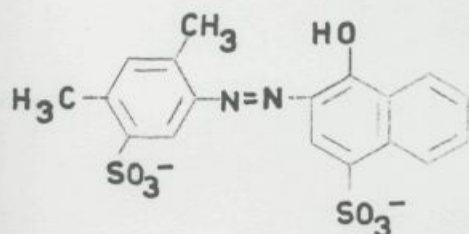


23) Orange GGN

$$\lambda_{\max} = 482, 905 \text{ m}\mu$$

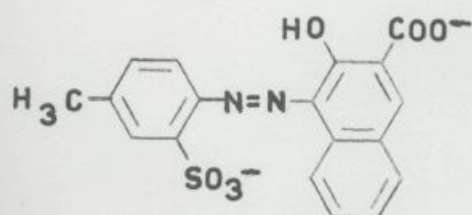


24) Ponceau SX



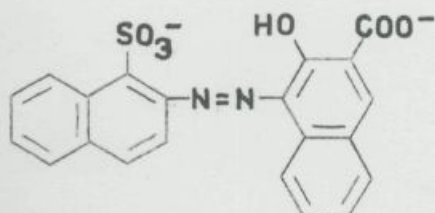
25) Lithol Rubin BN

$$\lambda_{\max} = 492, 900 \text{ m}\mu$$



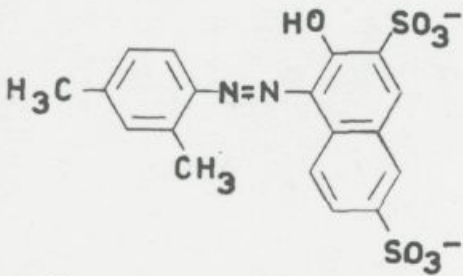
26) Lack Bordeaux N

$$\lambda_{\max} = 497, 880 \text{ m}\mu$$

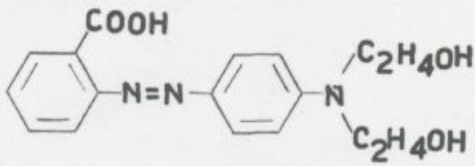


27) Ponceau 2R

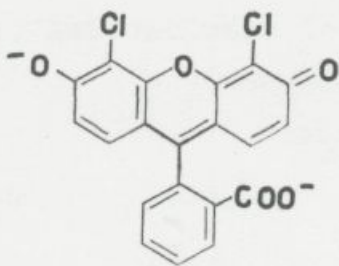
$\lambda_{\max} = 497, 1010 \text{ m}\mu$



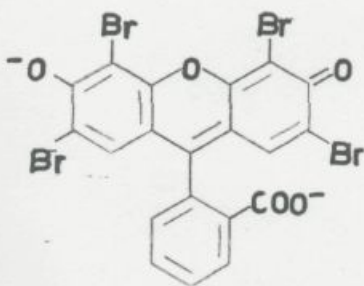
28) Alba Red



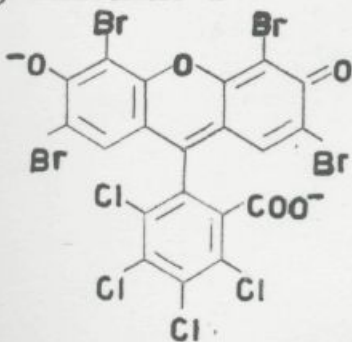
29) Dichlorofluorescein



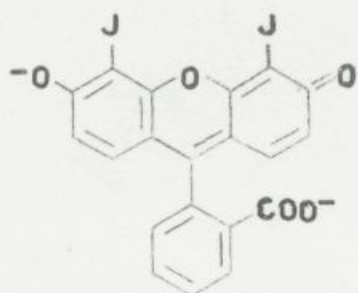
30) Eosin YS



31) Phloxine B

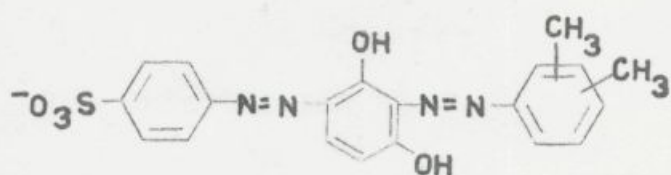


32) Erytrosine Yellowish



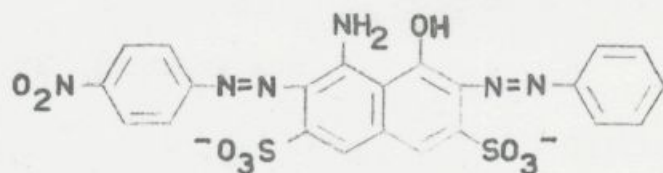
33) Resorcine Brown

$$\lambda_{\max} = 448 \text{ m}\mu$$



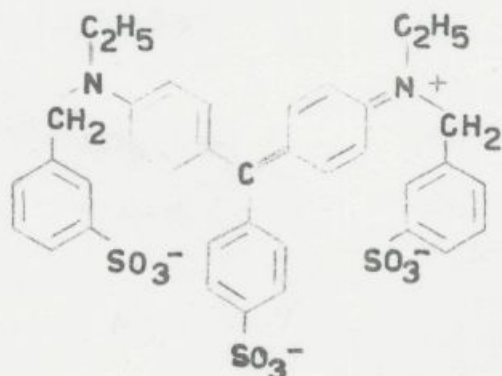
34) Amidoschwarz 10 B

$$\lambda_{\max} = 450, 620 \text{ m}\mu$$



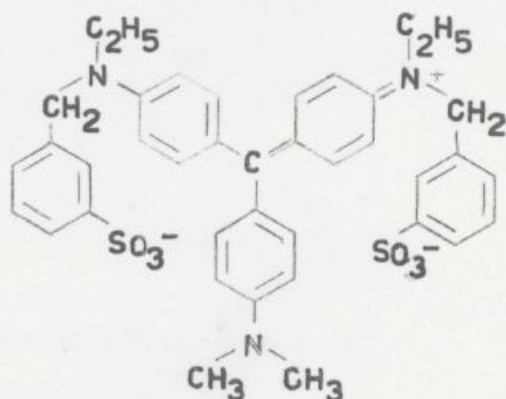
35) Light Green CF Yellowish

$$\lambda_{\max} = 440, 610 \text{ m}\mu$$

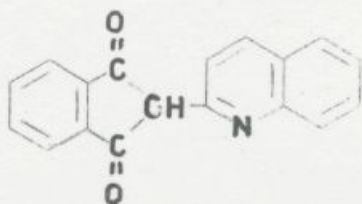


36) Benzyl Violet 4B

$\lambda_{\text{max}} = 585 \text{ m}\mu$

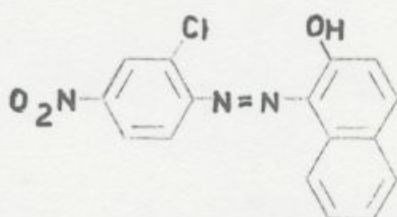


37) Chinolingelb SS



38) Flaming Red

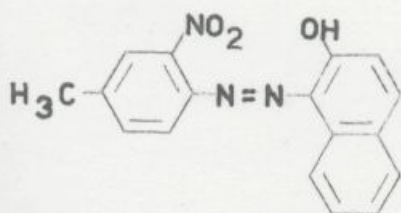
$\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ m}\mu$



- a) Kloroform, metilenklorid, etanolamin, dimetilformamid
- b) CCl_4 , n-butanol, aceton

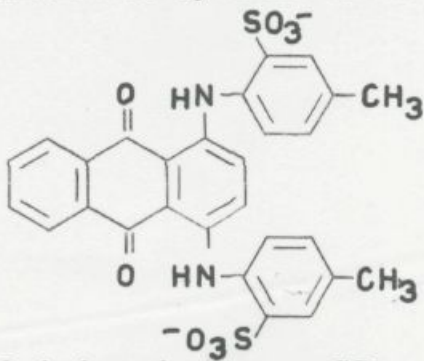
39) Toluidine Red

$\lambda_{\text{max}} = 505, 855 \text{ m}\mu$

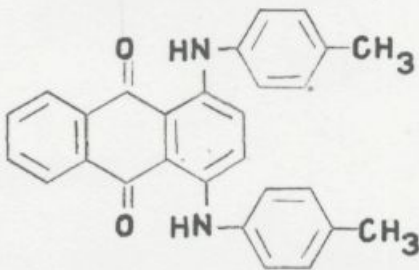


- a) Benzen, kloroform, metilenklorid, piridin
- b) n-butanol, etanolamin, dimetilformamid

40) Alizarin Cyanine Green F

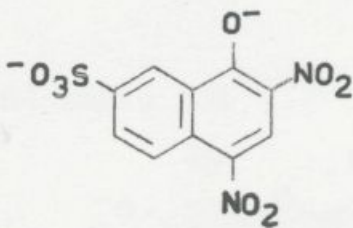


41) Quinizarin Green SS



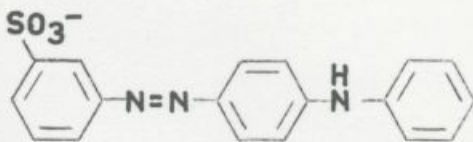
42) Naphtolgelb S

$$\lambda_{\max} = 437 \text{ m}\mu$$

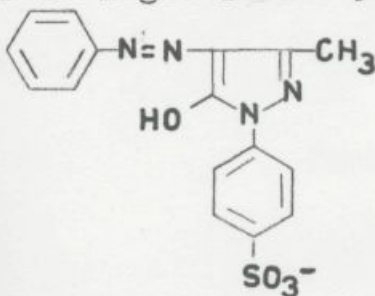


43) Methanilgelb

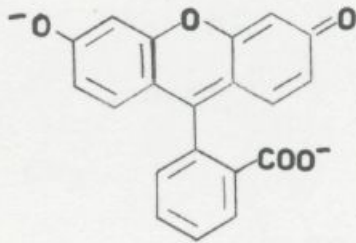
$$\lambda_{\max} = 400 \text{ m}\mu$$



44) Fast Light Yellow 3G

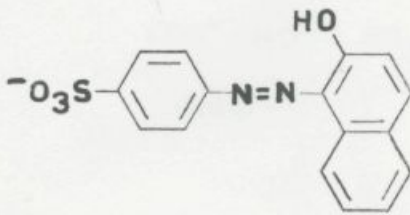


45) Fluorescein



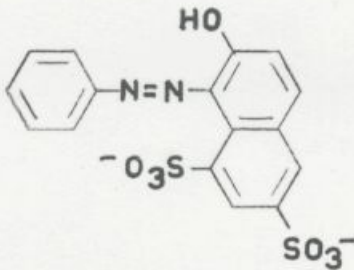
46) Orange II

$$\lambda_{\max} = 487, 850 \text{ m}\mu$$

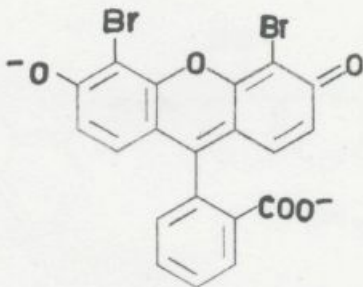


47) Orange G

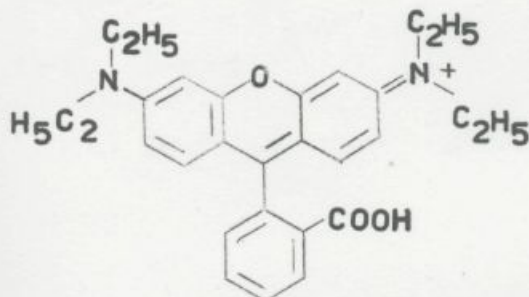
$$\lambda_{\max} = 500 \text{ m}\mu$$



48) Eosin 5GI

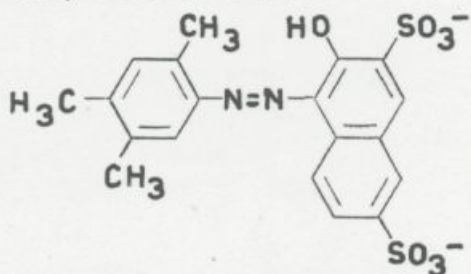


49) Rhodamin B

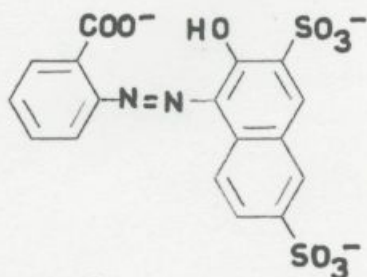


50) Ponceau 3R

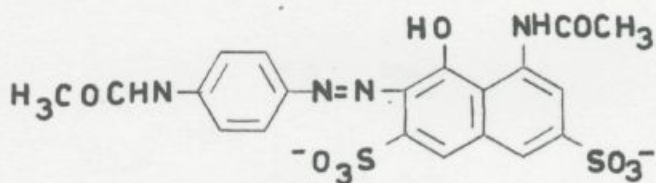
$\lambda_{\text{max}} = 502, 880 \text{ m}\mu$



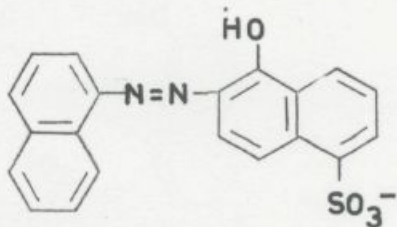
51) Pigment Scarlet Na



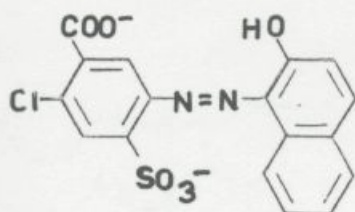
52) Red 6B



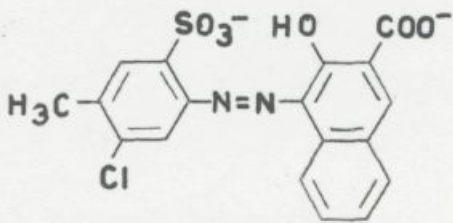
53) Bordeaux Red



54) Permanentrottoner NCR

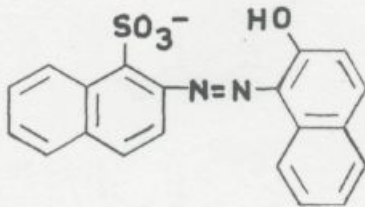


55) Permanentrot BB

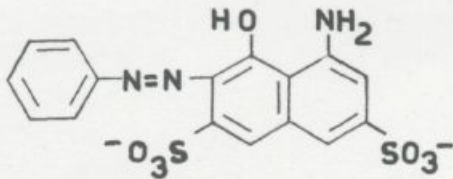


56) Litholrot R

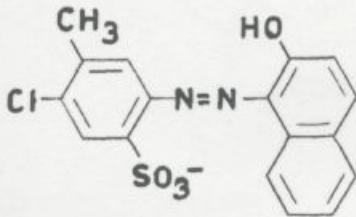
$\lambda_{\text{max}} = 495, 880 \text{ m}\mu$



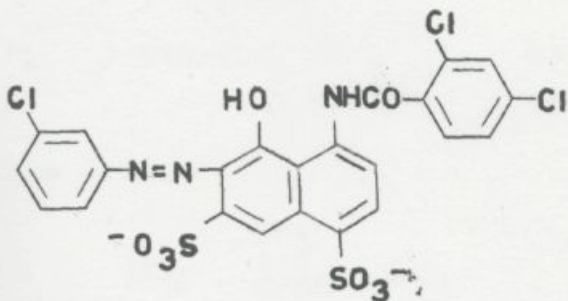
57) Rot lo B



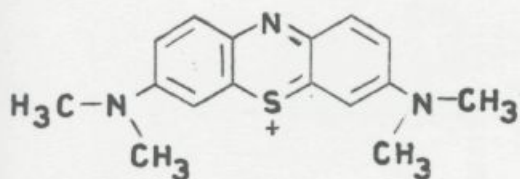
58) Lake Red C



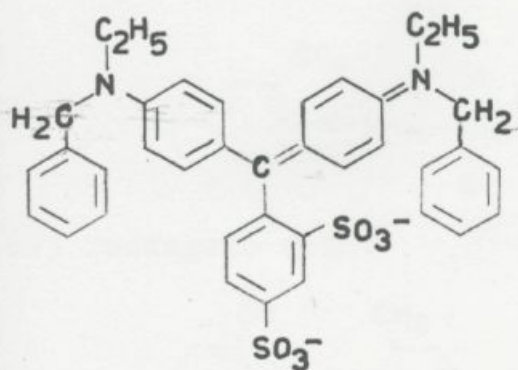
59) Pigmentrot 65



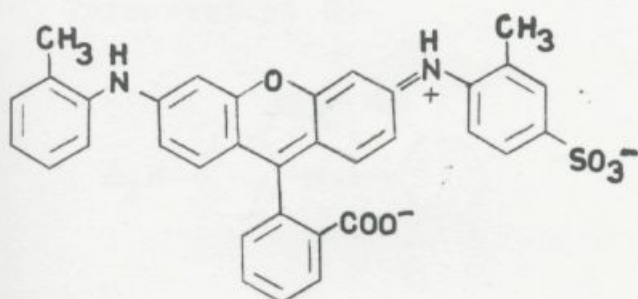
60) Methylene Blue



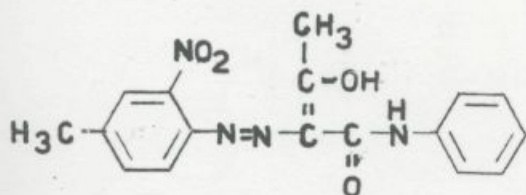
61) Patent Blue AS



62) Violamine R



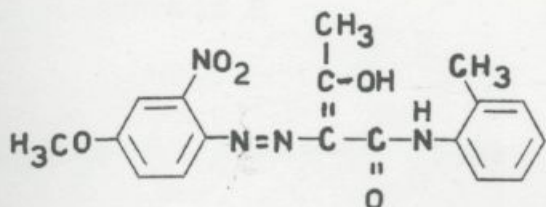
63) Hansa Yellow



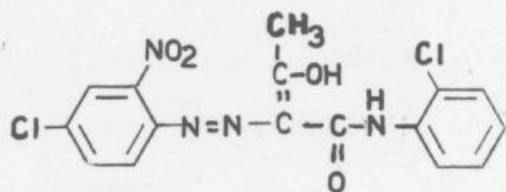
$\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ m}\mu$

- a) klorbenzen, trikloretilen, kloroform, metilenklorid, etanolamin
- b) cikloheksan, etilacetat, n-butanol

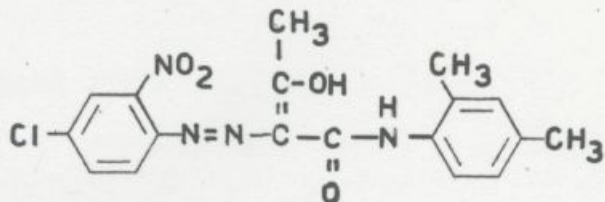
64) Hansa Orange



65) Hansagelb 1oG

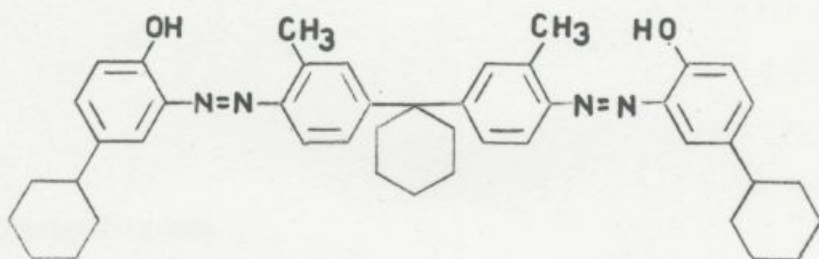


66) Hansagelb GR

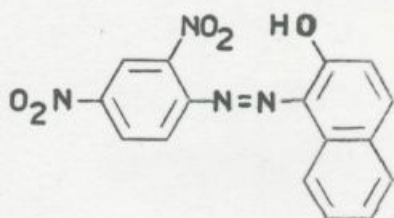


67) Sudangelb GRN

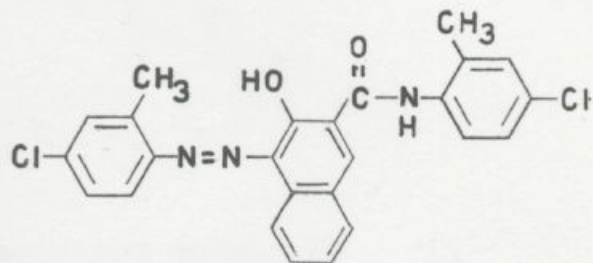
$\lambda_{\max} = 350 \text{ m}\mu$



68) Permanentrot GG

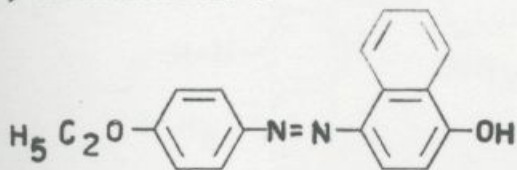


69) Permanentrot F-4 RA

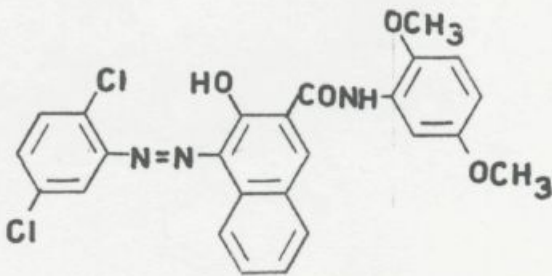


70) Sudanbraun B

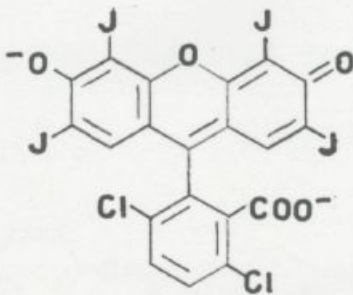
$\lambda_{\max} = 395 \text{ m}\mu$



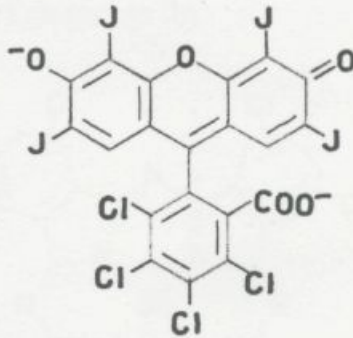
71) Permanentbraun FG



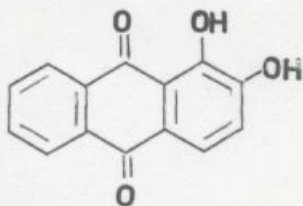
72) Bengal rosa DCI



73) Bengal rosa

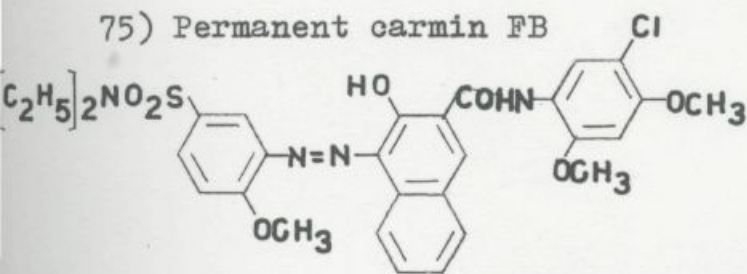


74) Alizarin

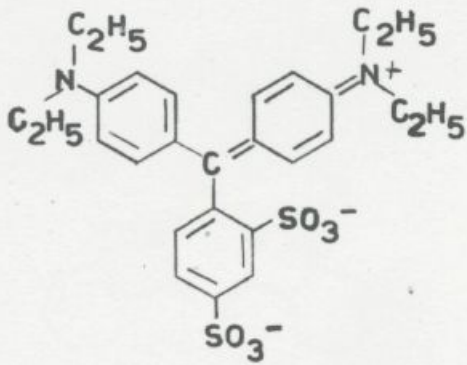


$$\lambda_{\max} = 430 \text{ m}\mu$$

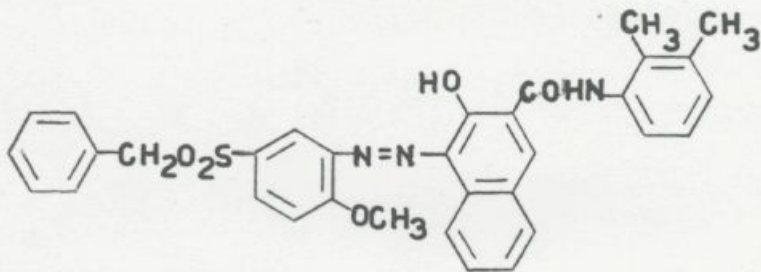
75) Permanent carmin FB



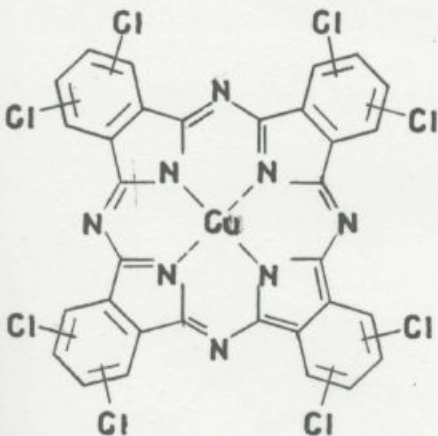
76) Patent Blue VF



77) Lithol Fast Red Toner R

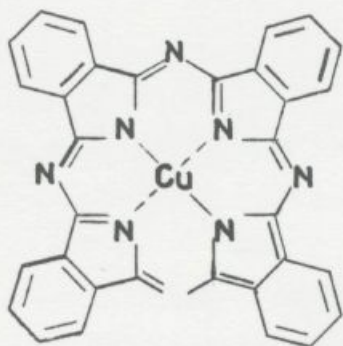


78) Pigmentgrün



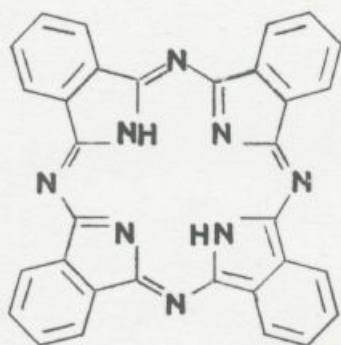
79) Tinofilbrillantblau

- a) H_2SO_4 , slabo kinolin
- b) običajna organska topila

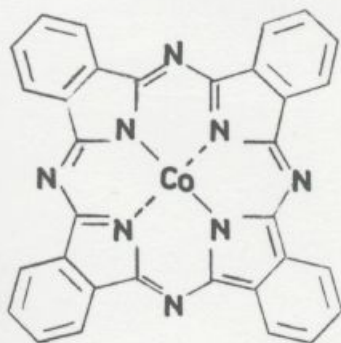


80) Pigmentblau 4

- a) H_2SO_4 , slabo kinolin
- b) običajna organska topila

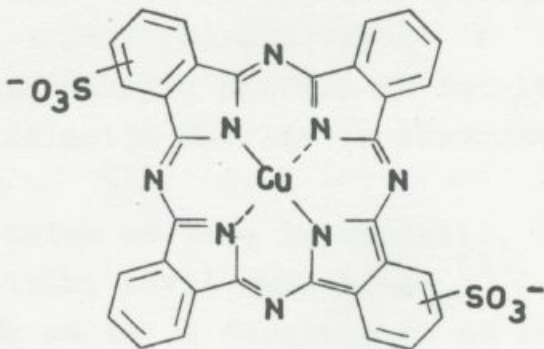


81) Indanthren brillantblau 4G



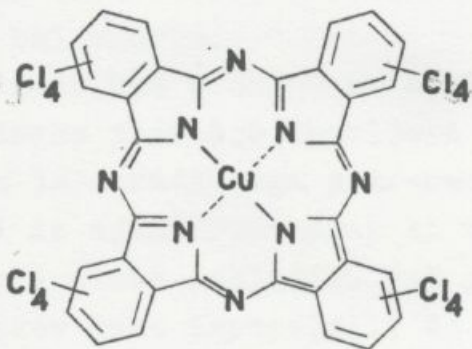
82) Durazol Blue 8G

- a) H_2SO_4 , voda
- b) alkoholi, ketoni



83) Tinofilbrillantgrün

- a) H_2SO_4 , slabo kinolin
- b) običajna organska topila



II. DOKAZ PRISOTNOSTI IN IZOLACIJA SINTETSKIH BARVIL

Številni avtorji so se opredelili pri analizi živil za tale vrstni red postopkov:

- 1/ ekstrakcija barvila iz izdelka
- 2/ izolacija barvila iz ekstrakta

Ta sistem so tako izpopolnili, da navajajo vsa dela o analitiki živil samo njega (15, 101, 137, 160, 165).

Vzrok za to je dejstvo, da za izolacijo barvil iz ekstraktov uporabljajo le po en sam postopek, ki ga številne v živilih prisotne snovi otežkočajo ali celo onemogočajo. Kljub uporabi predhodne ekstrakcije pa nobeden od teh postopkov ni uporaben za izolacijo v vodi topnih barvil iz vseh vrst živil, zlasti ne iz tistih, ki vsebujejo mnogo beljakovin.

To je zelo hud problem za analitike v državah, kjer imajo predpisane najvišje dovoljene koncentracije barvil v živilih in je zaradi tega potrebno barvila kvantitativno izolirati iz njih. Postopka, ki bi to omogočal, doslej v literaturi nisem zasledil. Pač pa sem enega od objavljenih postopkov tako izpopolnil, da sem lahko izoliral barvila tudi iz mesnih in mlečnih izdelkov in to direktno, brez predhodne ekstrakcije. Zato smatram, da sta dve stopnji pri izolaciji v vodi topnih barvil iz živil odveč. Pri izolaciji v maščobah topnih barvil pa sta slej ko prej nujno potrebni, ker drugače ni mogoče dobiti čistih ekstraktov.

Večina, tudi najnovejših postopkov za analizo predmetov splošne rabe ⁽¹³⁴⁾, je prirejena za ugotavljanje osnovnih sestavin izdelkov in možnosti za izolacijo nekaterih barvil samo omenjajo.

Izrecno z izolacijo barvil sta se bavila le Deshusses in Desbaumes (32, 33, 34, 35, 36); njune postopke so potem povzeli nekateri drugi avtorji. Ti postopki ne zajemajo vseh barvil, poleg tega pa zaradi uvedbe številnih novih

surovin niso več zmeraj uporabni.

Medtem ko sem uspel izdelati univerzalen postopek za izolacijo barvil direktno iz živil, mi to pri predmetih splošne rabe ni povsod uspelo, ker en sam postopek za izolacijo vseh vrst barvil ni primeren. Pomagati sem si moral z izolacijami iz ekstraktov, ki vsebujejo le po eno skupino barvil.

Zato sem zgoraj omenjeni vrstni red postopkov obdržal.

A) I z o l a c i j a i z i z d e l k o v -
p r i p r a v a s u r o v i h e k s t r a k t o v

V literaturi (15, 101, 137, 160, 165) so obširno opisani postopki kako pripraviti nekatera živila za dokaz in izolacijo barvil (izdelki pod št. 1, 2, 3 in 4). Vsi ti postopki se izredno malo razlikujejo med seboj, so enostavni in popolnoma zadovoljivi, zato jih nisem poskušal spreminjati ali komplicirati.

Objavljenih je bilo tudi nekaj postopkov za pripravo izdelkov pod št.:

5 - mastni izdelki (15, 160, 209, 225)

6 - mlečni, jajčni in podobni izdelki (61, 187, 193, 209, 225)

8 - šminke, kreme za kožo in podobni izdelki (23, 32, 33, 83, 134, 147, 180, 200)

9 - laki za nohte in podobni izdelki (133, 134)

10 - izdelki s površinsko aktivnimi snovmi (34, 35)

Ti postopki niso popolnoma zadovoljivi, zato sem nekatere modificiral (št. 5 in 6), vse ostale pa čisto na novo izdelal. Vse postopke sem preiskusil na izdelkih, ki so v prodaji pri nas ali pa tudi v tujini. Pričakujem, da bo treba marsikateri postopek sčasoma spremeniti, ker proizvaja industrija vedno nove surovine (zlasti za kozmetične izdelke), med katerimi so lahko tudi take, ki močno vpli-

vajo na uspešnost postopkov.

Po mojih ugotovitvah so najbolj primerni tile postopki:

1) Izdelki - vodne raztopine, ki ne vsebujejo maščob in beljakovin (alkoholne in brezalkoholne pijače, sirupi, sadni sokovi, bistri sadni sladoledi, kolonjska voda in podobni izdelki):

Iz njih je treba izgnati eventualno prisotni alkohol, jih po potrebi filtrirati, razredčiti z vodo in raztopina je pripravljena za postopek.

2) Izdelki, ki se v vodi raztopijo (bonbonski izdelki, marmelade, džemi, nekatere soli za kopanje in podobni izdelki):

Izdelek je treba raztopiti v vodi in po potrebi filtrirati ali centrifugirati. Pektini se oborijo z dvojnem volumnom alkohola ali acetona, ev. ob dodatku 1 % CaCl_2 . Organska topila pozneje izženemo in raztopina je pripravljena za nadaljnjo analizo.

3) Brezmastni izdelki iz škroba (praški za: pudinge, sladolede, pecivo; pecivo, testenine in drugi izdelki)

Izdelek je treba dobro zdrobiti. Barvila lahko ekstrahiramo:

- a) s 5 %-NH₄ v cca 70 %-tnem metanolu, etanolu ali acetonu in tako dobljeno raztopino barvil analiziramo dalje.
- b) staremo z 2n HCl v pasto in ekstrahiramo z n-butanolom ali izoamilalkoholom - včasih ne gre kvantitativno (beljakovine); ekstrakt uporabimo za analizo.
- c) s pomočjo kationskih detergentov v kloroform (glej str. 84).

4) Masti in olja:

Raztopimo jih v petroletru, raztopino očistimo in iz nje izoliramo barvila.

5) Mastni izdelki:

a) mastno pecivo in podobni izdelki:

Izdelek je treba primerno posušiti, zdrobiti, nato pa temeljito ekstrahirati maščobe s petroletrom. Petroleterski ekstrakt preiščemo na prisotnost v maščobah topnih barvil. Iz trdnega preostanka po ekstrakciji izoliramo barvila tako, kot je opisano v točki 3).

Če je v izdelku le malo snovi, ki z vodo nabrekajo (škrob, želatina in podobno), lahko tudi izdelek dobro pomešan z vodo ali razredčenim alkoholom (acetonom) kuhamo na vodni kopeli, da maščobe splavajo na površino, odkoder jih po ohladitvi posnamemo. Suspenzijo preostalih snovi ekstrahiramo s petroletrom, nato pa v njem raztopimo posneto maščobo, raztopino speremo z vodo. Vodne faze združimo in še enkrat ekstrahiramo s petroletrom ali s kloroformom, ki pa ga moramo odpariti in ostanek topiti v petroletru. Suspenzijo preiskujemo naprej glede na to, kakšne so njene sestavine.

b) mesni izdelki:

Iz mesnih izdelkov odstranimo maščobo s kuhanjem ali ekstrakcijo s petroletrom, blokiramo beljakovine s formaldehidom in ekstrahiramo barvilo n.pr. po postopku s kloroformom (glej str. 84).

- 6) Mlečni, jajčni in podobni izdelki: a) maslo, sir, palačinke v prahu, suha paprika
- b) sladoledi, kreme, emulzijski likerji

a) Te izdelke najprej temeljito ekstrahiramo s kloroformom, nato jih navlažimo z 2n HCl, spet temeljito ekstrahiramo s CHCl_3 , dokler se kaj topi v njem. Ekstrakte združimo, odparimo kloroform, topimo v petroletru in dokazujemo v maščobah topna barvila. Preostanek naalkalimo do pH 9, blokiramo beljakovine s formaldehidom in po dodatku prebitka asepsola ekstrahiramo kislja barvila v kloroform.

b) Izpustimo obdelovanje s HCl.

7) Jajčne lupine, žigi in podobno:

a) Lupine raztopimo v HCl, nato pa barvila izoliramo v organska topila iz kisle, po potrebi (bazična barvila!) pa tudi iz alkalne raztopine.

b) Žige zbrišemo z vato namočeno v alkohol, jo izperemo s petroletrom in barvilo raztopimo v primernem topilu (n.pr. alkoholu). Ali pa izrežemo žigosane dele in izoliramo barvilo po postopku, ki je za te izdelke najbolj primeren.

8) Šminke, kreme za kožo in podobni izdelki:

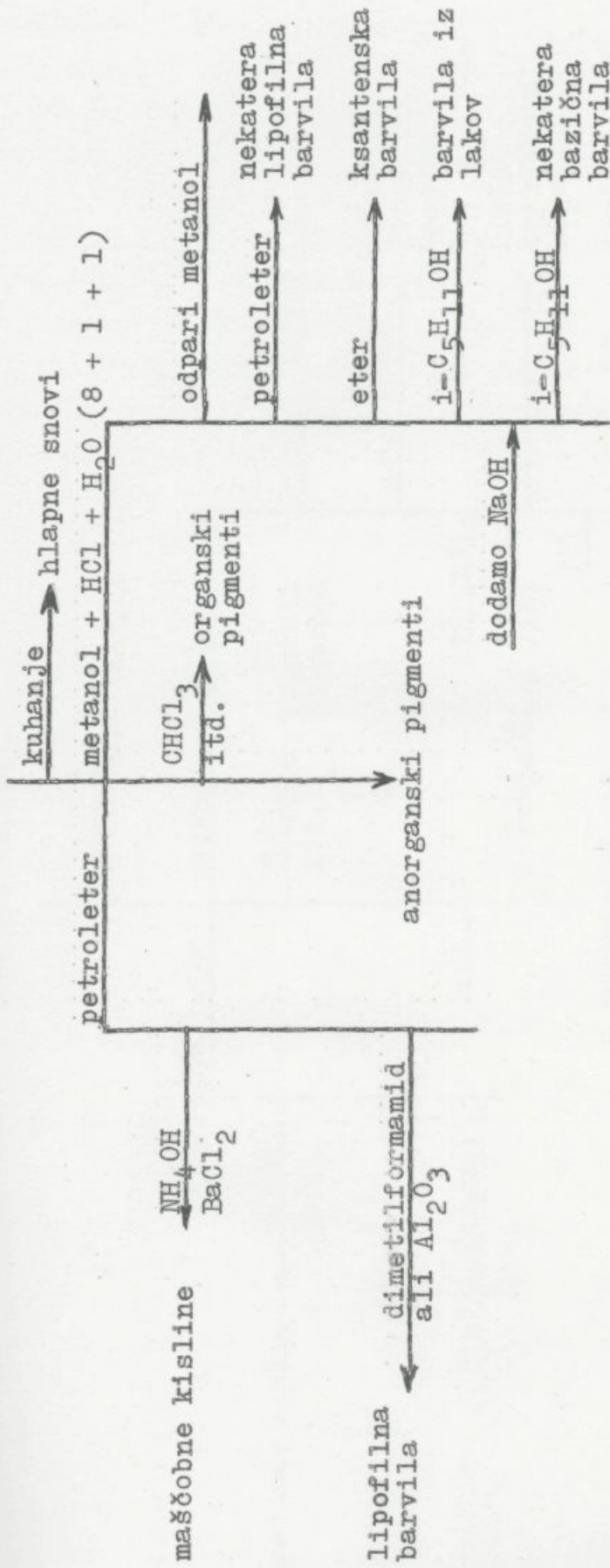
- a) kreme za kožo in puder kreme
- b) rdečila za ustnice, črnila za trepalnice, svinčniki za veke in obrvi, pudri za obraz

Uradni ameriški postopek za analizo osnovnih sestavin šmink ⁽¹³⁴⁾ ni primeren za izolacijo barvil, ker je prirejen tako, da se glavni sestavni deli izdelka porazdelijo v čim več frakcij. Ločitev barvil od njih je pri tem sekundarnega pomena in izolacije vseh barvil niti ne omenja. Postopki po Deshussesu in Desbaumesu ^(32, 33) pa niso dovolj univerzalni.

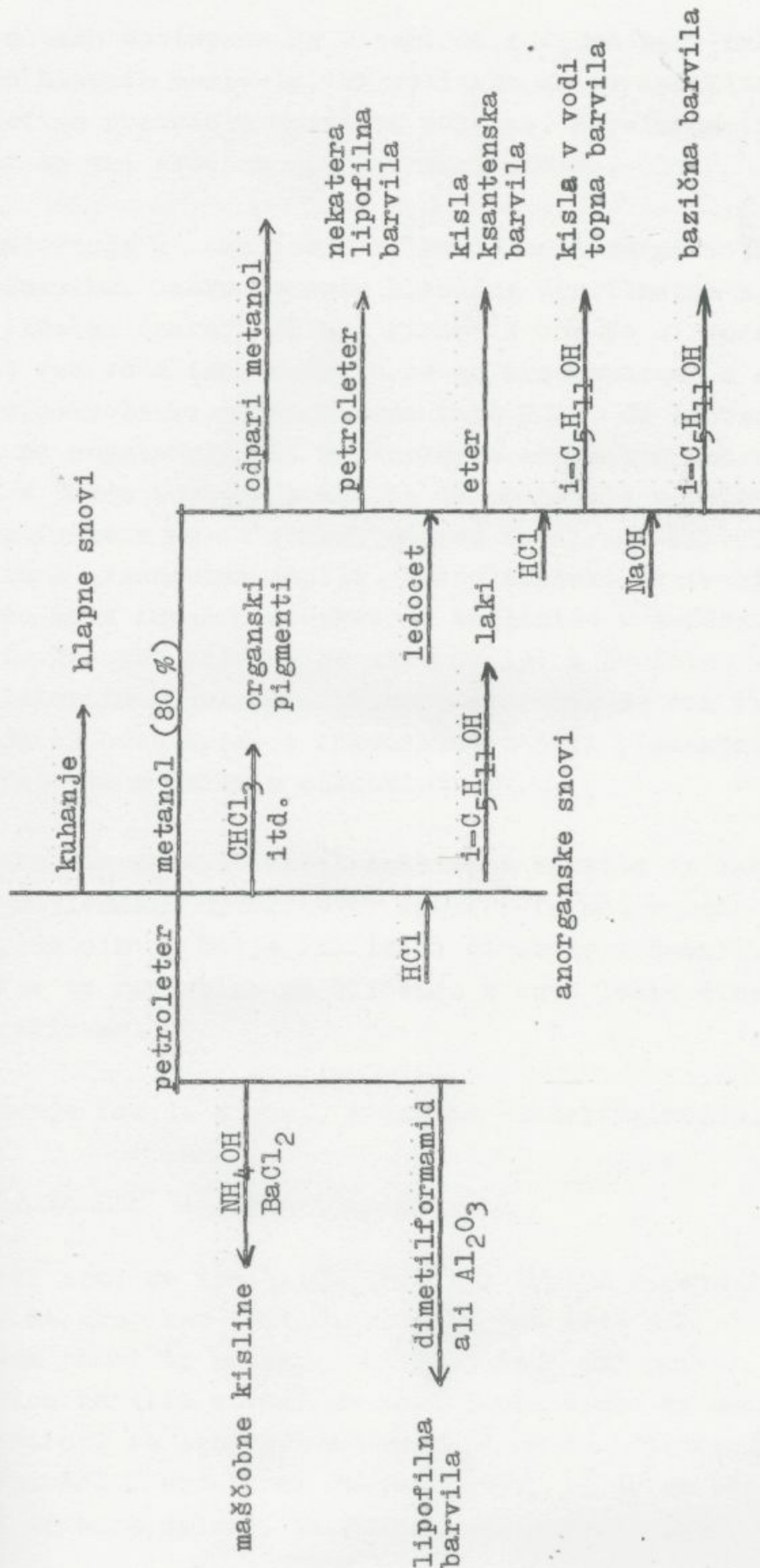
Za izolacijo vseh barvil iz teh izdelkov sem poskušal najprej prirediti ameriški postopek, vendar sem spoznal, da pridem z razdelitvijo snovi med petroleter in 80 % metanol (isti avtor navaja ta postopek kot enega manj pomembnih za izolacijo hidrofobnih snovi iz krem) hitreje do cilja in sem zato ta postopek priredil tako kot kažeta shemi A in B.

Postopek A je bolj primeren za izolacijo iz izdelkov, ki vsebujejo precej maščobnih kislin oz. njihovih soli (kreme za kožo), medtem ko je postopek B bolj primeren za izolacije iz izdelkov, ki teh snovi nimajo. Pri analizi barvil je važno to, da izoliramo barvila čim bolj čista, brez kakršnihkoli primesi. Oba postopka (A in B) sta prirejena tako, da se skoraj vse osnovne sestavine - "podlaga" šmink in krem zberejo v petroleterskih ekstraktih, medtem ko večina barvil ostane v bolj polarnih topilih. Druga prednost teh postopkov je v dejstvu, da se v maščobah topna barvila, ki bi se skupaj z večino sestavin zbrala v petroleterskem ekstraktu, le redko uporabljajo pri izdelavi mnogih tovrstnih izdelkov; če pa so prisotna, se jih da izolirati od ostalih snovi.

obarvan izdelek



obarvan izdelek



Bistvo obeh postopkov je v tem, da z vodno paro izženemo večino hlapnih sestavin, ki vplivajo na porazdelitev snovi, ločimo preostale snovi na polarne, nepolarne in netopne ter te tri skupine dalje frakcioniramo.

Ker zadostuje za analizo barvila že sorazmerno majhna količina izdelka, lahko namesto klasične destilacije z vodno paro izdelek (nekaj 100 mg) kuhamo s cca 50 ml vode, da skoraj vsa voda izpari. Nato pa ga ekstrahiramo z dvofazno zmesjo petroleter:metanol:voda (ali HCl), da ločimo polarne snovi od nepolarnih. Iz metanolnega ekstrakta izženemo metanol s tokom toplega zraka in še preostale nepolarne snovi ekstrahiramo s petroletrom; naprej izoliramo barvila po postopkih z organskimi topili. Petroleterski ekstrakt obdelujemo po enem izmed postopkov za izolacijo v maščobah topnih barvil. Netopni ostanek po ekstrakciji z dvofazno zmesjo je zmes lakov in pigmentov. Najbolj uporaben je tak postopek, da najprej odstranimo z organskimi topili pigmentna barvila, nato pa lake z amilnim alkoholom.

Spočetka sem tudi poskušal izolirati barvila iz lakov s pomočjo kationskih detergentov in kloroforma, vendar sem ugotovil, da jih je bolje izolirati direktno v i-amilni alkohol, ker to raztopino po čiščenju z vodo lahko direktno kromatografiramo.

Za ločenje faz je najbolj primerno centrifugiranje.

9) Laki za nohte in podobni izdelki:

Ugotovil sem, da izolacija barvil s topili direktno iz izdelkov ne gre, ker se v topilu ali vse topi ali pa se nitroceluloza obori in potegne s seboj večji del barvil. Ker se pigmentna barvila v vodi ne topijo, jih z njo ne moremo ekstrahirati iz laka razredčenega z estri. Nitrocelulozo sem poskušal obarjati na razne načine, da bi se oborila v obliki drobnih delcev, iz katerih bi barvila lahko difundi-

rala, vendar se je oborila v velikih kosmih, iz katerih barvila ni bilo mogoče izolirati samo z ekstrakcijo.

Ti poskusi so mi pokazali, da bom barvila lahko izoliral le, če bom uspel dobiti tako tanek sloj laka, da nitroceluloza ne bo mogla preprečiti hitrega prehoda barvila v topilo. Topilo pa seveda ne sme topiti nitroceluloze.

Da bi tak sloj dobil, sem dve kapljici laka razredčil s 3 ml etilacetata ali acetona in pomešal s toliko drobnega belega kremenčevega peska, da je bila videti zmes suha t.j. da raztopina ni prekrila peska, če sem zmes pustil stati, temveč je ostala porozna. Tako zmes sem v toku toplega zraka mešal, dokler se ni toliko posušila, da se je razdrobila v pod 1 mm debele delce, ki se niso več sprijemali. Nato sem jo pustil, da se je sušila še nekaj ur, po potrebi še malo zdrobil in stresel v kolono, kot da bi bila adsorbent. Za eluiranje se mi je najbolj obnesel tale vrstni red topil: petroleter, benzen, kloroform.

Preiskusil sem tudi to varianto, da sem že suho zmes pomešal z večjo količino (20 ml) petroletra in suspenzijo prelil v kolono. Zdi se mi, da je tako spremenjen postopek boljši.

Da bi iz lakov izoliral vsa barvila, sem končno izdelal tale postopek :

Lak razredčimo z etilacetatom ali podobnim topilom in poskušamo z razredčenim amonijakom ekstrahirati kislila v vodi topna barvila, z razredčeno HCl pa bazična barvila. Esterski sloj pomešamo s tako količino belega kremenčevega peska, da ga raztopina ne prekrije, posušimo v toku toplega zraka, stremo, da dobimo primerno debele delce in sušimo še nekaj ur, najbolje z zmernim tokom toplega zraka, lahko pa tudi v sušilniku pri 100-110 °C. Po potrebi še nekoliko zdrobimo, pomešamo s 5-kratnim volumnom petroletra in prenesemo v primerno cev, izperemo še z nekaj ml čistega petroletra, nato pa eluiramo z benzenom, kloroformom ali drugim primernim topilom. Eluat lahko kar kromatografiramo. Pesek ostane po eluiranju navadno še komaj opazno obarvan. Če hočemo odstraniti tudi ta preostanek barvila, je treba vsebino

močno zdrobiti in ponovno eluirati, kar pa gre zaradi manjšega premera delcev zelo počasi.

10) Izdelki s površinsko aktivnimi snovmi:

O izolaciji iz zobnih past in šamponov sta že pred desetimi leti poročala Deshusses in Desbaumes (34, 35).

Ugotovil sem, da njuna postopka nista primerna za vse tovrstne izdelke, ki so sedaj v prodaji, zato sem izdelal nekaj novih postopkov, da sem barvila lahko izoliral iz vseh izdelkov, ki sem jih lahko dobil.

Pri izdelkih, ki vsebujejo detergente, je treba vedeti, kakšni so ti. To ugotovimo tako, da k prvemu delu razredčene raztopine izdelka dodamo kapljico raztopine Asepsola, k. drugemu pa Ivozona 50. Anionski detergenti dajo oborino s prvim reagentom, kationski z drugim, neionski pa ne reagirajo.

Po tej reakciji lahko sklepamo, katera barvila so najbolj verjetno prisotna - bazična ali kislina. Pa tudi za nadaljnji postopek je ta podatek važen, da vemo s čim oboriti ali ekstrahirati prisotne detergente.

A) Izdelki, ki vsebujejo malo detergentov (pasta za zobe in podobni izdelki):

Zobno pasto suspendiramo v vodi, dodamo nekoliko detergenta, da se že prisotni oborijo in centrifugiramo. Obarvano vodno plast ločimo in iz nje izoliramo barvila.

B) Izdelki, ki vsebujejo mnogo detergentov (šamponi, pralni praški in podobni izdelki):

Lastnosti surovin za te izdelke se tako razlikujejo med seboj, da z enim samim postopkom nisem mogel izolirati dovolj čista barvila iz vseh tovrstnih izdelkov. Vsi preiskani vzorci so vsebovali anionske detergente.

Tako mi n.pr. direktna adsorbcija barvila iz razredčene raztopine izdelka v 2 n HCl na Al_2O_3 ni vedno uspela. Tudi obarjanje s prebitkom nasprotno nabitega detergenta ni uporabno, ker je oborina preveč voluminozna. Prav tako tudi z ekstrakcijo z različnimi topili nisem dobil zadovoljivih rezultatov.

Pomagati sem si moral s kombinacijami več postopkov in sem za uporabo izdelal naslednje postopke:

- 1) Izdelek raztopimo v večji količini zmesi kloroform: ledocet 5:2 in z majhnimi porcijami razredčene očetne kisline (n.pr. 15 %-ne) izpiramo barvila. Te ekstrakte očistimo s kloroformom in izoliramo iz njih barvila.
- 2) Izdelek raztopimo v vodi, nakisamo s 25 % HCl na pH 2 in ekstrahiramo z etrom. Če barvila ne preidejo vanj, ga zavržemo; če pa preidejo, jih izperemo z nekaj kapljicami vode. To ekstrakcijo ponovimo nekajkrat, da odstranimo večji del detergentov. Nato dodamo prebitek 10 % raztopine p-toluidinhidroklorida, ki tvori z anionskimi detergentski spojine, ki so slabo topne v vodi, dobro pa v etru (38). Pomešamo in ponovno ekstrahiramo z etrom, ločimo, ponovimo ekstrakcijo. Če barvila preidejo v eter jih izperemo ven z malo vode, ki jo potem spet ekstrahiramo z etrom. Vodne raztopine barvil rahlo naalkalimo, ekstrahiramo z etrom p-toluidin, nato pa jih izoliramo po enem izmed primernih postopkov.
- 3) Izdelek raztopimo v čim manjši količini metanola, filtriramo, filtrat razredčimo z metanolom, dodamo malo kloroforma in postopno obarjamo prisotne detergente z nasprotno nabitim in vsakokrat odcentrifugiramo oborino. Ko je večji del detergenta oborjen (ti izdelki morajo vsebovati nad 10 % detergenta; Asepsol in Omnisan sta tudi 10 % raztopini), metanol odparimo in ga nadomestimo z vodo, oborimo preostali detergent in raztopina je po centrifugiranju pripravljena za nadaljnjo izolacijo.

Poskušal sem še več drugih kombinacij, ki pa se niso obnesle. Najprimernejši sta prvi dve.

Pri teh izdelkih so napovedane za v bodoče precejšnje spremembe v sestavi, ker se kaže tendenca, da bi sedanje nede-gradabilne snovi zamenjali s spojinami, ki se bodo lahko biološko razgradile.

Predvidevam, da bodo za izolacije iz tako spremenjenih izdelkov potrebni drugačni postopki.

c) Mila, milni praški:

- a) Primerno količino izdelka (nekaj gramov) raztopimo v vrelem etanolu in vroče filtriramo skozi primeren filter (vato, papir), ki ga operemo z vrelim etanolom. Na filtru ostanejo netopna barvila - običajno laki in pigmenti, ki jih s filtra spravimo s primernimi topili.

Filtrat ohladimo, da se večji del mila obori, filtriramo, izperemo z alkoholom, v filtratu oborimo maščobne kisline z $BaCl_2$, filtriramo, izperemo z razredčenim alkoholom in iz filtrata izoliramo topna barvila.

- b) Nekaj gramov izdelka raztopimo v vreli vodi ali močno razredčenem etanolu, po potrebi prefiltriramo, nakisamo z očetno kislino, da izpadejo maščobne kisline. Dobro mešamo in ohladimo, da se kisline strdijo, filtriramo, oborino speremo z očetno kislino, močno razredčenim alkoholom. Filtrat ekstahiramo s petroletrom ali bencinom. Iz vodne raztopine izoliramo v vodi topna barvila (običajno kislina). Oborino na filtru izperemo s petroletrom skozi filter - preostanejo nekateri laki in pigmenti. Petroletersko raztopino, če je obarvana, previdno spiramo ob straneh z razredčenim amonijakom in $BaCl_2$, da odstranimo maščobne kisline. Nato pa iz petroletra izoliramo barvila.

B) Izolacija iz surovih ekstraktov

Surovi ekstrakti barvil, dobljeni tako kot je opisano v prejšnjem poglavju, vsebujejo razen barvil še precej drugih snovi, ki pa v večini primerov dovoljujejo selektivno izolirati barvila s primernimi postopki.

Ker večina teh postopkov iz raznih vzrokov ni primerna za izolacijo vseh barvil v posamezni topnostni skupini, sem za vsako tako skupino preiskusil postopke, ki so bili že objavljeni, jih, v kolikor niso bili zadovoljivi, poskušal izboljšati, iskal pa sem tudi nove možnosti za izolacijo, zlasti take, ki bi olajšale kasnejšo identifikacijo.

Barvila topna v maščobah:

V maščobah topna barvila najdemo v petroleterških ekstraktih. Petroleter ali čiste alkane uporabljamo zato, ker selektivno topijo ta barvila; iz njih jih lahko izoliramo na več načinov, kar iz drugih topil ni mogoče. Poleg barvil se v petroletru topijo še: parafini, voski, maščobe, višji alkoholi, maščobne kisline itd. V literaturi so bili doslej objavljeni naslednji postopki za izolacijo barvil iz petroleterške raztopine:

- a) umiljenje maščob in odločanje barvila od raztopine mila (30, 40, 74)
- b) adsorpcija barvil na Al_2O_3 (15, 79, 125, 138, 186, 187, 201, 202, 203)
- c) ekstrakcija barvil s sistemoma kislin (30, 103, 121, 137, 191)
- č) ekstrakcija barvil z dimetilformamidom (10, 112, 121, 138)

a) Umiljenje maščob in odločanje barvila od raztopine mila:

Postopek:

Petroleterski ekstrakt uparimo, dodamo prebitek ln alkoholnega KOH (200 ml na 25 g maščobe) in segrevamo s povratnim hladilnikom 30 minut. Raztopino ohladimo, razredčimo z vodo (160 ml), ekstrahiramo s petroletrom neumiljivo. Petroleterski ekstrakt previdno operemo z vodo, da odstranimo vse alkalije in ga koncentriramo.

Ugotovitve:

Davidek in sodelavci (30) so ugotovili, da je izkoristek barvil okoli 90 odstoten. Uporabljali so ga za izolacije iz jedilnih maščob.

Moje ugotovitve:

- 1) Postopek je mogoče sam zase uporabiti le pri izolaciji iz masti in olj, ki vsebujejo dovolj majhne količine neumiljivih snovi. V mnogih kozmetičnih izdelkih pa je veliko neumiljivega, zato za izolacijo iz ekstraktov iz teh izdelkov ni zadovoljiv in ga je treba dopolniti z drugimi postopki.
- 2) Fazi se pri ekstrakciji le počasi ločita, zato imajo drugi postopki tudi v tem pogledu nekaj prednosti.

b) Adsorbcija barvil na Al_2O_3 :

Princip:

Iz petroleterskih raztopin se barvila adsorbirajo na aktivni Al_2O_3 . Primesi: maščobe, višje alkohole itd. se iz kolone daje izprati z nepolarnimi topili, končno se barvila eluirajo z metanolom ali etanolom oziroma z drugim primernih topilom.

•

Postopek:

Petroletersko raztopino spustimo skozi kolono napolnjeno z Al_2O_3 po Brockmannu, predhodno aktiviranem vsaj 1 uro pri 400-500 °C. Kolono dobro izperemo s petroletrom, da odstranimo čim več primesi, nato pa eluiramo barvila z metanolom, etanolom ali etilacetatom.

Ugotovitve:

Drugi avtorjev:

Postopek z adsorbicijo na Al_2O_3 navadno odpove, če adsorbent ni dovolj aktiviran ali pa če je petroleterška raztopina preveč polarna. V obeh primerih se barvila eluirajo skupaj z maščobami.

Moje ugotovitve:

Videti je, da je najbolj važno to, da je adsorbent maksimalno aktiviran, saj so se barvila adsorbirala na Al_2O_3 po Brockmannu, sušenem 4 ure na $450-500^{\circ}C$, tudi če sem jih raztopil v starem, močno žarkem bučnem olju, pa to raztopino razredčil z bencinom (Ph.J.II) v razmerju 1:2 ter prefiltriral skozi adsorbent. Pri izpiranju z bencinom nisem opazil, da bi se premaknila z vrha kolone, pač pa so počasi potovale po dodatku etra.

Kljub temu sem pri analizah vzorcev raje predhodno odstranil nekatere polarnejše snovi tako, kot je opisano pod 8).

c) Ekstrakcija barvil s sistemoma kislin:

Postopek:

Petroleterški ekstrakt (30 g maščobe v 60 ml petroletra) ekstrahiramo samo enkrat s 15 ml raztopine A (ledocet: HCl:voda 10:2:1), vodno plast takoj spustimo v zmes 5 ml NaOH 25 %, 25 ml vode, 35 ml petroletra in takoj stresemo. Petroleterško plast speremo z vodo in odparimo. Preostanek umilimo s 25 ml etanola in 2 ml 50 % KOH z 10 minutnim kuhanjem. Razredčimo z 10 % alkoholom in ekstrahiramo z etrom. Ekstrakt temeljito speremo z vodo, posušimo z Na_2SO_4 , odparimo eter in topimo v primernem topilu. Petroleterško raztopino, ki je ostala po stresanju z zmesjo A, ekstrahiramo še z zmesjo B (ledocet: H_2SO_4 :voda 9:4:1). Ekstrakcijo z raztopino B lahko ponovimo večkrat; za nevtralizacijo je treba vzeti vsaj 80 ml NaOH. Naprej postopamo enako kot pri raztopini A.

Ugotovitve:

Drugih avtorjev:

Zmes A ekstrahira iz petroleterške raztopine v glavnem bazična barvila, ki v njej zelo hitro razpadajo, zato je treba ta del izolacije izvršiti zelo hitro.

Zmes B ekstrahira tudi barvila, ki vsebujejo fenolne skupine. Izolacija ni kvantitativna.

Glavna hiba tega postopka je hiter razpad barvil, pa tudi delo z agresivnimi, hlapnimi kislinami ni prijetno. Druga hiba je to, da je treba vse ekstrakte reekstrahirati in nato še umiliti - potrebna sta torej dva postopka.

Moje ugotovitve:

Te ugotovitve držijo. Zmes A ekstrahira tudi barvila, ki imajo OH-skupine v para legi glede na azo skupino. Postopka pri nadaljnjem delu nisem uporabljal, ker so drugi bolj prikladni.

č) Ekstrakcija barvil z dimetilformamidom:

Princip:

Dimetilformamid se veže s H-vezmi na azo barvila v kompleksne spojine, ki so topne v koncentriranem dimetilformamidu; ob dodatku vode pa razpadejo.

Postopek:

Petroleterški ekstrakt (10 g masti v 50 ml petroletra) ekstrahiramo z 2 ml NH_3 conc., ločimo, filtriramo, ekstrahiramo z 2 ml NH_3 dil., ločimo, ekstrahiramo s 3 x 20 ml dimetilformamida. Raztopino barvil v dimetilformamidu razredčimo z vodo (1:1), ekstrahiramo s 30 in 10 ml kloroforma, operemo ekstrakt z vodo in uparimo. Preostanek raztopimo v 25 ml dimetilformamida, dodamo 25 ml vode, ekstrahiramo s petroletrom, ekstrakt speremo z vodo in odparimo v petroleter.

Ugotovitve:

Avtorjev:

Če vzamemo enaka volumna petroletra in dimetilformamida, se maščobe porazdelijo med njiju v razmerju približno 9:1, barvila pa v razmerju 1:9 do 1:99. Čim manj polarne so primesi, ki so prvotno prisotne v petroleterski raztopini, tem čistejši ekstrakt dobimo. Zato je Bastianutti (10) prvotni postopek izboljšal s tem, da je petroletersko raztopino ekstrahiriral z amonijakom in filtriral.

Moje ugotovitve:

Postopek z dimetilformamidom je primeren zaradi svoje enostavnosti, pa tudi zato, ker dobro loči barvila od nepolarnih, neumljivih primesi. Pri izpiranju z amonijakom se pogosto tvorijo emulzije, ki jih je težko obvladati in precejšen del barvil gre lahko v izgubo. Tej nevšečnosti sem se izognil tako, da sem petroletersko raztopino stresal z 10 % BaCl_2 , vse skupaj naalkalil z amonijakom, stresal in pustil, da so se plasti ločile, kar se je zgodilo zelo hitro. Petroleterska plast je bila vedno bistra in obarvana, medtem ko je bila vodna plast brezbarvna in motna; včasih je bilo v njej tudi precej oborine. Vodno plast sem zavrgel. To čiščenje sem ponavljal, dokler ni bila tudi vodna plast bistra, nakar sem izpral raztopino še z amonijakom (1+100). Pri ekstrakciji barvil sem uporabljal manjše porcije (2 do 5 ml) dimetilformamida, kot jih predpisuje prvotni postopek, pa sem vedno dobil dober rezultat - petroleterska raztopina ni bila vidno obarvana. Iz dimetilformamida, razredčenega z vodo, sem ekstrahiriral barvila kar s petroletrom, ki sem ga potem dobro izpral z vodo. Dimetilformamid praktično kvantitativno ekstrahira iz petroletra azo barvila, zelo slabo pa druga kot n.pr. Sudanblau II. Poleg tega je pri identifikaciji barvil bolj ugodno, če so barvila razdeljena v več skupin, tako da lahko vsako skupino analiziramo po postopku, ki je

zanjo najbolj ugoden. Zato sem preiskušal še nekatera druga topila, da bi z njimi dopolnil postopek z dimetilformamidom.

d) Dopolnilne ekstrakcije z drugimi topili - univerzalni postopek za istočasno izolacijo barvil in ločitev v več skupin:

Po analogiji z drugimi organskimi spojinami sem sklepal, da bi bil za ekstrakcijo fenolnih barvil iz petroletra primeren tudi etanolamin, ker:

- 1) lahko daje vodik za vodikove vezi
- 2) istočasno lahko sprejema H^+ na $-NH_2$
- 3) je bolj bazičen in bolj polaren kot etanol, ki tudi dokaj dobro topi barvila, tako da bo mogoče barvila topil bolje, maščobe pa slabše
- 4) ne meša se z alifatskimi in aromatskimi ogljikovodiki, CCl_4 , etrom, butilacetatom itd., medtem ko se dimetilformamid meša z vsemi temi razen z alkani in cikloalkani.

Da bi se prepričal o tem, sem 0,1 % raztopino vsakega barvila v topilih (glej tabelo št. 5) stresal z enakim volumnom etanolamina. Ko so se plasti ločile, sem primerjal njihovo barvo z barvo prvotnih raztopin. Rezultati so prikazani v tabeli št. 5.

V etanolamin prehajata dobro torej dve barvili, ki imata prosti OH-skupini v para legi glede na azo skupino, medtem ko barvili, ki imata OH-skupini samo v orto legi, ostajata v nepolarnem ali slabo polarnem topilu.

Tako razdelitev barvil je mogoče pričakovati glede na to, da so OH-skupine, ki ležijo poleg azo skupine, vezane z njo s pomočjo vodikove vezi v šest členski obroč, ki je tako stabilen, da se v marsikaterem pogledu obnaša slično benzenovem obroču, torej se take skupine ne morejo obnašati kot tiste, ki so popolnoma proste.

Tabela št. 5

Prehod barvila iz topila v etanolamin:

Barvila	Topila				
	PE	C ₆ H ₆	CCl ₄	Eter	Butilacetat
Sudanorange G	++	++	++	++	++
Sudanrot G	sl.	sl.	sl.	sl.	sl.
Sudangelb GRN	-	-	-	-	-
Sudanbraun B	++	++	++	++	++
Sudanblau II	-	-	-	-	-

Prehod barvila iz topila v zmes etanolamin:voda 6:4

Barvila	Topila				
	PE	C ₆ H ₆	CCl ₄	Eter	Butilacetat
Sudanorange G	++	++	++	++	++
Sudanrot G	-	sl.	-	-	sl.
Sudangelb GRN	-	-	-	-	-
Sudanbraun B	+	±	±	++	±
Sudanblau II	-	-	-	-	-

- ++ - zelo dober
- + - zadovoljiv (nad 1/2)
- ± - slab (pod 1/2)
- sl. - sledovi
- - nič

Izolacijo v maščobah topnih barvil je torej mogoče izvršiti tudi z etanolaminom, toda le tistih, ki imajo prosto OH-skupino. S tem torej lahko ločimo v maščobah topna barvila v dve skupini, kar pri izolaciji sicer ni posebno pomembno, zelo pa olajša identifikacijo barvila. Tretjo skupino tvorijo bazična barvila, kot n.pr. Sudanblau II. To barvilo le delno prehaja v dimetilformamid, pač pa zelo dobro v solno kisli metanol in ga tako ločimo od ostalih barvil. S pomočjo teh topil sem izdelal naslednji postopek za izolacijo in delno ločitev kompleksnih zmesi v maščobah topnih barvil.

Postopek:

Petroleterski ekstrakt izdelka očistimo z 10 % BaCl_2 in 10 % amonijakom, ki ju istočasno dodamo petroleterski raztopini, da odstranimo kisle snovi.

Barvila s prostimi fenolnimi skupinami ekstrahiramo z nekaj porcijami zmesi etanolamin:voda 6:4. Etanolaminsko fazo razredčimo z nasičeno raztopino NH_4HCO_3 in izoliramo barvila v metilenklorid, lahko pa tudi v benzen ali kloroform, ki jih potem dobro speremo z vodo. Ostala azo barvila ekstrahiramo iz petroleterske raztopine z dimetilformamidom. Dimetilformamidno raztopino ekstrahiramo s petroletrom, petroleterske raztopine združimo in reekstrahiramo z dimetilformamidom. Dimetilformamidni ekstrakt razredčimo z enakim volumnom vode in ekstrahiramo barvila s petroletrom. Petroletersko raztopino temeljito speremo z vodo, razredčimo in ekstrahiramo v dimetilformamid (če je potrebno).

Preostala barvila kot n.pr. Sudanblau II izoliramo iz združenih petroleterskih raztopin z zmesjo metanol:HCl 9:1, potem ko smo jih izprali s 25 % HCl.

Metanolno raztopino pomešamo z enakim volumnom 0,5 n alkoholnega KOH in malo vode ter ekstrahiramo barvila s petroletrom, ki ga dobro speremo z vodo.

Petroleterske raztopine barvil lahko odparimo in topimo barvila v primernem topilu: etilacetat za kromatografijo na hidrofobnem papirju in silikagelu, dimetilformamid za kromatografijo na papirju impregniranem z dimetilformamidom.

POVZETEK:

Najbolj univerzalen postopek za izolacijo v maščobah topnih barvil je adsorpcija na Al_2O_3 iz petroleterske raztopine, iz katere je predhodno odstranjenih čim več polarnejših snovi. Destokrat je zaradi identifikacije bolj ugodno uporabiti postopek z dimetilformamidom, ker je enostavnejši in hitreje izvedljiv ter ga lahko izpolnimo z izolacijo v etanolamin in solno kislino metanol. Sam zase je uporaben samo za izolacijo azo barvil, ki pa je skoraj kvantitativna (90 do 99 % izkoristek). Pri obeh postopkih je zelo važno to, da vsebuje petroleter res samo alkane. Kot pomožno stopnjo pri obeh postopkih lahko vključimo tudi postopek z umiljenjem, ki je sam zase uporaben le, če so primešane barvilu samo umiljive nehlapne snovi.

Barvila topna v vodi:

V vodi topna barvila je zaradi njihovih lastnosti najprimerneje razdeliti v naslednji skupini:

- 1) bazična
- 2) kislina

po kemični sestavi pa ti dve skupini še naprej v :

- a) ksantenska
- b) trifenilmetanska
- c) azo in ostala barvila

Poleg topnosti v vodi imajo še naslednje značilnosti:

topna so v nekaterih, ne pa v vseh organskih topilih

vežejo se na poliamide

s površinsko aktivnimi snovmi tvorijo v vodi netopne komplekse

Bazična ksantenska in trifenilmetanska barvila so topna v petroletru, etru, tetraklorofljiku, kloroformu, alkoholih itd. in se dajo s temi topili ekstrahirati iz alkalne vodne raztopine.

Na poliamide se vežejo v nevtralnem ali alkalnem.

Z anionskimi snovmi kot alkilsulfati, alkil- in alkilaril sulfonati, tvorijo v vodi netopne komplekse, ki se dobro topijo v kloroformu.

Kislina ksantenska barvila se dajo iz kisle vodne raztopine ekstrahirati z etrom. Ostala kislina barvila se dajo ekstrahirati iz močno kisle raztopine z višjimi alkoholi (butanol, amilalkohol), le nekatera izmed njih pa tudi z etrom. Vsa kislina barvila se vežejo na poliamide v kislem.

Komplekse tvorijo s kvarternimi amonijevimi bazami; ti kompleksi so topni v kloroformu.

Te tri lastnosti in še sposobnost, da se adsorbirajo na anorganskih adsorbentih, se uporabljajo za dokaz in izolacijo teh barvil.

V literaturi so podrobno opisane izolacije teh barvil z organskimi topili (etrom, gliceroldiklorhidrinom, butanoli, pentanoli, kinolinom), z volno, z anorganskimi adsorbenti (SiO_2 , Al_2O_3), omenjen je tudi postopek za izolacijo kisljih barvil v obliki kompleksa s cetilpiridinijevim bromidom.

Pri svojem delu sem uporabljal postopke z organskimi topili in anorganskimi adsorbenti tako, kot so opisani v literaturi. Postopek z volno sem razširil tako, da sem uporabljal tudi sintetične poliamide.

Postopek z detergenti sem dopolnil tako, da sem lahko izoliral katerokoli v vodi topno barvilo iz kateregakoli izdelka.

a) Izolacija na poliamide (4, 15, 31, 37, 61, 99, 121, 131, 139, 143, 144, 160, 165, 166, 191, 205, 206, 214, 215)

Postopek:

Kisla barvila

Vodno raztopino, iz katere so odstranjena organska topila, nakisamo z 10 % KHSO_4 , -2ml/20ml probe - lahko tudi s HCl , očetno, vinsko ali drugo kislino, dodamo nekaj volne (svile, nylona, perlona) in segrevamo na vodni kopeli nekaj minut. Postopek ponavljamo z novo volno, dokler se vse barvilo ne izolira. Obarvano volno dobro izperemo s toplo vodo in eluiramo barvilo z 1 do 5 % NH_3 . Če rdeče barvilo, ko ga damo v razredčeni NH_3 , le malo ali sploh nič ne spremeni barve, je prisotnost kislega sintetičnega barvila dokazana. Naravna barvila (antocianini) pri tem spremenijo barvo iz rdeče v umazano zeleno. Kadar reakcija ni jasna, eluat spet nakisamo in ponovimo izolacijo z manjšo količino volne. Raztopino barvila v razredčenem NH_3 po koncentriranju lahko uporabimo za nadaljnjo analizo.

Bazična barvila

Postopek je zelo podoben, le da vodno raztopino, preden damo vanjo volno, naalkalimo in nasolimo (n.pr. z Na_2HPO_4). Z volne pa eluiramo barvila z razredčeno ocetno²-kislino (1:20).

Ugotovitve raznih avtorjev

Najbolj specifičen in občutljiv dokaz prisotnosti kislinskih in bazičnih sintetskih barvil je obarvanje volne z njimi. Afiniteta naravnih barvil - razen karminove kisline in orseja - do volne je tako majhna, da se volna z njimi komaj opazno obarva, medtem ko grede sintetska barvila na volno kvantitativno. Če pa barvila eluiramo z volne in iz eluata vežemo na novo, svežo volno, so na volni le še sintetska barvila. Na ta način so uspeli dokazati 0,02 mg barvila / 1 liter vina. Ta metoda pa ni uporabna, če so v raztopini, iz katere hočemo izolirati barvila, prisotne beljakovine. Le-te se med izolacijo obarjajo, blokirajo dodano volno in vežejo barvila nase. Druga slaba lastnost je, da je treba vse te procese izvršiti pri visoki temperaturi (100 °C), zaradi česar nekatera barvila počasi razpadejo in pri identifikaciji ne moremo zagotovo vedeti ali so bila spremljajoča barvila prisotna že v izdelku ali pa so nastala šele kasneje.

Razen volne so uporabljali tudi druga vlakna. (143)

Moje ugotovitve

Pri eluiranju barvila z volne oborjene beljakovine spet preidejo v raztopino, pa tudi volna v NH_4OH počasi razpada in zato ne moremo dobiti popolnoma čiste raztopine barvila. Pomagal sem si tako, da sem eluat odparil in posušil ter nato topil barvila v metanolu ali po nakisanju v izoamilnem alkoholu, tako da sem dobil v raztopino čim manj beljakovin. Vendar je ostal precejšen

del barvila vezan na neraztopljene beljakovine. Postopek z volno ni primeren za izolacijo barvil št. 10, 21, 95, pa tudi ne kislih trifenilmetanskih barvil. Razen volne sem uporabil tudi drug poliamid - perlon in izoliral barvila po istem postopku. Metoda s perlonom ni primerna za dokaz barvil št. 10, 16, 21, 95, kislih trifenilmetanskih in ksantenskih barvil.

Priprava vlaken:

a) Volna

Za čiščenje volne sem uporabljal tale postopek:

Surovo nebeljeno volneno prejo sem opral z milnico, ki ne vsebuje barvil ali optičnih belilnih sredstev, jo dobro izpral in posušil. Posušeno sem ekstrahiriral v ekstraktorju po Soxhletu z etrom (50 pretokov), nato sem jo posušil na zraku, namakal v 5 % NH_4OH , segreto na 80 °C, temeljito izpral z vodo in posušil.

b) Sintetska vlakna

Tkanino (n.pr. perlon za srajce) sem v Soxhletovem aparatu ekstrahiriral z zmesjo piridin: NH_4OH conc. 97:3, dokler nisem odstranil večine optičnih belilnih sredstev. Nato sem jo temeljito opral z razredčenim NH_4OH , vodo ter posušil.

b) Izolacija z organskimi topili

Topnost barvil v raznih organskih topilih pod določenimi pogoji daje možnost, da barvila ločimo od spremljajočih snovi in tako dokažemo njihovo prisotnost. Razlike v topnosti pa omogočijo ločitev barvil v razne skupine in s tem že delno identifikacijo. Za dokazovanje majhnih količin sintetskih barvil te metode niso tako občutljive kot dokaz z volno, ker niso tako selektivne.

Z izolacijo barvil z organskimi topili so se bavili že številni avtorji.

Uporabljali so naslednja topila:

- 1) eter
- 2) višje alkohole in ketone
- 3) kinolin

Postopki:

1) in 2)

Kot primer za uporabo teh topil naj navedem modificirano uradno ameriško metodo (184) za izolacijo in delno ločitev v vodi topnih barvil: (tabela št. 6)

Drugi avtorji priporočajo bolj enostavne izvedbe (po ekstrakciji z etrom) n.pr. dodati 1/2 volumna HCl in ekstrahirati z i-amilnim alkoholom (137) ali pa 1/10 volumna H_2SO_4 in ekstrahirati z butanolom (209), benzilalkoholom, cikloheksanonom ali pa ekstrakcijo z istimi topili iz 2n HCl. (2, 11, 24, 138, 255)

Njihove ugotovitve:

1) Eter: selektivno ekstrahira iz alkalne raztopine bazična trifenilmetanska in ksantenska barvila, iz očetno kisle raztopine pa kislja ksantenska barvila. Dokaz za prisotnost teh barvil je obarvana vodna raztopina barvila, ki jo dobimo z ekstrakcijo eter-ske raztopine z razredčenimi kisljinami ali lugi. Ta postopek je po njihovem mnenju popolnoma zadovoljiv.

2) Višji alkoholi in ketoni:

v njih se pri primernem pH topijo vsa kislja barvila, s katerimi se smejo barvati živila in predmeti splošne rabe. Ekstrahiramo lahko iz raztopine, suspenzije, včasih pa celo iz trdega materiala. Poleg sintetskih barvil se v njih topijo tudi sladkorji, nekatera naravna barvila in druge snovi. Pri ekstrakciji nasta-

Modificirana uradna ameriška metoda za izolacijo in delno ločitev v vodi topnih barvil

24 ml raztopine barvil

ekstrahiramo z:	barvila:	vodo jih izoliramo po dodatku:
dodamo		
6 ml 10 % NaOH		
30 ml etra	bazična	razr. očetne kisline
10 ml ledocta		
30 ml etra	kisla ksantenska	10 % NH ₃
20 % NaCl		
do 60 ml		
i-amilni alkohol	33, 40, 46, 3, 36, 60 petroletra	
CCl ₄ :glic.diklorhidrin (1:2)	kisla trifenilmetanska CCl ₄	
1,4 ml HCl na		
40 ml raztopine		
i-amilni alkohol	18, 24, 34, itd.	petroletra
dovolj HCl		
i-amilni alkohol	ostala barvila	petroletra

nejo pogosto trdovratne emulzije, ki jih včasih še s centrifugiranjem težko ločimo. Ekstrakcija ni vedno kvantitativna, ker poteka pod precej ostrimi pogoji. Precej velika odvisnost topnosti posameznih barvil od pH in količine soli v vodni raztopini ter od kislosti organske faze omogoči ločitev kisljih barvil v več skupin.

Moje ugotovitve:

- 1) Za izolacijo bazičnih in ksantenskih barvil je ekstrakcija z etrom zelo primerna in sem jo tudi največ uporabljal. Ugotovil sem, da so zato prav tako primerni benzen, etilacetat, kloroform, metilenklorid. Izolacija poteka popolnoma zadovoljivo.
- 2) Izolacija ostalih kisljih barvil iz vodne raztopine poteka s temi topili dokaj dobro, če niso prisotne snovi, ki stabilizirajo emulzije. Zaradi tvorbe trdovratnih emulzij ta postopek ni bil ugoden za izolacije iz večine surovih ekstraktov iz živil.
Dobro se je obnesla izolacija barvil iz lakov z izoamilnim alkoholom in HCl (glej str. 90), posebno ko so bile odstranjene vse druge primesi.

3) Postopek s kinolinom

K vodnemu ekstraktu barvil (do 300 ml) dodamo enak volumen pufra (3,5 g Na-acetata in 50 ml ledocta na liter, pH = 3,2) in ekstrahiramo s 5 do 20 ml kinolina. Ekstrakt speremo z vodo, razredčimo s trikratno količino etra in ekstrahiramo z 2 ml vode. Večina barvil preide v vodo. Preostala barvila izženemo iz organske faze po dodatku večje količine etra z vodo ali razredčeno očetno kislino ali amonijakom. Vodno fazo lahko ekstrahiramo z etrom, da odstranimo raztopljeni kinolin. Prisotne emulgatorje lahko pred dodatkom pufra delno odstranimo z reagentom po Carrezu: I 150 g $K_4/Fe(CN)_6/ .3 H_2O$ na liter
II 300 g Zn-acetata $.2 H_2O$ na liter
Dodamo 1 do 10 ml I, pomešamo, dodamo enako (1 do 10 ml) II, pomešamo, centrifugiramo.

Ugotovitve avtorjev: (97, 99, 129, 130, 138, 139, 144)

Po tem postopku dobljena končna raztopina barvila je mnogo bolj koncentrirana kot izhodna. Izolacija poteka pod milimi pogoji. Hkrati s sintetskimi barvili se izolirajo tudi naravna barvila. Zaradi tega in zaradi neprijetnega vonja nekateri (99) ta postopek odklanjajo.

Moje ugotovitve:

Zaradi naštetih hib in zaradi univerzalnosti postopka pod c) sem raje uporabljal slednjega.

c) Izolacija v obliki spojin z detergenti

Ugotovitve avtorjev: (39)

Značilna lastnost kisljih in bazičnih barvil je, da tvorijo s površinsko aktivnimi snovmi (detergenti) spojine, ki niso topne v vodi, pač pa v kloroformu, le nekatera v butanolu. Večina naravnih barvil ne tvori takih spojin. Optimalno poteka ta reakcija pri pH okoli 9. Ekstrakcija z organskim topilom je kvantitativna.

Prvotni postopek:

Raztopino barvila naalkalimo z 10 % Na_2CO_3 na pH 9 in ekstrahiramo s kloroformom. Pri tem pridejo v kloroform nekatera bazična barvila in druge v kloroformu topne snovi, zato kloroformsko raztopino spravimo. Vodni raztopini dodamo prebitek 1 % raztopine Biocidana (cetilpiridinium bromid), ekstrahiramo s kloroformom 10 minut, centrifugiramo, ločimo in vodni sloj ponovno ekstrahiramo s kloroformom, dokler ta ne ostane brezbarven.

Iz kloroforma izženemo barvila s HCl conc. (101) ali Teepolom (209) (sek. alkilsulfat).

Moje ugotovitve:

Razen postopka in dejstev, omenjenih v uvodu, sem zasledil v literaturi samo še podatek, da barvila Brilliant-schwarz BN ni mogoče zadovoljivo izolirati iz ribjih izdelkov. Iz samega postopka je razvidno, da ima ta metoda v primerjavi z ostalimi vrsto prednosti:

- 1) izolacija iz prvotne raztopine poteka najbolje v rahlo alkalnem mediju pri sobni temperaturi, pod zelo milimi pogoji, zato je mogoče pričakovati, da pri izolaciji ne bodo razpadala slabo obstojna barvila (10, 21, nekatera kislata trifenilmetanska), tako kot pri drugih postopkih.
- 2) Raztopino barvil predhodno očistimo z istim topilom, s katerim potem speremo barvila in s tem imamo možnost, da dobimo bolj čist ekstrakt.
- 3) Ekstrakcija barvnih kompleksov je kvantitativna - obstoja torej možnost, da bo s pomočjo te metode uspelo dokazati komaj vidne sledove barvil in barvila tudi precej koncentrirati.
- 4) Metoda še ni popolnoma izdelana; možno je, da jo bo mogoče prirediti za izolacijo iz katerega koli izdelka in da bo mogoče izgnati barvila iz kloroforma z bolj milimi reagenti kot je HCl ter jih pri tem še bolj koncentrirati, ne pa razredčiti.

Svoje raziskave sem usmeril v naslednje probleme:

- 1) Ali so poleg Biocidana uporabne tudi druge podobne, lahko dosegljive spojine?

Preiskusal sem Asepsol in Omnisan, ki sta oba različno čisti raztopini alkil-dimetil-benzil amonijevega klorida v vodi, razredčena z desetkratno količino vode. Ugotovil sem, da sta oba uporabna (tabela št. 7).

Ko sem obenem preiskušal razne pufre sem opazil, da bo-raks preprečuje to reakcijo - ne nastane niti oborina niti se barvila ne ekstrahirajo v CHCl_3 . Poleg tega sem ugotovil, da se te spojine topijo tudi v metilenkloridu, nekatere v benzenu, izredno slabo v trikloretilenu in praktično nič v tetraklorogljiku. Vendar je od vseh to-pil najprimernejši kloroform zaradi tega, ker se plasti dokaj hitro ločijo.

- 2) Ali je mogoče z vode izprati iz kloroforma druge v vodi topne snovi, ne da bi pri tem izpral tudi barvila (kar n.pr. pri izolaciji z višjimi alkoholi ni mogoče)?
- Večina barvil pri izpiranju z vodo (nasičeno z zrakom) ne prehaja vanjo, nekatera prehajajo le v sledovih. Pri izpiranju z acetatnim pufrom (pH = 4,3) pa prehaja že več barvil toda vsa v sledovih (tabela št. 7).

Kloroformsko raztopino je mogoče temeljito izprati z vo-do, ne da bi pri tem izgubili pomembne količine barvil.

- 3) Izpiranje barvila iz CHCl_3 s HCl conc. ni posebno u-godno, ker je dobljena vodna raztopina barvila precej razredčena, vsebuje večji del površinsko aktivne sno-vi in v tako močno kislem mediju nekatera barvila raz-padajo. Katere snovi bi omogočile izgnati barvila iz kloroforma v vodo tako, da bi bila vodna raztopina barvil čim bolj koncentrirana in da ne bi vsebovala drugih primesi?

Take snovi bi morale biti laže topne v kloroformu kot v vodi; ravno tako tudi njihove spojine s površinsko aktiv-no snovjo, poleg tega pa bi morale biti te spojine vsaj toliko stabilne kot spojine barvil in površinsko aktivne snovi.

Ugotovil sem, da izmed kislin najbolj ustreza tem zahtevam salicilova kislina, ki je zelo slabo topna v vodi, dobro v kloroformu in je precej močna kislina. Najboljše rezultate sem dobil, če sem jo dodajal polagoma; raztopljeno v kloroformu. Dodajanje trdne kisline se ni obneslo, ker mnoga barvila niso prešla v vodo, če sem dodal preveč ali premalo kisline.

Poleg tega, da sem v kloroformu raztopljeno kislino lahko pravilno doziral, sem s tem postopkom dosegel tudi, da sem iz močno razredčene raztopine barvila dobil vedno raztopino, ki je bila dovolj koncentrirana za nadaljnje postopke. N.pr.: iz 20 ml sladoleđa niansiranega z rdečim barvilom sem ekstrahiriral večji del barvila s skupno 3 do 8 ml kloroforma, ki sem ga nato opral z vodo, s tokom zraka odparil na cca 2 ml in izgnal barvilo v dve kaplji vode.

Po tem postopku se dajo v vodni raztopini tako koncentrirati le zelo hidrofilna barvila (živilska in njim podobna); nekatera barvila prehajajo v vodo le delno in je treba njihove raztopine pozneje koncentrirati. Barvila, ki se v kislem v vodi ne topijo (kislja ksantenska in barvila za lake) pa sploh ne preidejo vanjo.

V takih primerih, pa tudi, ko sem dodal preveč salicilove kisline in barvila zaradi nje niso prešla v vodo, sem si pomagal tako, da sem vodo odstranil in namesto nje ekstrahiriral z amonijakom. Dobljeni ekstrakt ni tako čist, vendar je dostikrat še uporaben za identifikacijo barvila.

Razen s salicilovo kislino je mogoče izgnati barvila v vodo tudi z vodno raztopino Ivozona 50. (Dodecilbenzen-sulfonat - Teol Ljubljana). Da bi dobil čim bolj čisto in koncentrirano raztopino, sem najprej previdno nevtraliziral prebitni kationski detergent z 0,1 % raztopino Ivozona 50. Vodno fazo, ki je bila brezbarvna ali pa komaj opazno pobarvana, sem zavrgel, nato pa izgnal barvila v vodo z 0,5 do 1 % raztopino. Pri tem sem si moral pomagati s centrifugiranjem,

da sem vedno dobil bistro vodno raztopino.

4) Direktna izolacija kisljih barvil iz izdelkov:

Iz izdelkov, ki ne vsebujejo beljakovin in detergentov, poteka izolacija barvil po tej metodi brez posebnih težav, zlasti če uporabimo centrifugo.

Zadovoljive izolacije iz izdelkov, ki vsebujejo beljakovine, pa ne da nobena od dosedaj poznanih metod. Vzrok za to je dejstvo, da se beljakovine v kislem mediju, ki ga zahtevajo vsi ostali postopki, obarjajo in nanje se veže tudi barvilo ter ga zato ni mogoče izolirati. Pri pripravi ekstraktov barvil z amonijakalnimi alkoholnimi topili pa se topi v njih dovolj beljakovin, da se pri nakisanju spet obarjajo in tako odtegnejo barvila.

Vzrok je očitno v tem, da se barvila vežejo na amino-, imino - ali mogoče celo amido skupine, ki se pri obarjanju s kislino začasno sprostijo. Temu bi se dalo izogniti s tem, da izvršimo izolacijo v alkalnem ali pa da blokiramo bazične skupine.

Prvi pogoj izpolnjuje ravno ta postopek, saj je najbolj uspešen pri pH 9. Toda ob dodatku detergenta se beljakovine oborijo in potegnejo s seboj tudi del barvil.

Drugi pogoj izpolnjuje postopek, s katerim so poskušali izolirati barvila iz mlečnih izdelkov tako, da so suspenziji ali emulziji beljakovin v vodi dodali formaldehid in jih nato oborili s trikloroocetno kislino (193). Na ta način oborjene beljakovine povlečejo s sabo le malo barvila. Ugotovil sem, da v vodni raztopini preostane kljub temu še precej snovi, ki motijo nadaljnjo izolacijo, zato tudi po tem postopku nisem dobil vedno zadovoljivih rezultatov.

Formolna reakcija, s pomočjo katere so blokirali aktivne bazične centre na beljakovinah, ima svoj optimum ne v močno kislem, temveč v alkalnem okolju pH 9, torej pri istem pH kot reakcija detergent-barvilo. Zato sem pričakoval, da bo kombinacija obeh postopkov dala zadovoljiv rezultat, kar se je tudi zgodilo, saj sem n.pr. tudi barvilo Brilliant-schwarz BN kvantitativno izoliral iz rib, ki sem jih en teden prej pobarval z njim in izpral nevezano barvilo z vodo.

Postopek:

Pomešamo približno 20 g izdelka in 1 do 2 ml koncentriranega formalina, naalkalimo z 10 % Na_2CO_3 ali NH_4OH na pH 9 in ekstrahiramo s kloroformom. Ekstrakcijo ponavljamo z majhnimi porcijami (2 do 5 ml) kloroforma, dokler ekstrakt ni brezbarven. Kloroformske ekstrakte združimo in preiščemo na prisotnost bazičnih in v maščobah topnih barvil. V vodno plast damo prebitok 1 % raztopine kationskega detergenta (n.pr. Asepsol razredčen z vodo 1:10), dobro premešamo in ponovno ekstrahiramo s kloroformom. Reakcija ne poteče trenutno, zato je dobro pustiti zmes nekaj minut, da se delno usede, nato pa dobro stresati in centrifugirati.

Če je dodatek detergenta zadosten, dobimo tri plasti: spodaj obarvan bister kloroform, na njem deloma obarvan sloj oborin, na vrhu pa bister in brezbarven vodni sloj, na katerem včasih plavajo delci maščobe. Če je zgornji sloj moten in obarvan, je treba dodati še nekaj detergenta in ponoviti postopek.

Bistro in brezbarvno vodno raztopino zavržemo, oborino pa izpiramo s kloroformom, dokler ne ostane brezbarven. Včasih je barvilo lažje izprati potem, ko iz pogače iztisnemo večji del vode.

Kloroformsko raztopino dobro izperemo z vodo, da izženemo topne snovi, nato pa s previdnim dodajanjem kloroformske raztopine salicilove kisline izženemo barvila v primerne količine vode, ali pa z 0,1 % raztopino Ivozona 50 vežemo prebitni kationski detergent in nato z 1 % raztopino izženemo barvila.

Vodno raztopino barvil očistimo s kloroformom in jo uporabljamo za identifikacijo.

V slučaju, da barvilo kljub prebitku kationskega detergenta ne preide v kloroform, je zelo verjetno prisotno bazično barvilo, ki se ne topi v njem. V tem primeru je treba dodati prebitek anionskega detergenta in ponovno ekstrahirati. Iz kloroforma izženemo barvilo s kationskim detergentom.

Obnašanje barvil pri izolaciji po tem postopku je prikazano v tabeli št. 7.

Št.	Barvilo	Barvna snov	Reagenti	Opazovanja
1	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
2	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
3	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
4	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
5	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
6	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
7	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
8	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
9	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
10	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
11	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
12	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
13	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
14	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
15	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
16	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
17	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
18	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
19	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
20	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
21	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
22	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
23	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
24	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
25	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
26	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
27	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
28	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
29	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
30	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
31	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
32	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
33	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
34	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
35	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
36	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
37	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
38	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
39	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
40	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
41	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
42	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
43	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
44	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
45	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
46	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
47	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
48	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
49	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi
50	metilena modra	$C_{16}H_{18}N_3S_3$	H_2O	ne topi

Obnašanje barvil pri izolaciji po tem postopku je prikazano v tabeli št. 7.

Tabela št. 7

Obnašanje barvil pri postopku z detergenti in kloroformom

Raztopina:	vodna		kloroformska		prehod iz kloroforma v vodo po dod.			
	Dodatek: Na_2CO_3	N^+R_4		H_2O barva	Acetat pH 4,3 vod. sloja	sal.ksl.	alk.sal.	Ivopon 50
Barvilo								
1	b.spr.	rum.mot.	rumena	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
2	b.spr.	rum.mot.	rumena	brezb.	sl.rum.	pop.	pop.	pop.
3	b.spr.	rum.mot.	rumena	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
4	b.spr.	modr.mot.	rdeča	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
5	b.spr.	rd.mot.	rdeča	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
6	b.spr.	rd.mot.	rdeča	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
7	oranž.	or.rd.ob.	oranžna	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
8	b.spr.	rd.ob.	rdeča	brezb.	brezb.	nič	delno	pop.
9	bolj rd.	rd.mot.	or.rj.	brezb.	rahlo or.	pop.	pop.	pop.
10	b.spr.	md.ob.	md.vij.	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
11	bolj md.	md.ob.	modra	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
18	čr.rd.	rd.mot.	rdeča	brezb.	rahlo rož.	delno	pop.	pop.
21	b.spr.	zel.mot.	zelena	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.
22	bolj or.	rj.mot.	rjava	brezb.	brezb.	delno	pop.	pop.
23	bolj rd.	rd.mot.	or.rj.	brezb.	rahlo or.	pop.	pop.	pop.
25	sl.top.or.	rum.or.ob.	oranžna	brezb.	brezb.	nič	dobro	pop.
26	ne top.	or.mot.	oranžna	brezb.	brezb.	nič	dobro	pop.

27	b.spr.	rd.mot.	rd.or.	brezb.	brezb.	delno	pop.	pop.
33	tem.rj.	rj.mot.	čr.rj.	brezb.	rahlo rum.	delno	pop.	pop.
34	b.spr.	b.spr.	tem.md.	rahlo md.	rahlo rum.	delno	pop.	pop.
35	b.spr.	bel.ob.izg.	zelena	brezb.	rahlo rum.	delno	pop.	pop.
36	b.spr.	bolj rd.	rj.vij.	brezb.	rahlo rum.	nič	dobro	pop.
42	b.spr.	bistra	rumena	brezb.	rahlo rum.	pop.	pop.	pop.
43	b.spr.	mot.izg.	or.rum.	brezb.	brezb.	nič	dobro	pop.
45	b.spr.	oran.	oranžna	sl.or.	brezb.	nič	delno	pop.
46	tem.rd.	rd.mot.	oranžna	brezb.	brezb.	delno	pop.	pop.
47	tem.rd.	mot.izg.	rumena	brezb.	brezb.	delno	pop.	pop.
50	b.spr.	mot.izg.	rdeča	brezb.	brezb.	delno	pop.	pop.
56	ne top.	potemni	oranžna	brezb.	brezb.	nič	delno	pop.
62	b.spr.	b.spr.	rdeča	brezb.	brezb.	delno	pop.	pop.
76	tem.md.	vij.mot.	vijol.	brezb.	brezb.	delno	pop.	pop.
82	b.spr.	sv.md.ob.	modra	brezb.	brezb.	pop.	pop.	pop.

 N^+R_4 - kvarterna amonijeva baza (n.pr. Asepsol)

sal.ksl.- salicilova kislina

alk.sal.- alkalijski salicilat

b.spr. - brez spremembe

or.rd.ob. - oranžno rdeča oborina

pop. - popolen

sl.md. - slabo moder

č) Izolacija z adsorbciijo na anorganske adsorbente

Najbolj je obdelana izolacija na Al_2O_3 in SiO_2 (82, 130, 187, 191, 193, 209, 225). Na SiO_2 se adsorbirajo bazična barvila iz nevtralne ali rahlo alkalne vodne raztopine. Enako se adsorbirajo na bazičnem Al_2O_3 . Na kislem Al_2O_3 se adsorbirajo kislina barvila iz kisle raztopine - vodne ali alkoholne.

Postopek:

Bazična barvila

Rahlo alkalno vodno raztopino prefiltriramo skozi kolono napolnjeno s SiO_2 ali bazičnim Al_2O_3 , izprano z razredčenim NH_4OH . Kolono operemo z razredčenim amonijakom in vodo ter eluiramo barvila z razredčeno očetno kislino.

Kislina barvila

Skozi kolono, napolnjeno s kislim Al_2O_3 , izprano z 1 n HCl, prefiltriramo nakisano vodno raztopino barvil. Kolono izperemo z vodo. Barvila eluiramo z 1 %-NH₄OH. Barvila lahko adsorbiramo tudi iz kisle alkoholne raztopine, vendar mora biti kolona prej izprana z istim alkoholom. Po adsorbciiji pa kolono operemo s kislim etanolom in končno z vodo ter eluiramo barvila.

Lahko pa v kisli raztopini barvila suspendiramo aktivirani Al_2O_3 , zmes močno stresamo, centrifugiramo ali filtriramo, adsorbent operemo z vodo in eluiramo iz njega barvila. Operacijo je treba ponavljati tako dolgo, dokler prvotna raztopina ni brezbarvna.

Ta postopek sem preiskusil in ugotovil, da za izolacije ni tako primeren kot postopek s kloroformom. Ker pa po teka izolacija po drugačnem principu kot pri ekstrakciji s topili, lahko te ekstrakte dodatno čistimo s tem, da barvila adsorbiramo iz ekstrakta na Al_2O_3 in odstranimo še prisotne primesi z izpiranjem z etanolom in vodo.

Pregled značilnosti metod za izolacijo in dokaz v vodi topnih barvil

Metoda:	Izolacija možna iz:				Z njo lahko izoliramo barvila:			ni primerna za izolacijo teh barvil:
	ekstrakta, vodne razt.	direktno iz izdelka	bazična	ksanten.	kisla			
					trifenilmet.	azo in dr.		
s poliamidi (n.pr. volno)	da	včasih	da	da	da	da	10, 21, nekatera trifenilmet.	
eter	da	včasih	nekatera	večina				
višji alkoholi	da	včasih	da	da	da	da		
kinolin	da	včasih	da	da	da	da		
CHCl ₃ (kompl. z R-SO ₃ H)	da	da	da					
CHCl ₃ + (kompl. z NR ₄)	da	da		da	da	da	35 počasi razpada	
SiO ₂	da		da		76			
Al ₂ O ₃	da		da	da	da	da		

POVZETEK:

Izdelal sem postopek, s katerim je mogoče izolirati v vodi topna barvila iz katerega koli živila, ker beljakovine blokiramo s formaldehidom, barvila pa ekstrahiramo s kloroformom v obliki spojin, netopnih v vodi in nižjih alkoholih.

Za izolacijo barvil iz ekstraktov, ki ne vsebujejo beljakovin so uporabni tudi razni drugi postopki, ki so prikazani v tabeli št. 8.

Laki in pigmenti

Laki

Barvila se dajo dostikrat izolirati iz lakov tako, da substrat, na katerega je barvilo vezano, vežemo v stabilnejši kompleks in barvilo izoliramo na primeren način. Ali pa vežemo barvilo v drug stabilnejši kompleks, ki ga ekstrahiramo s primernim topilom.

Na prvi način sem barvilo izoliral tako, da sem vodno suspenzijo laka močno nakisal s HCl in ekstrahirал barvilo z izoamilnim alkoholom. Če se je barvilo slabo topilo, sem dodal še etilendiamintetraocetno kislino ali pa NaF, po potrebi tudi segreval. Alkoholno plast sem dobro opral z razredčeno HCl in če barvila niso prehajala v vodo, tudi z vodo.

Po razredčenju s petroletrom sem jih izpral iz organskega sloja z razredčenim NH_3 ali pa sem uporabljal kar alkoholno raztopino.

Na drugi način sem barvilo izoliral tako, da sem naravnal pH suspenzije na 9, dodal primeren detergent in ekstrahirал barvilo v kloroform. Ta postopek ni tako

zadovoljiv kot prejšnji, ker je nekatera barvila zelo težko ločiti od detergentov, ker so v vodi slabo topna. Vsaj enakovreden pa je takrat, ko izoliramo dobro topna barvila.

Pigmenti:

Pri tem, ko odstranjujemo ostala barvila, gredo včasih z njimi tudi nekateri pigmenti. Preostale pigmente pa poskušamo raztopiti n.pr. v benzenu, kloroformu, tetrahidrofuranu, piridinu, dietilaminu, etanolaminu, dimetilformamidu, mravljinčji kislini in drugih topilih. Še prej pa se je dobro prepričati, da imamo res opravka z organskimi barvili. Če nobeno druge topilo ne pomaga, pa uporabimo H_2SO_4 conc. ali pa alkoholni KOH eventualno ob dodatku reducentov.

P O V Z E T E K

Opisal sem postopke, s katerimi sem izoliral sintetska barvila iz živil in tistih predmetov splošne rabe, za katera je z zakonodajo barvanje urejeno. Ker so ti postopki selektivni, je obarvan ekstrakt po končanih izolacijskih postopkih zadosten dokaz za prisotnost organskih sintetskih barvil v preiskanem izdelku.

Postopki za pripravo surovih ekstraktov ali za izolacije direktno iz raznih vrst izdelkov so opisani na str. 53 do 61, postopki za dokončno ločitev barvil od spremljajočih snovi pa na straneh 64 do 91.

Iz poteka posameznih izolacij je razvidno, da je taka razdelitev potrebna v glavnem le zaradi boljše preglednosti opisanih postopkov, medtem ko je treba pri konkretnem delu vedno imeti pred seboj dobre in slabe strani raznih metod, da lahko iz obnašanja vzorca pri pripravi za izolacijo izberemo najugodnejši postopek za nadaljnjo analizo.

Za izolacije iz živil je najbolj primeren postopek s kloroformom in detergenti (str. 84), ker je najbolj univerzalen.

Za izolacije v maščobah topnih barvil je primerna tudi ekstrakcija izdelka s petroletrom in izolacija barvil iz tega ekstrakta z organskimi topili (str. 70) ali Al_2O_3 (str. 64).

Za izolacijo večine v vodi topnih barvil iz surovih ekstraktov, ki vsebujejo zanemarljive množine beljakovin so primerni tudi drugi postopki, zlasti postopek z volno, ker je najbolj občutljiv. Zaradi identifikacije pa je dostikrat koristno, da s temi postopki dobljeno dokaj čisto raztopino barvila še dodatno čistimo po postopku, ki je osnovan na drugačnem mehanizmu (čiščenje sušine eluata z volne z metanolom ali izoamilnim alkoholom-str. 74, čiščenje vodnih ali alkoholnih raztopin z Al_2O_3 -str. 88).

III. LOČITEV IN IDENTIFIKACIJA BARVIL

Dokazu prisotnosti barvila vedno nujno sledi ugotovitev, ali se prisotna barvila identična s tistimi, ki jih zakonodaja izrecno dovoljuje, ali ne.

Identiteto barvil bi najbolj zanesljivo ugotovili z določitvijo strukturne formule barvila. Nadalje bi si pri identifikaciji barvil lahko pomagali z njihovimi fizikalnimi konstantami (tališče, molekularna teža, absorpcija svetlobe) in kemijskimi reakcijami.

Da bi te konstante določili, je treba najprej dobiti čista barvila. Čim vemo, da z nekim postopkom ločimo barvilo od vseh ostalih, lahko s to ločitvijo že ugotovimo, da je prisotno prav to barvilo in ne katero druge. Z določitvijo fizikalnih konstant in z reakcijami potem to ugotovitev le še potrdimo. To pomeni, da je najvažnejši del identifikacije medsebojna ločitev barvil.

Na grebo jih lahko ločimo med seboj že pri izolaciji (v maščobah topna, bazična in kislav v vodi topna barvila ter njihovi laki, pigmentna barvila). Vsake od teh skupin pa je treba potem ločiti na posamezne komponente.

Prvi postopek za sistematično analizo zmesi v vodi topnih barvil je izdelal Koch. Ta metoda je osnovana na dejstvu, da barvila prehajajo iz amilalkohola v vodo (ali obratno) pri različni koncentraciji kisline. Po tem principu je izdelana uradna ameriška metoda za identifikacijo barvil ⁽¹³⁷⁾ in razne njene modifikacije. Njena slaba stran je v tem, da zahteva sorazmerno velike količine barvil ter da je postopek zelo dolgotrajen in kompliciran.

Posebno neugodna je zahteva po večji količini barvil, kajti dostikrat pride v preiskavo vzorec, ki vsebuje tako malo barvil, da je komaj mogoče zanesljivo dokazati nji-

hoye prisotnost, bodisi da je vsega vzorca premalo, ali pa je z barvili le niansiran, da bi mu prikrili slabo kvaliteto.

Tudi kolenska kromatografija ima podobne hibe, čeprav sem jo pri izolaciji koristno uporabil.

Zato sem se odločil, da bom za ločitev barvil uporabil le izrazite mikro metode - papirne in tankoplastno kromatografijo ter elektroforezo.

A) Kromatografija

S kromatografije barvil za barvanje zlasti živil pa tudi predmetov splošne rabe, se je ukvarjale že mnogo analitikov - obravnava jo nad polovico vseh člankov, ki so omenjeni v poglavju Literatura. Pregled o delih do l. 1959 je podan v člankih Pla Delfina (149 do 158), najvažnejši od ostalih pa pri posameznih postopkih.

Večinoma se delali na papirju. Preiskovali so v glavnem manjše skupine barvil, nekateri izmed njih pa se kromatografirali mnoga barvila, ki se zaradi škodljivih vplivov ne uporabljajo več. Za vsake take skupine so poiskali eno ali več mobilnih faz, v glavnem pa se uporabljali sisteme drugih avterjev. Objavljenih je kar precej mobilnih faz, ki se pe sestavi zelo razlikujeje. Prevladujeje alkoholne m.f., precej je fenolnih, najmanj pa ketonskih in eterskih.

Ker se obravnavali različne skupine barvil, kljub obilici mobilnih faz ni megeče postaviti njihove sestave v sistem, ki bi bil uporaben za ločitev večine tovrstnih barvil, ki jih naša zakonodaja dovoljuje.

V praksi je zaželjeno, da z istim analitskim sistemom rešimo čim več različnih problemov, zato sem poskušal ugotoviti:

- 1) najbolj ugodna razmerja raznih topil za ločitev čim več barvil
- 2) čim bolj točna pravila, kako zamenjati eno topilo z drugim
- 3) v katerih lastnostih si morajo biti ta topila podobna
- 4) katere izmed mobilnih faz, sestavljenih po teh pravilih, so najbolj primerne za medsebojno ločitev barvil v posameznih skupinah.

Uporabljal sem navzgorno tehniko, ker je tehnično najmanj zahtevna, ne da bi bili zaradi tega rezultati slabši.

Delal sem v prostoru s temperaturo približno 20 °C. Če je bila kdaj temperatura drugačna, je to omenjeno v tekstu.

Uporabljal sem:

- Papir: A/ a) Whatman 3MM angleške proizvodnje v obliki trakov 13 x 150 mm, le nekaj poskusov pa s trakovi širokimi 26 mm.
- b) Whatman 2 angleške in vzhodnonemške proizvodnje ter Whatman 3MM vzhodnonemške proizvodnje v obliki listov dolgih 50 do 450 mm in širokih 190 do 250 mm - odvisno od tehnike dela in potreb.
- c) Ederol 202 in 208 (J. Binzer Hatzfeld)

Za impregnacijo papirja sem uporabljal:

- a) parafinsko olje 5 in 10 vol. % v etru
- b) silikonsko olje DC 703 /Dow Corning Corporation) 5 in 10 vol. % v etru
- c) perlon 4,5 in 8 % v HCOOH

- d) etanolamin 10 vol. % v etanolu
- e) dimetilformamid - aceton 1:1
- f) etanolamin:dimetilformamid:aceton 5:30:35
- g) 0,1 n NaCl
- i) cetilalkohol v etanolu 2 in 5 %

Op.: Količine trdnih snovi sem podal v utežnih delih, tekočin v volumskih.

B/ Acetiliran papir MN 214 Ac/10 in MN 214 Ac/20
(Macherey, Nagel & Co.)

Adsorbenti za tankoplastno kromatografijo:

A/ Celulozni prah MN 300 in MN 300 F₂₅₄ (Macherey, Nagel & Co.). Za 5 plošč 20 x 20 cm sem uporabil 15 g prahu, ki sem ga z 90 ml vode 1 minuto mešal z mikserjem Hönsch. Plošče sem premazal z aparatom tvrdke DESAGA Heidelberg (širina reže 0,3 mm), posušil na zraku in aktiviral 10 min pri temperaturi 110 °C).

B/ Silikagel G (Kemika, Macherey, Nagel & Co.)
Za 5 plošč 20 x 20 cm ali 20 plošč 5 x 20 cm sem vzel 20 g silikagela in 45 ml vode in jih premazal 90 do 100 sekund po dodatku vode v silikagel, posušil na zraku in aktiviral 30 min na 110 °C.

C/ CaCO₃ (DAB.6.)
20 g CaCO₃ in 4 g škroba sem strl v tarilnici, pomešal s 50 ml vode in premazal plošče. Premaz sem sušil 30 min pri temperaturi 110 °C.

Posode za kromatografijo:

- 1) Epruvete 25 x 200 mm
- 2) Kadi 210 x 100 x 210 mm, znotraj obložene s filtrirnim papirjem za nasičevanje in pokrite s stekleno ploščo.

Nanašanje barvil:

Uporabljal sem cca 0,1 % raztopine barvil v 70 % etanolu (v vodi topna barvila), 95 % etanolu (v maščobah topna barvila), nasičene raztopine v kloroformu (pigmentna barvila). Nanašal sem jih 2 cm od spodnjega roba v medsebojni razdalji 5 do 20 mm. Premer lis je bil pod 5 mm.

Barvila sem nanašal blizu skupaj, kadar sem hotel ugotoviti, ali je kromatografski sistem tak, da si barvila med seboj ne motijo petevanja. V redkih primerih, ko so se lise sosednjih barvil med seboj pomešale ali deformirale, sem ugotovil, da je bila zaradi neprimernega topila ločitev slaba tudi pri večji medsebojni razdalji, ali pa da je imele barvilo primešano neko snov, ki je difundirala naokoli in popolnoma spremenila obnašanje barvil. Destokrat sem prav zaradi tega lahko ugotovil, da je bil ekstrakt barvila nečist in sem ga pred nadaljnjo identifikacijo še dodatno očistil.

Delo sem razdelil na papirno in tenkoplastno kromatografijo:

- 1) v vodi topnih kislih barvil
- 2) v vodi topnih kislih ksantenskih barvil
- 3) v vodi topnih bazičnih barvil
- 4) v maščobah topnih barvil
- 5) pigmentnih barvil

V VODI TOPNA KISLA BARVILA

V to skupino nisem vključil ksantenskih barvil, ker se pri kromatografiji obnašajo precej drugače kot ostala v vodi topna barvila, temveč sem jih obravnaval posebej. To je ugodno zlasti še zato, ker jih je mogoče ločiti od ostalih barvil z ekstrakcijo z etrom iz ocetno kisle raztopine. Pač pa sem vključil tudi barvila, ki se uporabljajo v obliki lakov.

Izjemoma sem istočasno z ostalimi kislimi barvili kromatografiral eritrozín, da mi je označeval fronto pri uporabi kisljih in nevtralnih mobilnih faz.

Kromatografiral sem z dvema sistemoma mobilnih faz.

V prvem prevladujejo organska topila, v drugega pa spadajo vodne raztopine soli.

Izbira organskih topil:

- 1) nižjemolekularna organska topila, ki se mešajo z vodo v vsakem razmerju, niso primerna za ločitev barvil na papirju.
- 2) Prav tako se ne uporabljajo dvofazne zmesi, katerih organska faza vsebuje malo vode.

Zato sem poskušal dobiti nekaj različnih mobilnih faz, s katerimi bi ločil med seboj živilska in tudi kozmetična barvila. Za uvodne poskuse sem izbral tri skupine barvil glede na to, kako ležije na kromatogramu, razvitem z zmesjo n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:2:1:4, ki sem jo uporabljal pri kromatografiji živilskih barvil že prej. Ta mobilna faza je dala precej lepo oblikovane lise barvil, toda ločitev barvil je bila slaba, ker so vsa barvila (št. 1 - 11) razen eritrozina ostala v spodnji tretjini kromato-

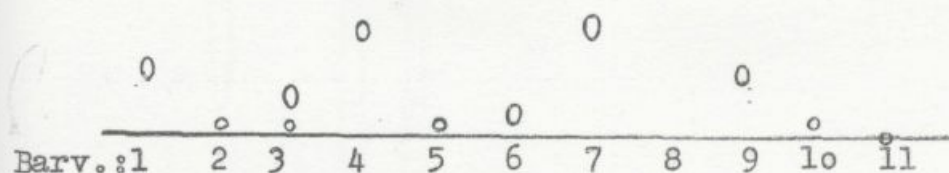
grama razdeljena v dve skupini, eritrozín pa je bil na fronti.

Kromatogram št. 1

m.f. : n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:2:1:4

papir: Whatman 2

T = 20 °C



Za poskušanje novih zmesi sem izbral tri barvila iz spodnje skupine (kritična trojica: 2, 5, 10), dve barvili iz zgornje (4, 9) ter Erythrosin extra (8), ki naj bi predstavljal ksantenska barvila.

št. 8 - Erythrosin extra

št. 4 - Azorubin S

št. 9 - Gelborange S

št. 10 - Indigotin IA

št. 2 - Tartrazin

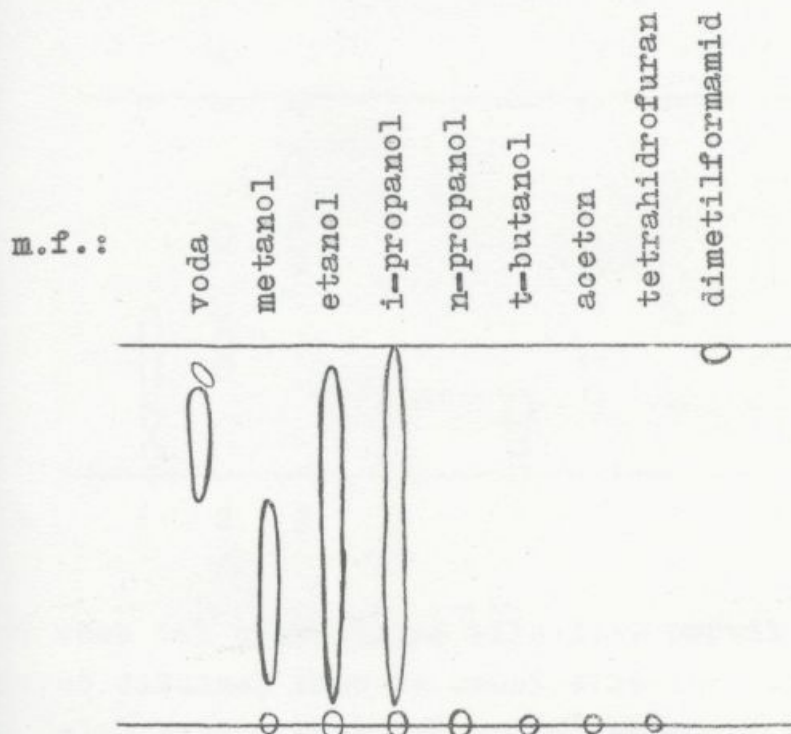
št. 5 - Amaranth

Ta barvila sem kromatografiral na kromatogramih št. 2 do 11 na 13 mm širokih trakovih papirja Whatman 3 MM pri temperaturi 19 do 22 °C.

Za začetek sem poiskusil, kako vplivajo na potovanje teh barvil nekatera čista topila, ki se mešajo z vodo v vseh razmerjih.

Kromatogram št. 2

papir in barvila: glej str. 99



Čista topila niso dala ugodnih rezultatov.

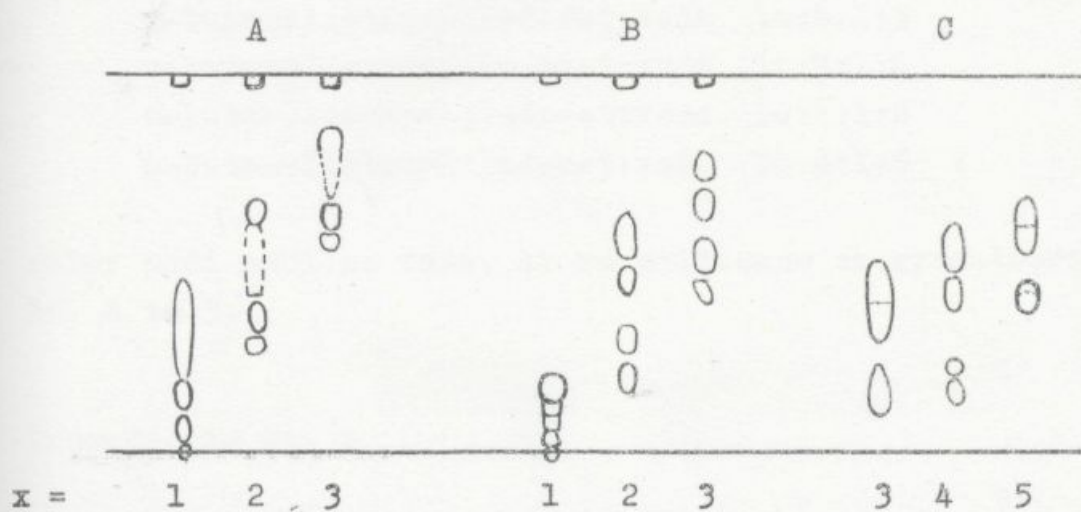
Uvodni poskusi - vpliv vode in organskih topil na lego in obliko lis

Topilom, ki sama ne premaknejo barvil s starta, sem dodajal vodo in opazoval njen vpliv na ločitev barvil. Ugotovil sem, da dajejo ostreje omejene lise topila z večjo molekularno težo; optimalno razmerje topilo:voda je približno 5:2, razen pri t-butanolu, kjer je 5:4. Toda barvila se niso popolnoma ločila med seboj.

Kromatogram št. 3

- m.f.: A) aceton:voda 5:x
B) tetrahidrofuran:voda 5:x
C) t-butanol:voda 5:x

Papir in barvila - glej str. 99



Pri vseh teh poskusih so bile lise barvil na kromatogramih preveč difuzne, zato te zmesi same niso uporabne za praktično delo. Vendar so bile manj difuzne pri zmesih z organskimi topili z večjimi molekularnimi težami.

Potem ko sem k zmesi n-propanol:mlečna kislina:voda 5:1:3, pri kateri so bile lise večine barvil difuzne in so ležale v zgornji polovici kromatograma, dodal še en del metilen klorida, sem ugotovil, da je dala ta mobilna faza nekaj lepo oblikovanih lis. Še boljši rezultat sem dobil, ko sem vzela zmes n-propanol:CH₂Cl₂:mlečna kisl.:voda 6:2:1:3.

Iz tega sem sklepal, da prisotnost v vodi slabo topnega organskega topila bistveno vpliva na obliko lis.

Da bi preveril te sklepe, sem kromatografiral ista barvila (glej str.99) z naslednjimi mobilnimi fazami, ki vse vsebujejo topilo, ki se delno meša z vodo, topilo, ki se dobro meša z vodo, vodo, nekatere pa vsebujejo tudi organsko kislino:

m.f.: n-butanol:metanol:ledocet:voda 10:2:1:4
n-butanol:metanol:ledocet:voda 10:2:1:5
n-butanol:metanol:ledocet:voda 10:2:1:6
n-butanol:metanol:ledocet:voda 10:2:1:8
n-butanol:metanol:ledocet:voda 10:4:1:4

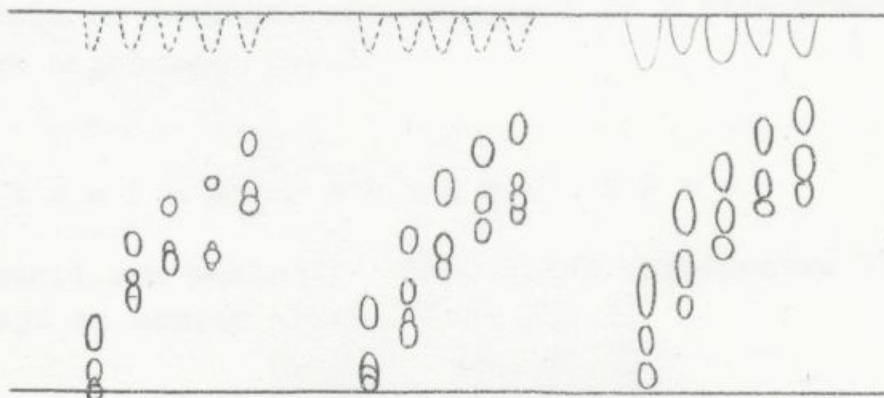
n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:2:1:5
n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:3:1:5
n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:4:1:5
n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:3:1:6
n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:4:1:6
n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:6:1:6

kakor tudi mobilne faze, ki so prikazane na kromatogramih št. 4 in 5.

Kromatogram št. 4

m.f.: n-butanol:n-propanol:HCOOH:voda
papir in barvila(glej stran 99)

razmerje: 4:2:1:x 3:2:1:x 2:2:1:x
 x = 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

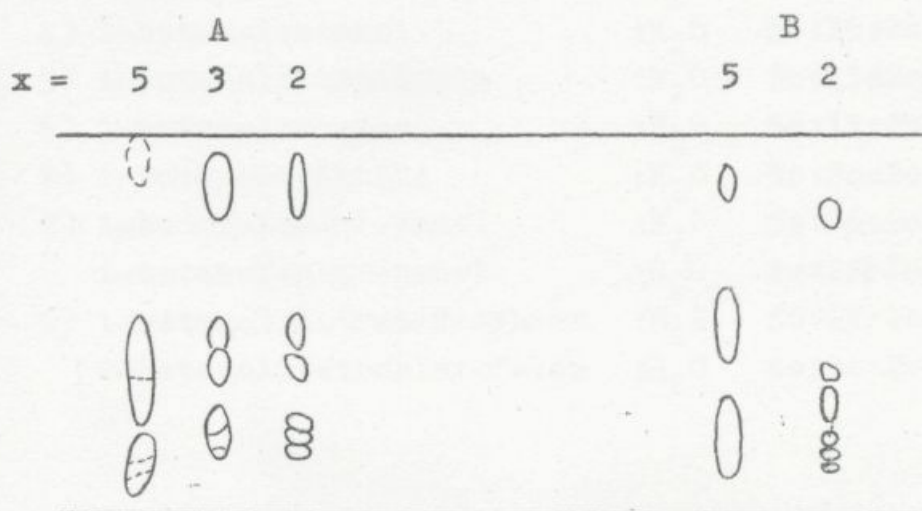


Kromatogram št. 5

m.f.: n-butanol:aceton:voda 5:x:3 - A

amilni alkohol:dimetilformamid:voda 5:x:2 - B

papir in barvila (glej str. 99)



Tudi pri teh poskusih sem opazil, da je ločitev in oblika lis najboljša pri razmerju višje organsko topilo:voda 5:2 do 5:3 ter da so lise tem bolj difuzne, čim večji delež zavzema nižje molekularno topilo, ki se dobro meša z vodo. Sklepal sem, da bodo dale najostreje omejene lise zmesi višje organsko topilo:nižje organsko topilo:voda 50:x:20, ki se ravno še ne razmešajo. Da se zmes ne bi razmešala na papirju, sem dodajal 1 do 2 dela prebitka nižjega organskega topila.

N e v t r a l n e m o b i l n e f a z e

Preiskusil sem naslednje zmesi (glej kromatogram št. 6,7,8), ki imajo za osnovo alkohol (kr. št. 6)

keton (kr. št.7)

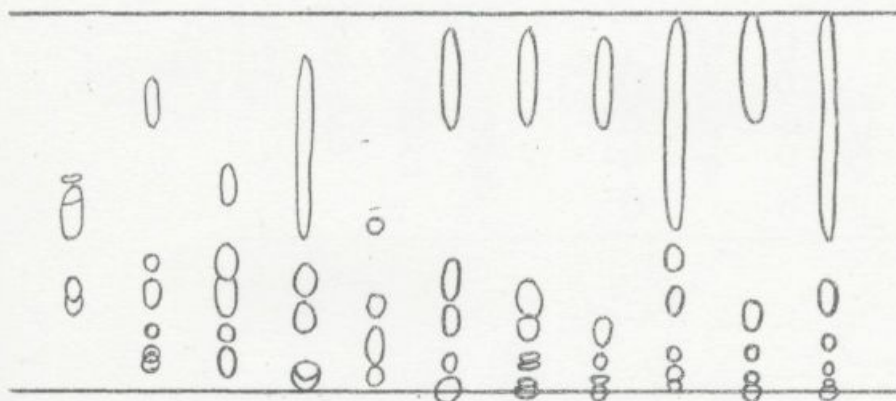
ester (kr. št.8).

Kromatogram št. 6

papir in barvila - glej str. 99

m.f.:	1) i-butanol:formamid	:H ₂ O	50:14:20
	2) i-butanol:dimetilformamid	:H ₂ O	50: 8:20
	3) i-butanol:metanol	:H ₂ O	50:11:20
	4) i-butanol:etanol	:H ₂ O	50:15:20
	5) i-butanol:etanolamin	:H ₂ O	50:13:20
	6) i-butanol:aceton	:H ₂ O	50:15:20
	7) i-butanol:piridin	:H ₂ O	50:20:20
	8) i-butanol:n-propanol	:H ₂ O	50:26:20 - a)
	i-butanol:n-propanol	:H ₂ O	40:28:20 - b)
	9) i-butanol:tetrahidrofuran	:H ₂ O	50:28:20 - a)
	i-butanol:tetrahidrofuran	:H ₂ O	40:30:20 - b)

1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8a) 8b) 9a) 9b)



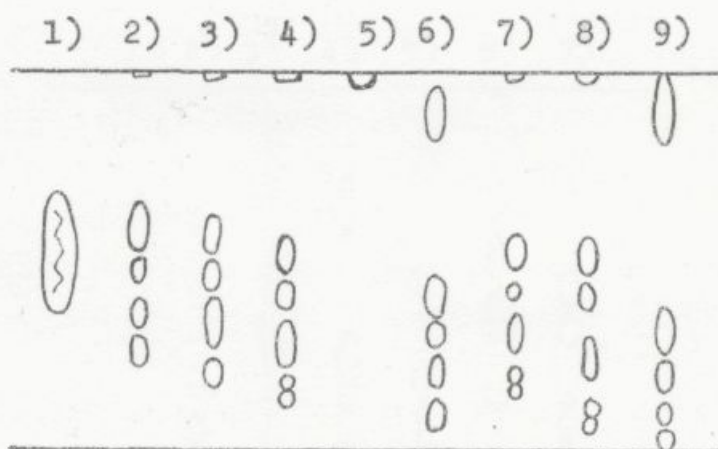
Podobne rezultate dajo tudi mobilne faze z drugimi butanoli:

n-butanol:metanol	:voda	50: 8:20
n-butanol:etanol	:voda	50:10:20
n-butanol:n-propanol	:voda	50:20:20
n-butanol:piridin	:voda	50:17:20
n-butanol:ledocet	:voda	50: 8:20 in 50:12:30
n-butanol:aceton	:voda	50:10:20
t-butanol:etilacetat	:voda	50:10:40
t-butanol:etilacetat	:voda	50:30:40
t-butanol:etilacetat	:voda	50:30:50

Kromatogram št. 7

papir in barvila glej str. 99

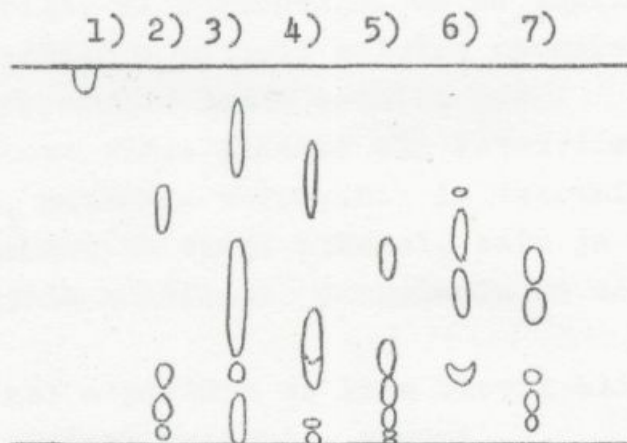
- m.f.: 1) metiletilketon:formamid :voda 50: 5:20
2) metiletilketon:dimetilformamid:voda 50: 7:20
3) metiletilketon:metanol :voda 50: 4:20
4) metiletilketon:etanol :voda 50: 8:20
5) metiletilketon:etanolamin :voda 50:60:20
6) metiletilketon:aceton :voda 50:12:20
7) metiletilketon:piridin :voda 50: 4:20
8) metiletilketon:n-propanol :voda 50:10:20
9) metiletilketon:tetrahidrofuran:voda 50:19:20



Kromatogram št. 8

papir in barvila glej str. 99

m.f.:	1) etilacetat:formamid	:voda	50:56:20
	2) etilacetat:dimetilformamid	:voda	50:34:20
	3) etilacetat:metanol	:voda	50:20:20
	4) etilacetat:etanol	:voda	50:22:20
	etilacetat:piridin	:voda	50:23:20
	5) etilacetat:piridin	:voda	50:21:20
	etilacetat:piridin	:voda	50:26:20
	6) etilacetat:tetrahidrofuran	:voda	10:40:20
	7) etilacetat:n-propanol	:voda	25:25:20



Podoben rezultat sta dali tudi mobilni fazi:

butilacetat:metanol:voda 5: 4: 2

butilacetat:piridin:voda 4: 5: 2

Ugotovitve:

1) Osnova mobilne faze

Glavne sestavine mobilnih faz so lahko:

- a) organska topila, ki se le delno mešajo z vodo (butanoli, pentanoli in drugi alkoholi, ki so jim podobni po topnosti v vodi; butanon, pentanoni, dioni s podobnimi lastnostmi; estri).

b) Organska topila, ki se sicer še mešajo z vodo v vseh razmerjih, vendar se po lastnostih že približujejo topilom, ki se z vodo le delno mešajo (n-propanol, tetrahidrofuran, t-butanol in podobni). Ta topila uporabimo lahko sama (zlasti t-butanol), vendar dobimo lepše oblikovane lise, če jim dodamo primerno količino topila, ki je v vodi slabo topno (topila skupine a, nekateri višji alkoholi, ketoni, amini; pa tudi ogljikovodiki in njihovi halogenizirani derivati).

Po podatkih v literaturi bi ustrezali tudi nekateri fenoli in aromatski amini, a jih zaradi agresivnosti in strupenosti nisem uporabljal.

2) Organska topila, ki povzročajo, da se topila pod 1) zmešajo z vodo (redčila): najbolj splošno uporaben je piridin, neuporaben je formamid. Izmed ostalih pa:

a) če je osnova višji alkohol ali keton: dimetilformamid, etanol, aceton, metanol. n-Propanol in tetrahidrofuran že sama delno nadomestita višji alkohol, zato je treba le-tega dodajati v manjših količinah. Etanolamin se dobro meša le z alkoholi.

V sistemu butanol - piridin so lise barvil bliže skupaj kot n.pr. pri sistemu butanol - etanol.

b) če je osnova ester: višjim estrom (butilacetatu) je bolje dodajati nižji alkohol (metanol), nižjim estrom (etilacetatu) pa višji (n.pr. propanol).

V mnogih primerih so dobre esterske mobilne faze sestavljene tako, da je glavna sestavina topilo, ki se še meša z vodo (glej 1 b), estra pa dodamo toliko, da se zmes ravno še ne razmeša. Vsoto količin obeh topil pa upoštevamo pri dodatku vode.

Acetocetnemu estru je najbolje dodajati metanol ali etanol. Ostala topila, tudi piridin, dajo slabše rezultate.

3) Za ločitev najugodnejše razmerje osnovno organsko topilo (ali vsota dveh organskih topil): voda je med 5:2 in 5:3.

4) Ločitve

Najmanj se ločijo barvila med seboj pri uporabi alkoholov. Alkoholne mobilne faze so tudi najbolj počasne, dajo pa sorazmerno lepo oblikovane lise.

Mnogo hitrejšje so ketonske in esterske mobilne faze; ločitve barvil in oblika lis sta precej odvisni od dodatkov, na splošno pa so lise bolj difuzne. Boljša ločitev pa vendar včasih odtehta večjo difuznost (primerjava butanol-butanon).

5) Preveriti je treba, kako vplivajo na ločitev razni drugi dodatki (n.pr. kisline in baze).

K i s l e m o b i l n e f a z e

Vpliv kislin na ločitev barvil sem preiskusil na sistemu n-propanol:voda 50:20. Ta sistem sem vzel zato, ker:

- alkoholne mobilne faze najmanj ločijo barvila med seboj, hotel pa sem dobiti dodatek, ki ločitev izboljša
- alkoholi se s kislinami sčasoma zaestrijo; če bi vzel višji alkohol, bi se zmes kaj lahko razmešala
- taka zmes je enostavna in v njej ni primesi, ki bi maskirale vpliv kislin.

V tem topilu sem topil po en in deset delov kisline ter kromatografiral takoj in še po štirih dneh.

Uporabil sem naslednje kisline:

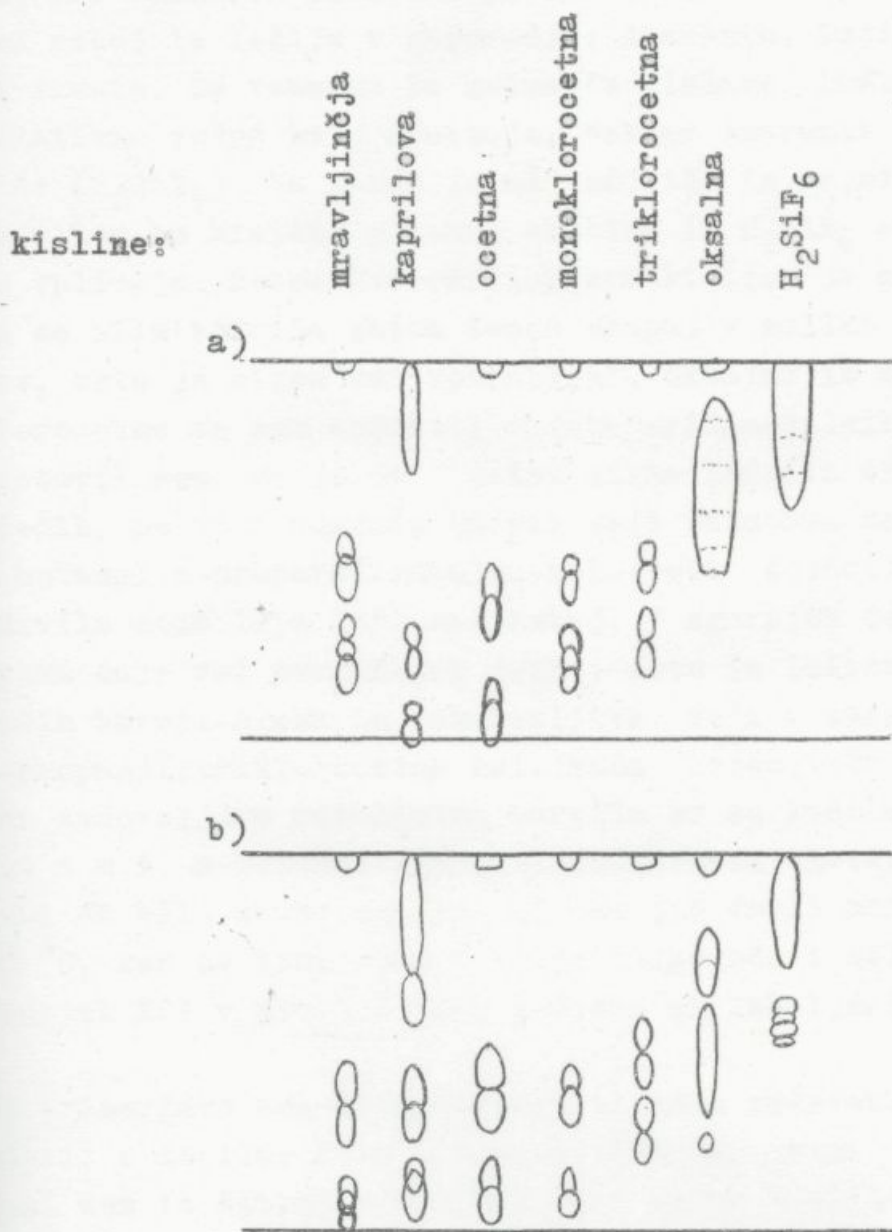
mravljinčjo	etilendiamintetraocetno
ocetno	vinsko
monoklorocetno	mlečno
triklorocetno	valerianovo
benzojevo	kaprilovo
salicilovo	rezorcinol
sulfosalicilovo	K-biftalat
oksalno	H_3BO_3
H_2SiF_6	H_3PO_4

Kromatogram št. 9

papir in barvila glej str. 99

m.f.: a) n-propanol:kislina:voda 50:10:20

b) n-propanol:kislina:voda 50: 1:20



Iz slike je razvidno, da jakost kisline, pa tudi njena koncentracija vplivata na razpored barvil. Tako n.pr. dodatek močnejše kisline (mravljinčje, monoklorocetne, triklorocetne) povzroči, da se barvila Tartrazin, Amaranth, Indigotin IA

ločijo med seboj. Medtem ko se pri sistemih brez kislin in pri uporabi očetne ali podobne kisline barvili Tartrazin in Amaranth prekrivata in je Indigotin IA tik nad njima, dodatek monokloročetne kisline (50:1:20) povzroči, da Tartrazin spleza više in se prekriva z barvilom Indigotin IA; pri razmerju 50:10:20 pa so vsa tri barvila že ločena med seboj in ležijo v zaporedju: Amaranth, Indigotin IA, Tartrazin. Če vzamemo še močnejše kisline, Indigotin IA relativno vedno bolj zaostaja, dokler Amaranth ne leži više (H_2SiF_6). Na razdaljo med najviše in najniže ležečim barvilom pa kisline - razen oksalne in H_2SiF_6 - bistveno ne vplivajo. Heksafluorosilicijeva kislina je povzročila, da so bila barvila zbita tesno skupaj v obliki ozkih trakov, zato je nisem več uporabljal. Oksalno in sorodno trikloročetno pa sem uporabil v nekaterih mobilnih fazah. Ugotovil sem, da je za ločitev nizko ležečih črnih, modrih, rdečih, pa tudi rumenih barvil zelo primerna mobilna faza n-butanol:n-propanol:oksalna ksl.:voda 40:60:1:40, ki ta barvila zelo lepo loči med seboj. V zgornjem delu kromatograma daje več zverženih front, zato je ločitev više ležečih barvil slaba in nezanesljiva. Tudi z zmesjo n-butanol:n-propanol:trikloročetna ksl.:voda 10:40:1:20 sem dobil še kar zadovoljive rezultate; barvila so se ločila precej bolje kot z m.f. n-butanol:etanol:ledocet:voda 10:2:1:4. Posebno lepi so bili kromatogrami, ki sem jih dobil pri temperaturi 40 °C, ker so ločitve pri višji temperaturi boljše. Dodatek KCl v mobilno fazo ločitve ni izboljšal.

Za primerjavo sem kromatografiral zmes nekaterih živilskih barvil z mobilno fazo t-butanol:kislina :voda 5:1:4. Vzel sem le šibkejše kisline, ker močne kisline ne dajo lepih ločitev (167).

Kromatogram št. 10

m.f.: t-butanol:kislina:voda

5:1:4

papir: Whatman 3 MM

barvila:

kislina:

8 - Erythrosin extra

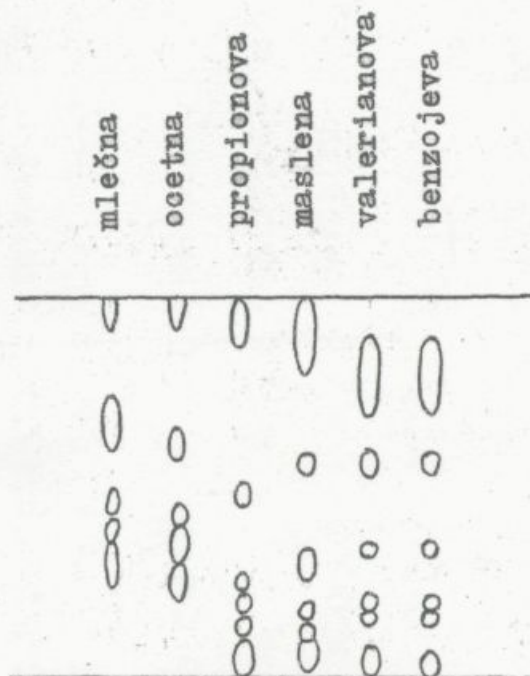
4 - Azorubin S

6 - Cochenillerot A

5 - Amaranth

2 - Tartrazin

11 - Brillantschwarz BN



Ugotovitev:

Šibkejše kisline dajo boljše ločitev, barvila se razporedijo čez dve tretjini kromatograma, lise so pri večini barvil lepo oblikovane. Če ne bi bila tako počasna, bi bila mobilna faza s to sestavo ena od najboljših kislih mobilnih faz. To napako je mogoče odpraviti s tem, da delamo pri višji temperaturi (n.pr. pri 40 °C); ločitev se pri tem ne poslabša.

Preiskusil sem tudi sistema:

valerianova ksl.:metanol:voda

valerianova ksl.:dimetilformamid:voda,

da bi videl, kako se kromatografirajo barvila z mobilno

fazo, katere glavna sestavina je višja maščobna kislina.

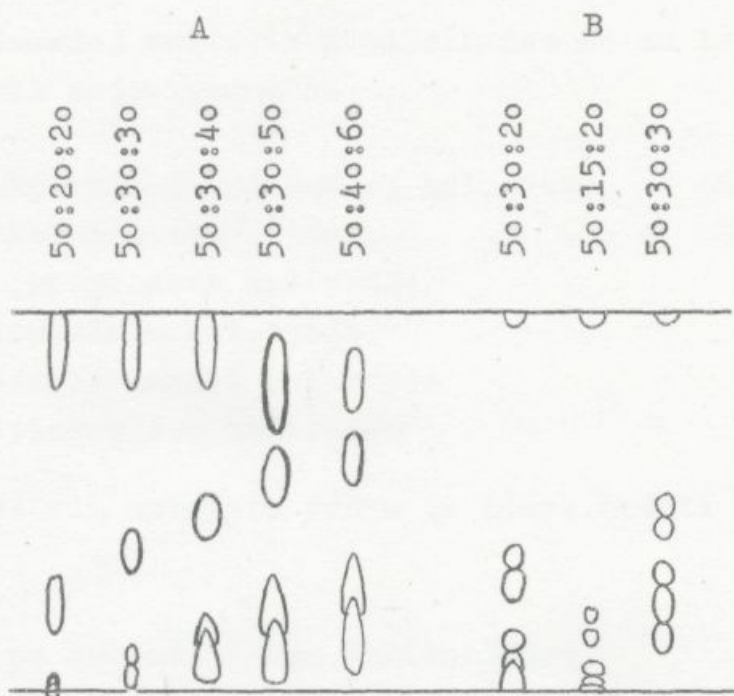


Kromatogram št. 11

papir in barvila glej str. 99

m.f.: A) valerianova ksl.:metanol:voda

B) valerianova ksl.:dimetilformamid:voda



Pri uporabi sistema valerianova ksl.:metanol:voda sem dobil večjo razdaljo med zgornjimi in spodnjimi barvili. Medsebojna ločitev barvil v vsaki skupini pa ni zadovoljiva.

Mobilna faza valerianova ksl.:dimetilformamid:voda v razmerju 50:30:20 in 50:30:30 je ločila med seboj barvila Amaranth, Tartrazin, Indigotin IA, pa tudi Gelborange S in Azorubin S; pri tem se je ločitev v skupini zabrisala. Pri razmerju 50:15:20 sem dobil ostro omejene lise, toda zelo nizke Rf-vrednosti.

Poleg že omenjenih sistemov sem preiskusil še naslednje zmesi:

metiletilketon:aceton:voda

7:3:3 in 5:2:2

metiletilketon:aceton:oksalna ksl.:voda	50:20: 1:20
metiletilketon:aceton:valerianova ksl.:voda	50:20: 5:20
metiletilketon:ledocet:voda	50: 5:20
acetilaceton:aceton:voda	40:50:20
acetilaceton:aceton:ledocet:voda	40:50:2 :20
i-butanol:etanol:ledocet:voda	50:15: 5:20

Od vseh dosedaj naštetih mobilnih faz so za ločitev živil-
skih barvil najprimernejše:

metiletilketon:aceton:oksalna ksl.:voda	50:20: 1:20
metiletilketon:aceton:voda	7:3:3 in 5:2:2
t-butanol:propionova ksl.:voda	5: 1 : 4
t-butanol:maslena ksl.:voda	5: 1 : 4
t-butanol:valerianova ksl.:voda	5: 1 : 4
t-butanol:benzojeva ksl.:voda	5: 1 : 4

zadnjim štirim mobilnim fazam je dobro dodati še po 0,4 %
KCl.

Uporabne pa so tudi druge mobilne faze.

B a z i č n e m o b i l n e f a z e

Organske baze sem uporabljal tudi kot redčila (piridin,
etanolamin, str. 104, 105, 106). Pri tem se je pokazalo,
da bazičnost piridina ne pride do izraza - obnaša se kot
nevtralno topilo.

Etanolamin je vplival na ločitev drugače kot nevtralna red-
čila, vendar se dobro meša le z alkoholi. Potovanje zmesi,
v katero sem ga dodal, je izredno močno zavrl; dobljeni
kromatogrami pa so kmalu porumeneli. Še močnejše sta se poka-
zali ti lastnosti pri uporabi trietanolamina.

Dodatek amonijaka k zmesem, ki so že same po sebi uporabne nevtralne mobilne faze, opazno spremeni njihove lastnosti. Ločitev mnogih barvil se izboljša, Rf-vrednosti se v nekaterih primerih bistveno spremenijo, pa tudi ostrina lis se izboljša. Vse te pojave sem opazoval pri uporabi naslednjih mobilnih faz:

i-butanol	:etanol	:amonijak:voda	50:15:10:10
n-butanol	:metanol	:amonijak:voda	75:12:15:24
n-butanol	:etanol	:amonijak:voda	50:40:10:30
n-butanol	:aceton	:amonijak:voda	10: 2: 2: 3
metiletilketon	:aceton	:amonijak:voda	50:20: 5:15
metiletilketon	:metanol	:amonijak:voda	50: 5: 5:15
etilacetat	:n-propanol	:amonijak:voda	50:50:10:30
acetocetni ester	:etanol	:amonijak:voda	50:20: 2:20

Na kromatogramu št. 12 je prikazana lega lis barvil. Njihov medsebojni razpored je značilen za vse te mobilne faze.

Primerjava, kako se obnašajo barvila pri kromatografiji s kislo, "nevtralno" in alkalno mobilno fazo, je podana na kromatogramu št. 13.

Uporabil sem tudi dietilamin:

n-butanol:etanol:dietilamin:voda	100:30: 5:40
metiletilketon:aceton:dietilamin:voda	50:15: 1:20

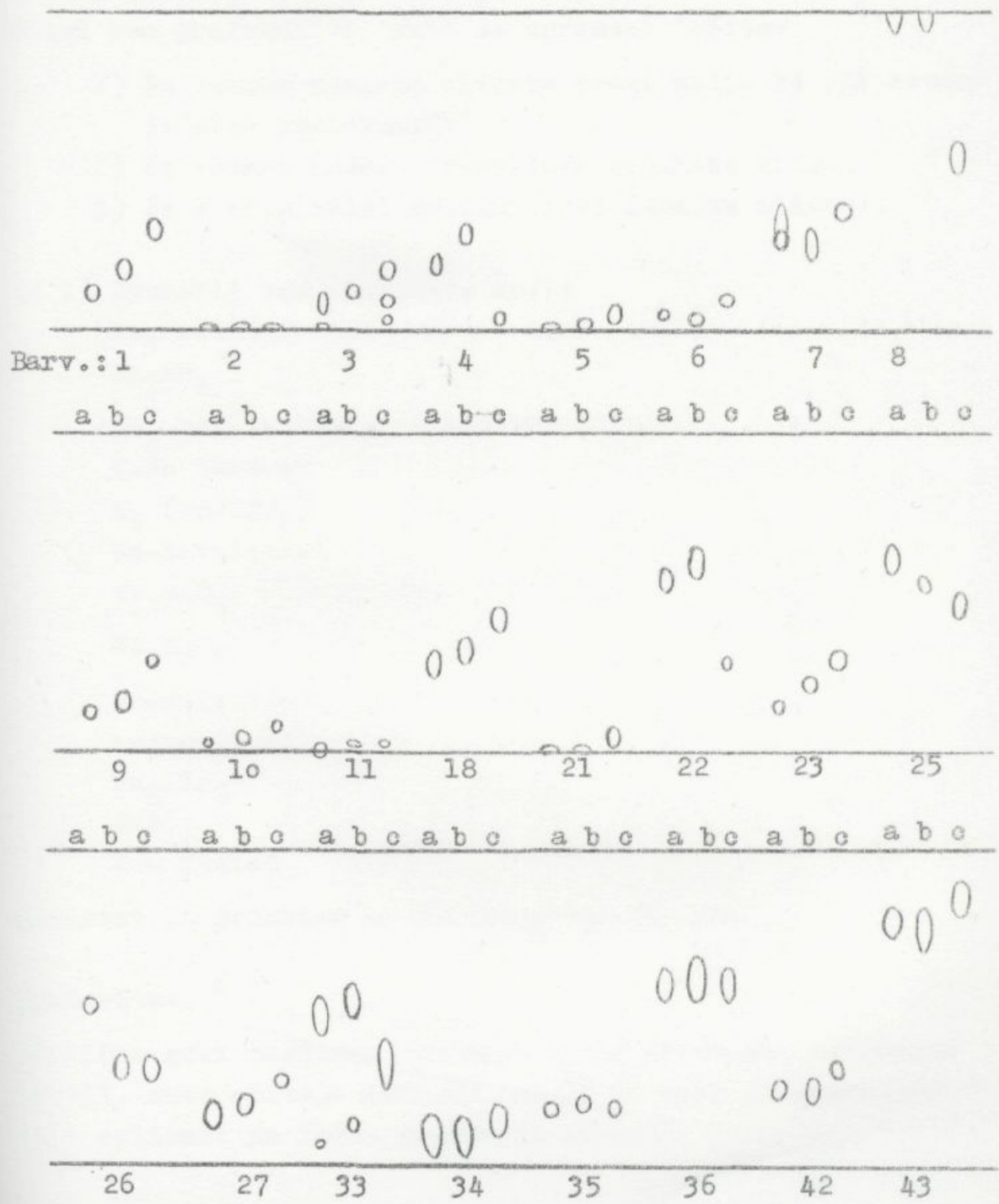
Vpliv dietilamina se pozna po tem, da so Rf-vrednosti barvil večinoma višje, nekatere lise pa mnogo bolj difuzne kot pri amonijakalnih mobilnih fazah. Ločitev barvil je v glavnem slabša.

Kromatogram št. 13

m.f.: a) izobutanol:etanol:ledocet:voda 50:15: 5:20
b) izobutanol:etanol:voda 50:20:20
c) izobutanol:etanol:amonijak:voda 50:15:10:10

papir: Whatman 2

m.f.: a b c a b c a b c a b c a b c a b c a b c a b c



Mobilne faze: Vodne raztopine soli

Te vrste mobilnih faz so uvedli v uporabo Thaler in sodelavci (204, 206); njihov najboljši dosežek - mobilna faza s sestavo 2 % terc.Na-citrat v 5 % NH_4OH je še vedno ena izmed tistih, ki jih širom po svetu najpogosteje uporabljajo pri analizi živilskih barvil.

Na tem področju sem usmeril poskuse predvsem v tri smeri. Hotel sem preizkusiti, kako se spremeni ločitev

- 1) če vzamem namesto citrata druge soli, ki jih avtorji niso preiskusili
- 2) če vzamem namesto amonijaka organske amine.
- 3) če k originalni mobilni fazi dodajam alkohol.

Ad 1) Uporabil sem naslednje soli:

Na_3 citrat

Na_2SO_4

Na_2 -etilendiamintetraacetat

K-Na tartrat

K_4 (Fe/CN/6)

Na-barbiturat

$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Na-salicilat

amonsulfosalicilat

Na_2SiF_6

NaF

K - ftalat

Rezultat je prikazan na kromatogramu št. 14.

Ugotovitev:

Različne soli različno vplivajo na R_f -vrednosti nekaterih barvil, zato obstoja možnost, da bi se dalo z zamenjavo soli vplivati na ločbo nekaterih barvil.

V ta namen sem kromatografiral barvila z naslednjimi mobilnimi fazami:

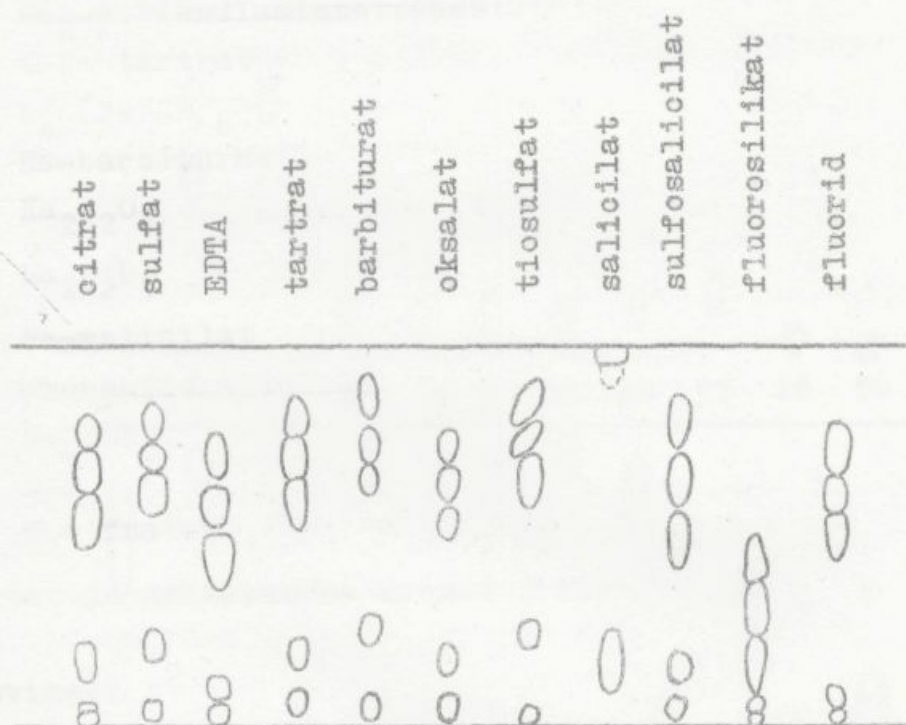
$\text{Na}_3\text{citrat}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH conc.}$ 2:80:20
 $\text{KH ftalat}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH conc.}$ 2:80:20
 $\text{Na}_2\text{EDTA}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH conc.}$ 2:80:20
 $\text{Na}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH conc.}$ 2:80:20

Kromatogram št. 14

m.f.: sol:voda:amonijak 2:80:20

papir: Whatman 3 MM

barvila: 2 - Tartrazin
6 - Cochenillerot A
9 - Gelborange S
4 - Azorubin S
8 - Erythrosin extra

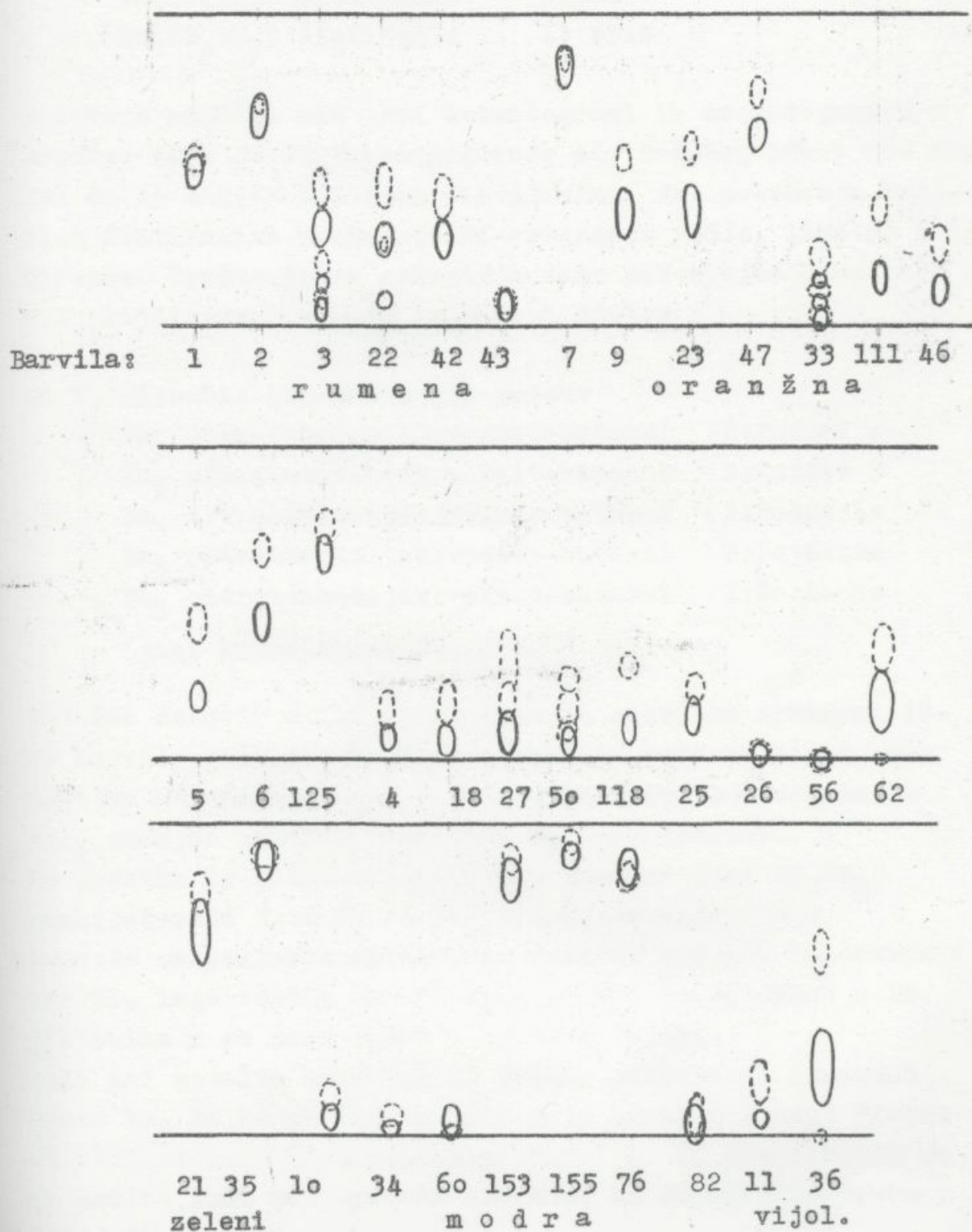


Kromatogram št. 15

m.f.: Na₂-etilendiamintetraacetat:amonijak:voda 2:20:80

Na₂-citrata:amonijak:voda 2:20:80 znak: ○

papir: Whatman 2



Kromatogrami se razlikujejo po legi oranžnih in rdečih barvil. To bo mogoče uporabiti pri identifikaciji barvil.

Ad 2) Namesto amonijaka sem vzel dietilamin in kromatografiral z naslednjimi mobilnimi fazami:

$\text{Na}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{dietilamin}$	1:100:2
$\text{Na}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{dietilamin}$	2:100:2
$\text{Na}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{dietilamin}$	1: 95:5

Bistvene razlike med temi kromatogrami in kromatogramom z mobilno fazo $\text{Na}_2\text{SO}_4:\text{amonijak}:\text{voda}$ ni. Podoben efekt kot amonijak da že manjša količina dietilamina. Pri povečanju količine dietilamina postajajo Rf-vrednosti večje, lise pa bolj difuzne. Upoštevno se spreminja samo medsebojna lega barvil Brilliant Schwarz BN in Benzyl Violet 4B.

Ad 3) Uporabil sem naslednje zmesi:

Na_3 citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80: 0
Na_3 citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80: 5
Na_3 citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80:10
Na_3 citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80:20
Na_3 citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80:30

(glej kromatogram št. 16).

Dodatek desetih delov t-butanela le nekoliko spremeni lego barvil, pač pa teče topilo dvakrat počasneje kot brez dodatka alkohola. Dodatek dvajsetih delov t-butanela še bolj zmanjša hitrost, poslabša pa tudi ločitev.

Po dodatku 10 delov t-butanela k mobilni fazi $\text{Na}_2\text{SO}_4:\text{amonijak}:\text{voda}$ 2:20:80 in Na_3 citrat:amonijak:voda 2:20:80 se poslabša medsebojna ločitev rumenih in oranžnih barvil, lega rdečih barvil se bistveno ne spremeni - le Violamine R se zelo dobro loči od ostalih.

Tudi pri ostalih barvilih ni drugih pozitivnih sprememb, razen te, da se po dodatku alkohola barvilo Benzyl Violet 4B loči od barvila Brilliant Schwarz BN. Ti dve barvili pa se ločita tudi pri uporabi citrata, ne da bi bilo treba dodajati alkohol.

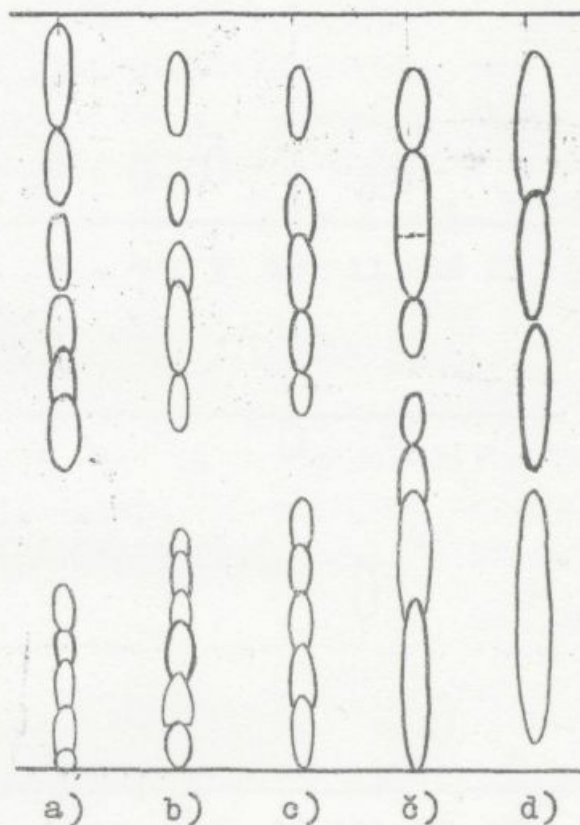
Kromatogram št. 16

m.f.:	a) Na ₃ citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80:0
	b) Na ₃ citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80:5
	c) Na ₃ citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80:10
	č) Na ₃ citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80:20
	d) Na ₃ citrat:amonijak:voda:t-butanol	2:20:80:30

papir: Whatman 3 MM

barvila:

- 7 - Scharlach GN
- 2 - Tartrazin
- 6 - Cochenillerot A
- 1 - Echtgelb
- 9 - Gelborange S
- 5 - Amaranth
- 3 - Chinolingelb
- 4 - Azorubin S
- 10 - Indigotin IA
- 8 - Erythrosin extra
- 11 - Brilliant Schwarz BN

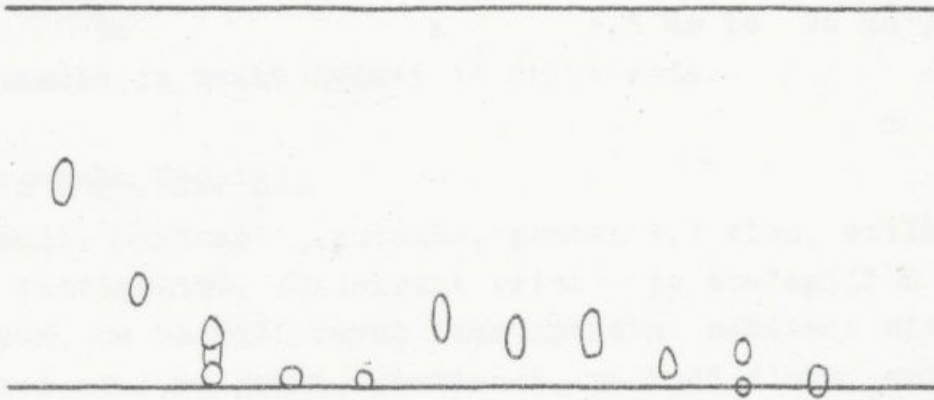


Kromatografiral sem tudi z 10 % HCl. S to mobilno fazo se ločijo zlasti nekatera rumena in oranžna barvila, medtem ko ostane večina rdečih in modrih barvil blizu starta, le trifenilmetanska barvila so ob fronti.

Kromatogram št. 17

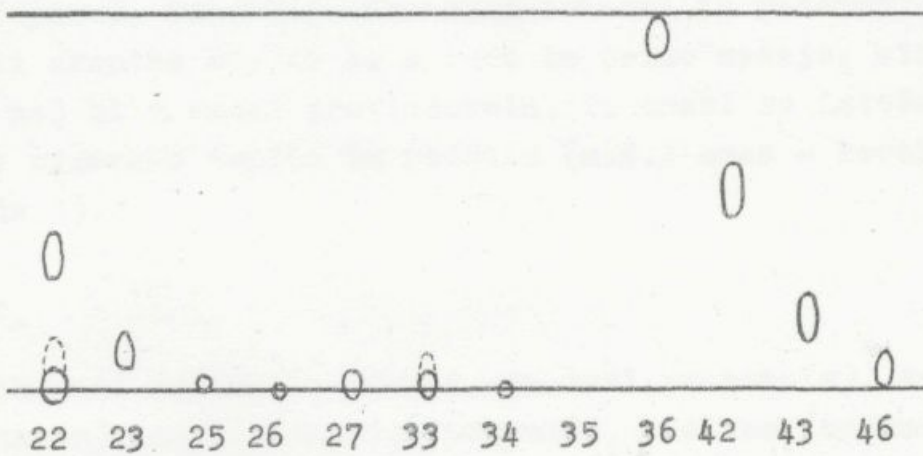
m.f. 10 % HCl

papir: Whatman 2

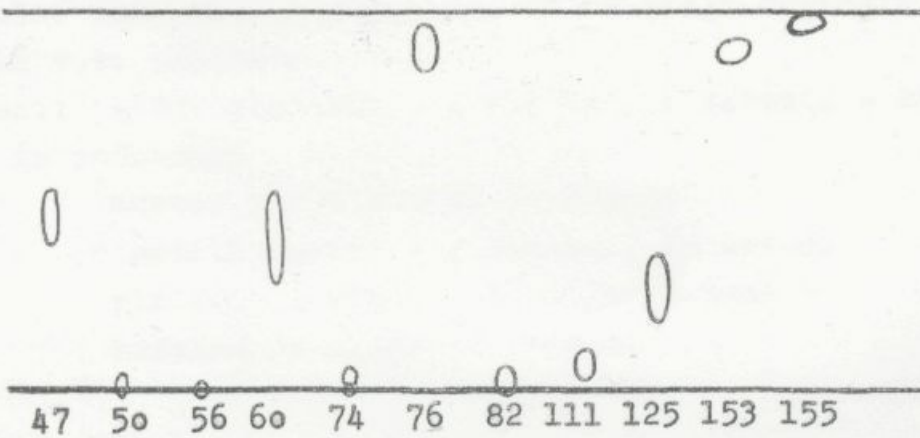


Barvila: 1 2 3 4 5 6 7 9 10 11 18 21

op.: štev. 21 je razpadla



op.: štev. 35 je razpadla



Povzetek:

- 1) Najprimernejša sestava mobilne faze, v kateri so glavne sestavine organska topila, je sledeča:
višje organsko topilo - redčilo - korektor - voda
50 x o,5 do 10 20 do 30
t-butanolu je treba dodati 40 delov vode.

Višja organska topila:

- a) butanoli, pentanoli, butanon, pentan 2,4 dion, etilacetat, butilacetat, acetocetni ester - po analogiji s temi sklepan, da bi bili ravno tako uporabni nekateri dioli, njihovi etri in estri, pentanoni, pa tudi dioni, estri nižjih alkoholov in kislin (C_1 do C_4).
- b) zmesi topil, ki se z vodo še mešajo v vseh razmerjih (n-propanol, tetrahidrofuran, t-butanol in podobna), s topili skupine a), ki se z vodo le delno mešajo; slednja naj bi v zmesi prevladovala. Te zmesi so istočasno višje organsko topilo in redčilo (m.f.: zmes - korektor - voda !).

Redčila:

nižji alkoholi (metanol, etanol, pa tudi propanola), ketoni (acetona), amidi (dimetilformamid), kisline (ocetna, propionova), baze (piridin). Najprimernejša količina: nekaj delov več, kot je potrebno, da se višje organsko topilo in voda pomešata.

Uporabnost: nižji alkoholi : z višjimi, s ketoni, s ketonestri in podobnimi

acetona : z alkoholi in ketoni

dimetilformamid : z alkoholi in ketoni

piridin: z estri, alkoholi, ketoni

kisline: z alkoholi, ketoni

Korektorji: organske kisline

Uporabni sta zlasti očetna in propionova, pa tudi druge maščobne ter nekatere močnejše kisline n.pr. mravljinčja, klorirane očetne kisline, oksalna.

Pri alkoholnih mobilnih fazah je treba upoštevati tvorbo estrov, zato je priporočljivo uporabljati samo sveže zmesi ali pa vsaj en teden stare. Močnejše kisline (n.pr. oksalna) povzročijo, da se na kromatogramu pojavi več front, zato je njihova uporaba umestna le, če preiskujemo barvila, ki imajo na kromatogramih, razvitih z nevtralnimi ali slabo kislimi mobilnimi fazami zelo nizke Rf-vrednosti.

baze

Najbolj splošno uporaben je amonijak. Za močnejše baze pa v grobem velja isto kot za kisline, čeprav pojavljanje več front ni tako pogosto (n.pr. pri uporabi dietilamina).

Piridin se obnaša kot nevtralno topilo.

Voda:

Videti je, da je količina vode, ki jo je potrebno dodati, da bi dobili optimalno ločitev, v neki zvezi z lastnostmi višjih organskih topil. Hidrofilnejšim topilom ni treba dodati toliko vode kot manj hidrofilnim, da bi dosegli približno iste Rf-vrednosti barvil.

Izjema je t-butanol, ki daje najlepše ločitve, če je razmerje t-butanol:kislina (C₃ do C₅):voda 5:1:4.

- 2) Alkalne vodne raztopine soli razporedijo barvila precej drugače kot organske mobilne faze. Ker se tudi s svojo hitrostjo lahko kosajo z le-temi, je njihova uporaba zelo priporočljiva.

Klasična mobilna faza 2 % tere. Na citrat v 5 % amonijaku je ena izmed najboljših v tej družini, vendar je v posebnih primerih mogoče doseči ugodnejše ločitve z uporabo drugih soli ali baz. Tudi dodatek alkohola k tem zmesem je smotrno uporabiti le v nekaterih primerih.

TENKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

a) na celuloznem prahu

Tudi o tej metodi je v literaturi nekaj podatkov (175, (177, 216, 217) vendar le za barvila za barvanje živil. Ta postopek sem razširil tudi na ostala barvila.

Za primerjavo z rezultati dobljenimi na papirju sem na celuloznem prahu MN 300 in MN 300 F₂₅₄ kromatografiral z naslednjimi mobilnimi fazami ista barvila kot na papirju. Izbral sem nekatere izmed mobilnih faz, ki so dale na papirju najlepše ločitve.

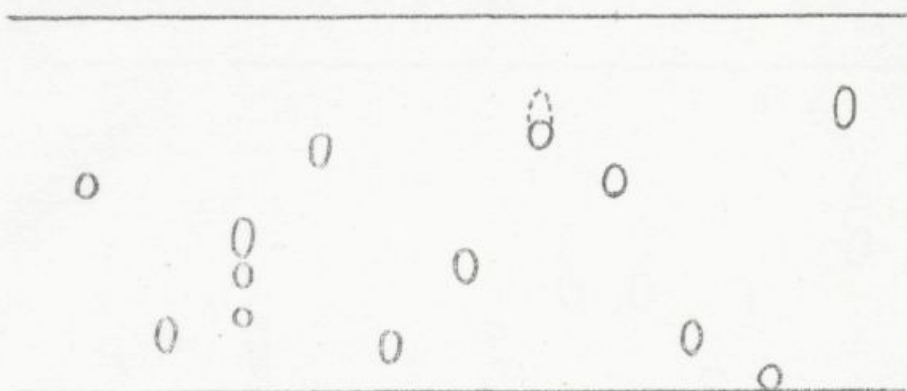
t-butanol:maslena ksl.:voda	50:10:40 (kr. št. 18)
etilacetat:n-propanol:amonijak:voda	50:50:10:30
etilacetat:t-butanol:voda	30:50:40
etilacetat:n-propanol:voda	50:50:40
etilacetat:piridin:voda	50:23:20
Na ₂ SO ₄ :diethylamin:voda	2: 2:100

Kako se med seboj razlikuje lega raznih barvil na papirju in celuloznem prahu se vidi na kromatogramu št. 19. Na kromatogramu št. 20 pa sem dal za primerjavo kromatograma barvil Ponceau 2 R in Ponceau 3 R, ker se iz njiju najbolj lepo vidi večja ostrina lis pri uporabi celuloznega prahu.

Kromatogram št. 18

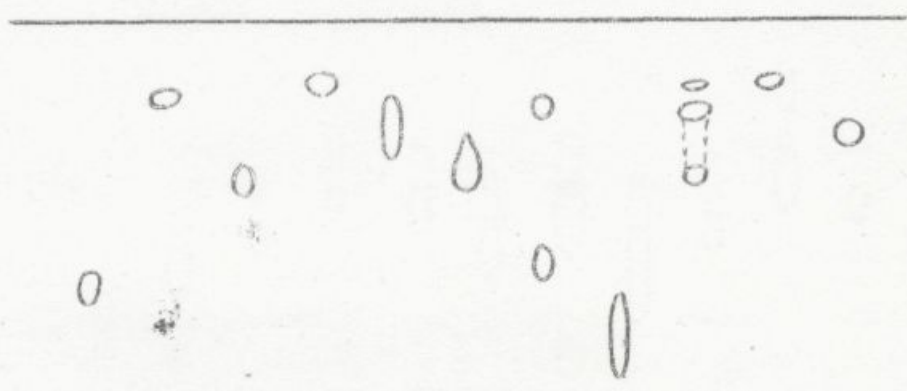
m.f.: t-butanol:maslena kislina:voda
adsorbent: celulozni prah MN 300 F₂₅₄

50:10:40

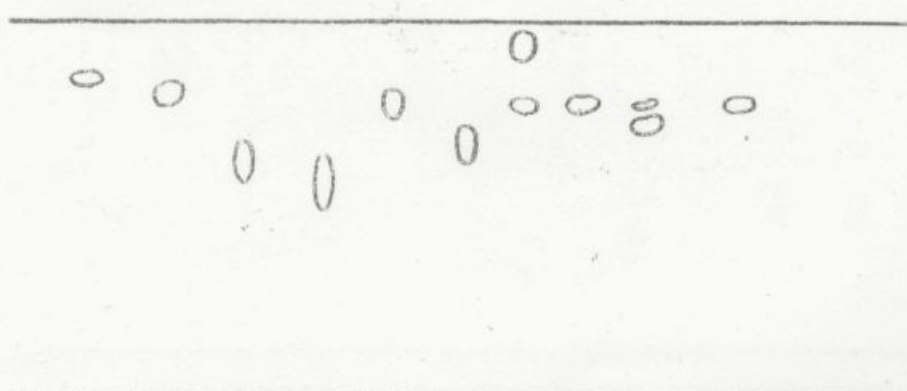


Barvila:

1 2 3 4 5 6 7 9 10 11 18



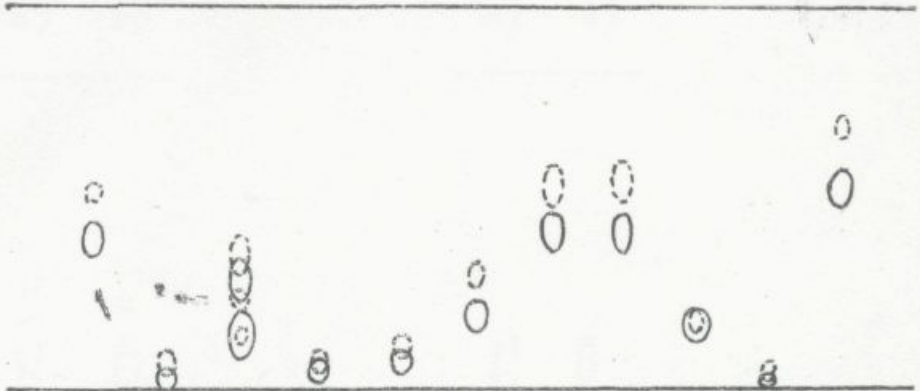
21 22 23 25 26 27 33 34 35 36 42



43 46 47 50 56 60 62 76 153 155

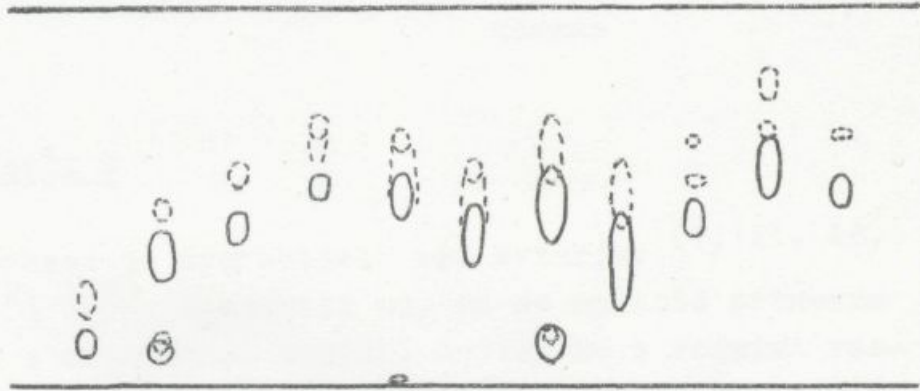
Kromatogram št. 19

m.f.: etilacetat:n-propanol:amonijak:voda 5:5:1:3
adsorbenta: papir Whatman 3 MM znak: O
celulozni prah MN 300 F₂₅₄ O

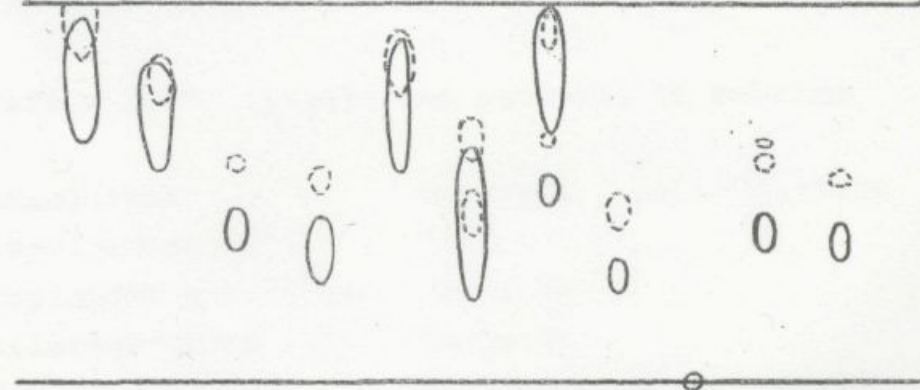


Barvila:

1 2 3 4 5 6 7 9 10 11 18



21 22 23 25 26 27 33 34 35 36 42



43 46 47 50 56 60 62 76 82 153 155

Kromatogram št. 20

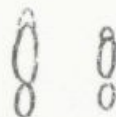
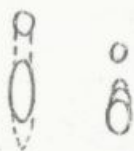
m.f.: Na₂SO₄:dietilamin:voda 2: 2:100

a) na papirju Whatman 2

b) na celuloznem prahu MN 300 F₂₅₄

a) b)

a) b)



Barvili: Ponceau 2 R (št. 27)

Izvor: ICI

Ponceau 3 R (št. 50)

neznan

b) na silikagelu G

Tudi ta adsorbent je uporabljalo več avtorjev (7, 21, 48, 108, 117, 148, 175). Ugotovili so, da so najbolj primerne mobilne faze z organskimi topili, medtem ko z vodnimi raztopinami soli niso dobili dobrih rezultatov. Nekateri priporočajo, naj vsebujejo mobilne faze nekoliko manj vode kot je to primerno za papir.

Za kromatografijo na silikagelu sem uporabil te mobilne faze:

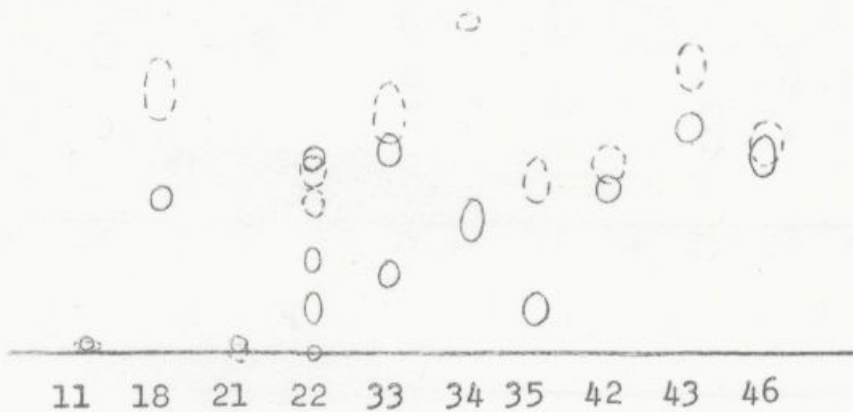
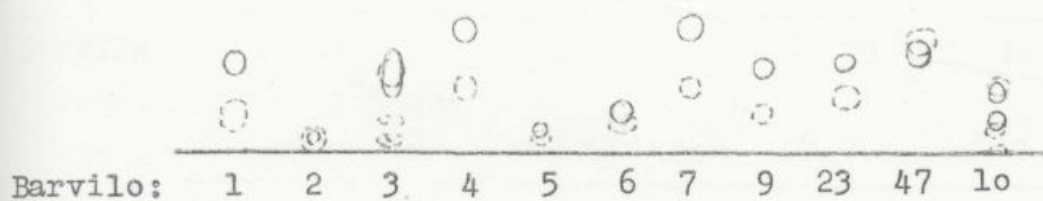
n-butanol:etanol:voda	50:20:20	in	70:30:20
n-butanol:etanol:amonijak	50:10:10		
t-butanol:propionova ksl.:voda	70:10:20		
t-butanol:etilacetat:voda	50:30:40		
metiletilketon:aceton:voda	70:30:30	- se razmeša	
metiletilketon:aceton:voda	14: 6: 3		
etilacetat:metanol:amonijak	5: 2: 1	- potuje neprav.	
etilacetat:piridin:voda	6: 2: 1		

Kromatogram št. 21

m.f.: etilacetat:piridin:voda 50:23:20 - a)
etilacetat:piridin:voda 6: 2: 1 - b)

a) na papirju Whatman 2 znak: —

b) na silikagelu G znak: ---

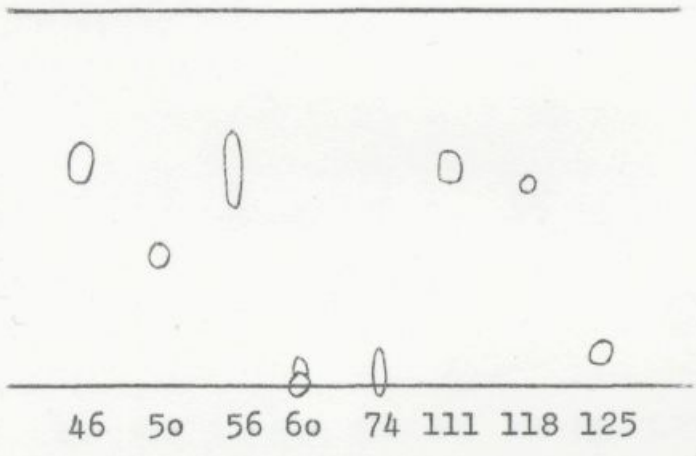
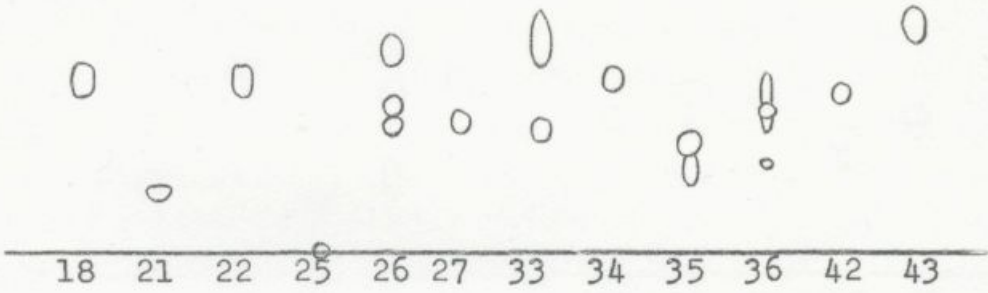
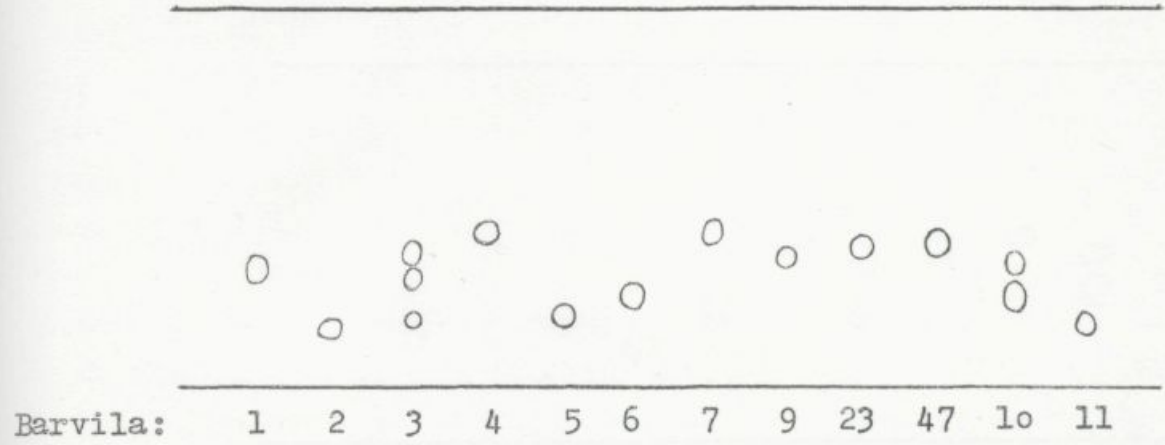


Kromatogram št. 22

m.f.: n-butanol:etanol:voda

5:2:2

adsorbent: silikagel G

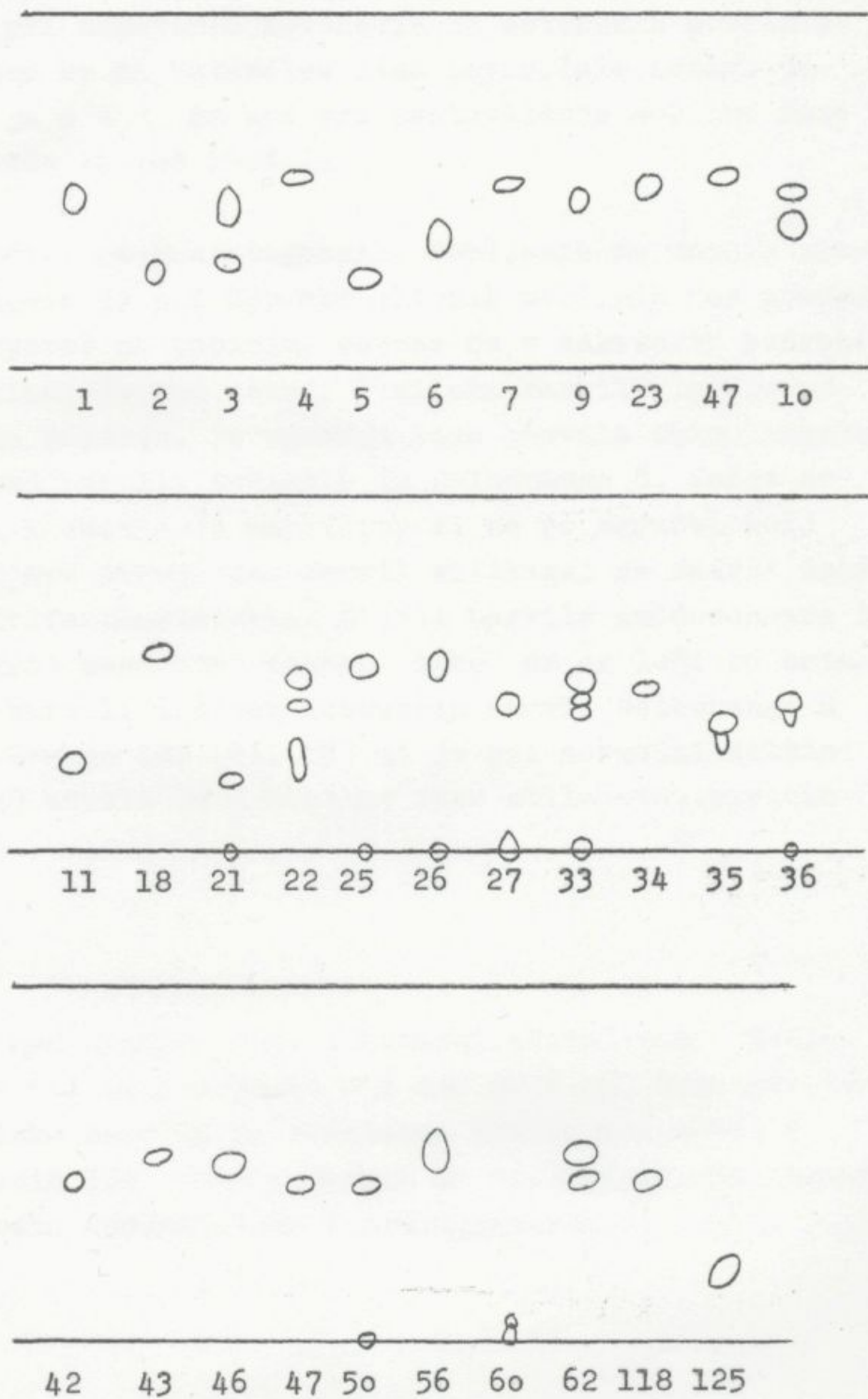


Kromatogram št. 23

m.f.: t-butanol:etilacetat:voda
adsorbent: silikagel G

50:30:40

Barvila:



Ugotovitve:

Mobilne faze primerne za papir so v mnogih primerih uporabne tudi za kromatografijo na silikagelu; le nekatere izmed njih se med procesom razcepijo in dajo tudi po več front ali pa nagnetejo barvila nekje v sredini. Ta pojav sem opazil pri nekaterih ketonskih in esterskih mobilnih fazah, medtem ko mi butanolne niso povzročale težav. Odpravil sem ga s tem, da sem pri sestavljanju mobilne faze vzel manj vode in več redčila.

Razpored barvil na kromatogramih, dobljenih na tankih plasteh silikagela je pri uporabi sličnih mobilnih faz precej podoben razpored na papirju, čeprav se v nekaterih podrobnostih razlikujejo med seboj. Živilska barvila ležijo podobno kot na papirju, le zgornja lisa barvila Chinolingelb se dvigne nad barvili Echtgelb in Gelborange S. Večje so razlike pri kozmetičnih barvilih, ki se po zgradbi bolj razlikujejo med seboj. Azo barvil silikagel ne zadrži tako močno kot trifenilmetanskih. Zlasti barvilo Amidoschwarz 10 B leži dostikrat nenavadno visoko, tako, da se loči od ostalih modrih barvil. Ločitev izomernih barvil Gelborange S (št. 9) in Orange GGN (št. 23) mi je pri normalni dolžini poti (10 cm) uspela le z mobilno fazo etilacetat:piridin:voda 6:2:1.

c) na CaCO_3

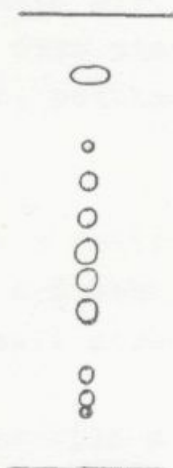
Uporabljal sem mobilno fazo n-butanol:etanol:voda 5:2:2. Njen tek je bil zelo počasen - 4 ure za 6 cm, toda pri tem so se živilska barvila že popolnoma ločila med seboj v obliki drobnih lis. Drugih barvil na tem adsorbentu zaradi počasnega teka topila nisem kromatografiral.

Kromatogram št. 24

m.f.: n-butanol:etanol:voda 5:2:2

adsorbent: CaCO_3

barvila: živilska



IDENTIFIKACIJA BARVIL

S pomočjo R_f -vrednosti in reakcij na lisah barvil

Iz lege lise barvila na kromatogramih sklepamo na to, katero barvilo je prisotno. Domnevo potrdimo z reakcijami, ki so za to barvilo najbolj značilne (glej str. 201).

Najbolj ugoden se mi zdi naslednji postopek. Opisal sem ga tako, kot da je treba določiti, katera kislina v vodi topna barvila so v raztopini, iz katere so odstranjene vse moteče snovi.

Zmes kromatografiramo na papirju s hitro tekočo mobilno fazo (n.pr. sol-baza-voda ali pa keton (ester)-redčilo-voda). Lego lis primerjamo z lisami na kromatogramu čistih barvil, razvitem pod podobnimi pogoji in ugotavljamo, katera barvila so najbolj verjetno prisotna (ista barvna niansa in ista ali skoraj enaka R_f -vrednost) (krom. št. 25 a).

Preiskovano zmes in čista barvila, ki so v tej zmesi najbolj verjetno prisotna, nanesimo na nov kromatogram (papir, ali pa tudi na sloj iz celuloznega prahu, silikagela G); Kromatografiramo z mobilno fazo drugačne sestave (če smo prej vzeli alkalno vodno raztopino soli, vzamemo sedaj raje nevtralno ali kislo organsko m.f.), po možnosti tako, ki dobro loči ista barvila z isto nianso, ki imajo v prvotno uporabljenem sistemu zelo podobne Rf-vrednosti (krom. št. 25 b).

Ta postopek ponovimo še s tretjo mobilno fazo, ki jo izberemo tako, da ločimo med seboj še tista barvila, ki se na prejšnjih kromatogramih mogoče prekrivajo.

Zabeležimo si, katera barvila so z ozirom na te kromatogramе v zmesi najbolj verjetno prisotna.

Videz lis barvil, za katera sklepamo, da so identična, primerjamo še v UV svetlobi, nato pa izvršimo na kromatogramih reakcije, ki so najbolj značilne za posamezna čista barvila (str. št. 201).

Če imata dve barvili isto Rf-vrednost na vseh kromatogramih, enak videz v vidni in UV svetlobi ter dajeta enake reakcije, smatramo, da sta identični.

Ta postopek je najbolj hiter in zelo primeren za tekoče analize.

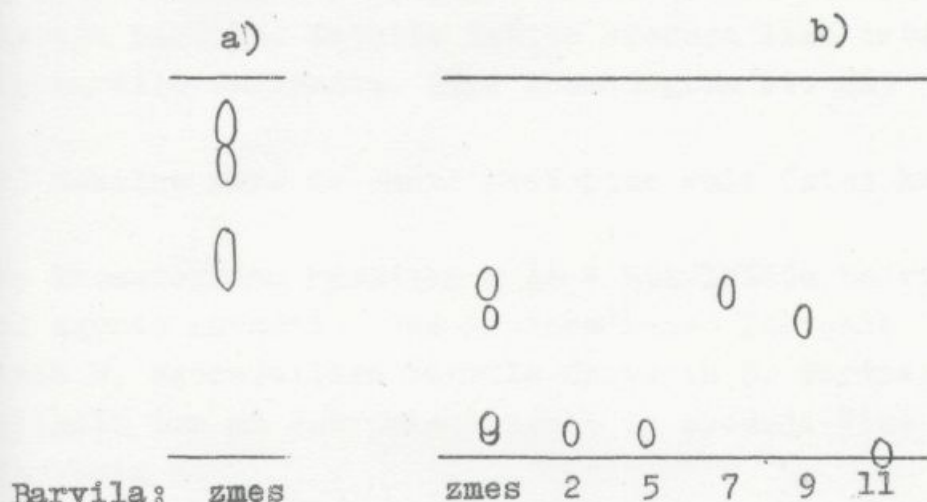
Kromatogram št. 25

m.f.: a) terc. Na-citrat:amonijak:voda 2:20:80

b) etilacetat:n-propanol:voda 25:25:20

papir: a) Whatman 3 MM

b) Whatman 2



Za lažjo izbiro mobilnih faz navajam medsebojno lego barvil na kromatogramih, razvitih z različnimi mobilnimi fazami, pa tudi najbolj problematične primere v posameznih skupinah barvil.

Rumena barvila

- 1) Echtgelb, 2) Tartrazin, 3) Chinolingelb, 22) Chrysoin S, 42) Naphtholgelb S, 43) Methanilgelb

a) Mobilne faze so organska topila (primerjaj tudi kromatograme št. 1, 12, 13, 18, 19, 21, 22, 23).

Na kromatogramih, razvitih s kislimi, nevtralnimi ali alkalnimi mobilnimi fazami leži najvišje barvilo Methanilgelb - v zgornji tretjini kromatograma. V kisljih in večini nevtralnih mobilnih faz je skoraj tik pod njim Chrysoin S. V alkalnih mobilnih fazah pa leži to barvilo precej nižje, tako da je pod barvilom Naphtholgelb S, včasih (v močno alkalnem) pa celo pod barvilom Echtgelb. Barvilo Naphtholgelb S je v kisljih in nevtralnih mobil-

nih fazah med barviloma Chrysoin S in Echtgelb, v alkalnih pa više nad barvilom Chrysoin S.

Od rumenih barvil za barvanje živil leži na večimi kromatogramov najviše Echtgelb, tik pod njim zgornja lisa barvila Chinolingelb, pod njima je pri nekaterih mobilnih fazah (n.pr. t-butanol:propionova ksl.:voda in pod.) srednja lisa istega barvila. Najnižje ležita spodnja lisa istega barvila in barvilo Tartrazin. Glej kromatogram št. 26!

b) Mobilne faze so vodne raztopine soli (glej kr. št. 15,17).

Na kromatogramu razvitem z 10 % HCl ležijo barvila gledano od zgoraj navzdol v tem vrstnem redu: Echtgelb in Naphtholgelb S, zgornja lisa barvila Chrysoin S, Tartrazin in Methanilgelb ter na dnu Chinolingelb in spodnja lisa barvila Chrysoin S.

Na kromatogramih razvitih z zmesjo sol:baza:voda (kot n.pr. Na_2SO_4 :amonijak:voda 2:20:80 - glej kr. št. 27) leži najviše Tartrazin, pod njim Echtgelb, tik pod njim Chrysoin S in Naphtholgelb S ter zgornja lisa barvila Chinolingelb, pod njimi srednja lisa istega barvila in na dnu barvilo Methanilgelb in spodnja lisa barvila Chinolingelb.

Dobro se torej ločijo med seboj živilska barvila, medtem ko se kozmetična ne.

Povzetek:

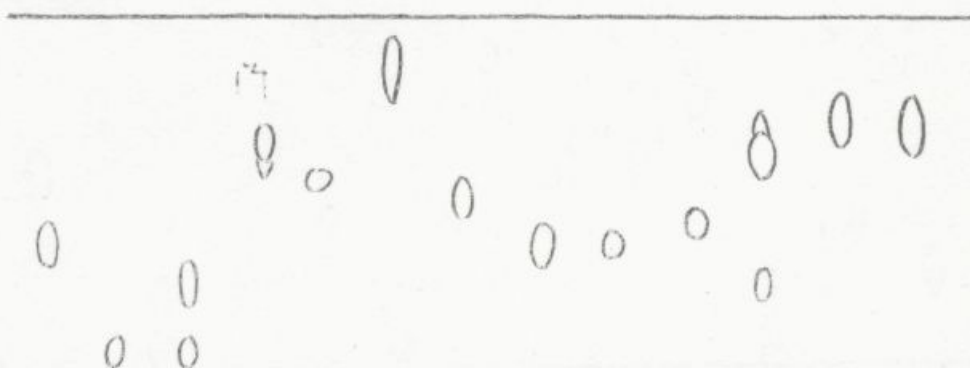
Za ločitev rumenih barvil so najboljše naslednje mobilne faze:

- 1) sol - amonijak - voda 2:20:80 za medsebojno ločitev živilskih barvil
- 2) metiletilketon:ledocet:voda 50:5:20
metiletilketon:aceton:valerianova ksl.:voda 50:20: 5:28
t-butanol:propionova (maslena) ksl.:voda:KCl 50:12:38:0,4

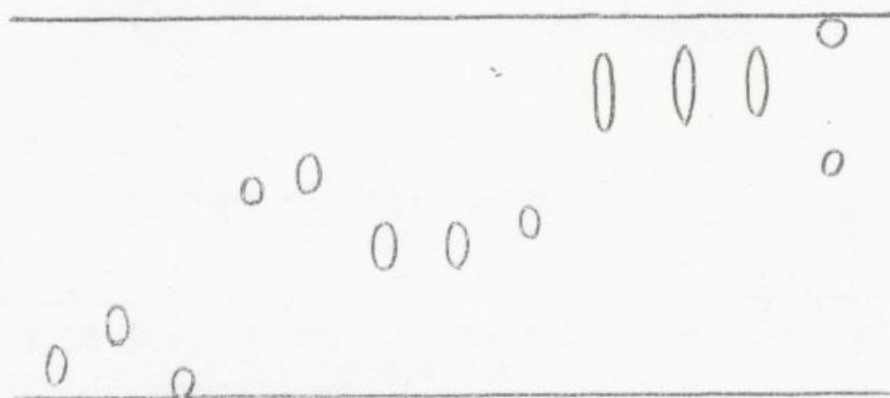
Kromatogram št. 26

m.f.: metiletilketon:ledocet:voda 50:5:20

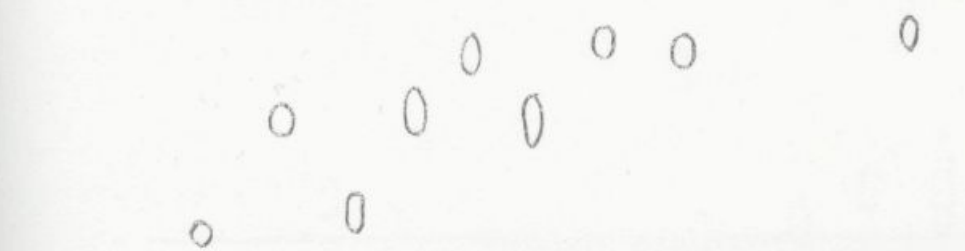
papir: Whatman 2



Barvila: 1 2 3 22 42 43 7 9 23 47 33 111 46
 rumena oranžna



Barvila: 5 6 125 4 18 27 50 118 25 26 56 62
 rdeča

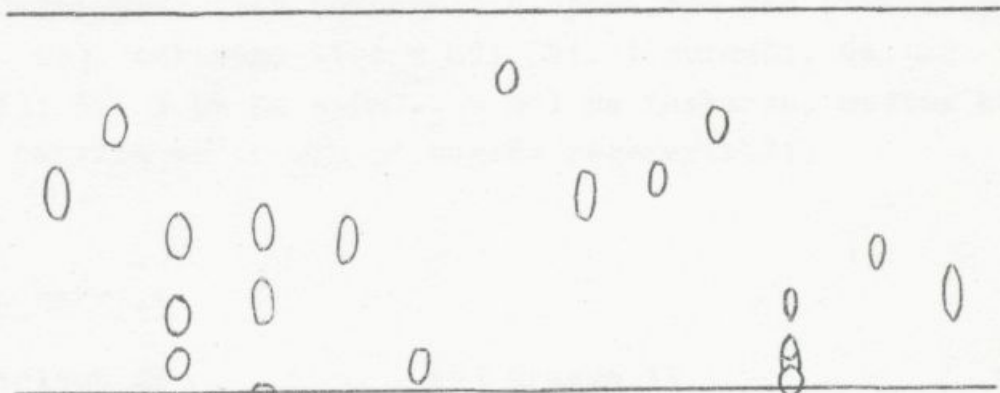


Barvila: 21 35 10 34 60 153 155 76 82 11 36
 zeleni modra vijol.

Kromatogram št. 27

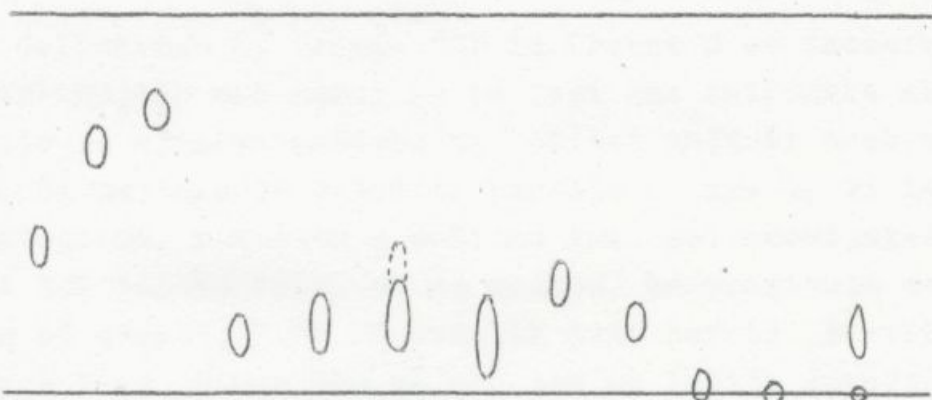
m.f.: Na_2SO_4 :amonijak:voda 2:20:80

papir: Whatman 2



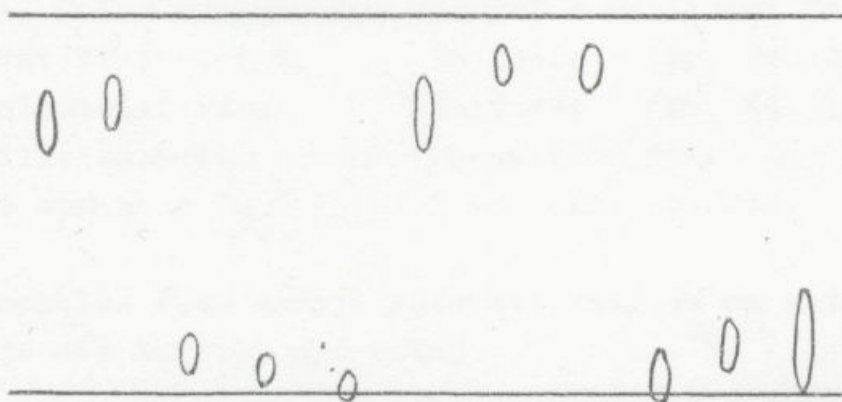
Barvila: 1 2 3 22 42 43 7 9 23 47 33 111 46

 r u m e n a o r a n ž n a



Barvila: 5 6 125 4 18 27 50 118 25 26 56 62

 r d e č a



Barvila: 21 35 10 34 60 153 155 76 82 11 36

 zeleni m o d r a vijol.

Kakor tudi naslednje:

n-butanol:etanol:ledocet:voda 10: 2: 1: 4

etilacetat:n-propanol:amonijak:voda 5: 5: 1: 3

metiletilketon:n-propanol:voda 5: 1: 2

Za dokončno potrditev domneve jih opazujemo pod UV-svetlobo (št. 2!), nakisano liso s HCl (št. 1 pordeči, št. 42 pobledi); št. 3 pa se s SnCl_2 v HCl ne razbarva, medtem ko ostala barvila se in jih ni mogoče regenerirati.

Oranžna barvila

7) Scharlach GN

46) Orange II

9) Gelborange S

47) Orange G

23) Orange GGN

111) Brilliantorange GN

33) Resorcine Brown

Barvila Gelborange S, Orange GGN in Orange G so izomere, ki se razlikujejo med seboj le po legi ene sulfonske skupine, zato je njihova medsebojna ločitev najtrši oreh v tej skupini. Še najlaže je določiti barvilo Orange G, ki leži na kromatogramu, razvitem z mobilno fazo sol:amonijak:voda ali 10 % HCl toliko višje, da se medtem, ko prepotuje topilo 15 cm od starta, loči od ostalih dveh barvil. Barvili Gelborange S in Orange GGN se pri tem ne ločita dovolj (kr. št. 15). Prav tako se ne ločita s kislimi in alkalnimi butanolnimi mobilnimi fazami, z močno kislimi butanonskimi in ostalimi. Delno ločitev sem dosegel z mobilnimi fazami:

etilacetat:piridin:voda 50:23:20 (kr. št. 21)

i-butanol:etanol:voda 50:20:20 (kr. št. 13)

metiletilketon:aceton:valerijanska ksl.:voda 50:20: 5:20

in komaj opazno z 10 % in 25 % HCl (kr. št. 28).

Vse te mobilne faze morajo potovati vsaj 20 cm nad start, da ločijo obe barvili med seboj.

Kromatogram št. 28

Papir: Whatman 3 MM

m.f.

10 % HCl

25 % HCl

0 0

0 0

Barvila:

9 23

9 23

Najboljšo ločbo sem dobil z mobilno fazo:

etilacetat:piridin:voda 6:2:1 na silikagelu G. Tu je zadostovala za ločbo 10 cm dolga pot topila (kr. št. 21).

Ostala oranžna barvila se najbolje ločijo od teh treh, pa tudi med seboj, zlasti pri kromatografiji na papirju z mobilno fazo: sel:amonijak:voda 2:20:80. Najbolje je vzeti Na_2SO_4 (kr. št. 27), uporabni so pa tudi Na-citrat, ftalat, etilendiamintetraacetat.

Mobilne faze iz organskih topil jih ne ločijo tako dobro, vendar so v posameznih primerih tudi uporabne, zlasti že zgoraj navedene, pa tudi naslednje:

i-butanol:etanol:ledocet:voda	50:15: 5:20
etilmetilketon:ledocet:voda	50: 5:20
i-butanol:dimetilformamid:voda	50: 8:20
i-butanol:aceton:voda	40:14:20

Lega barvil na kromatogramih:

Na kromatogramih, razvitih z zmesjo sol:amonijak:voda leži vedno najviše - v bližini fronte - lisa Scharlach GN, pod njo Orange G sledita Gelborange S in Orange GGN, ki ležita obe v isti višini, Orange II in tik nad startom glavna lisa barvila Resorcine Brown.

Če uporabimo Na_2SO_4 ali Na_3 -citrát, se bolje ločijo nižje ležeča barvila, če uporabimo K-ftalat ali etilendiamintetacetat, pa više ležeča barvila.

Če uporabimo za mobilno fazo zmesi organskih topil, leži najviše Orange II, ne glede na to, ali je zmes kislá, nevtralna ali alkalna. Orange II in Resorcine Brown se dobro ločita z alkalnimi mobilnimi fazami, barvila Resorcine Brown, Scharlach GN in Orange G pa najbolje z mobilno fazo metiletilketon:ledocet:voda 50:5:2 .

Na silikagelu G, mobilna faza etilacetat:piridin:voda 6:2:1 (kr. št. 21) si sledijo v tem zaporedju: Resorcine Brown, Orange II, Orange G, Scharlach GN in Orange GGN, Gelborange S.

Rdeča barvila

4 - Azorubin	18 - Brilliantcrocein MOO	62 - Violamine R
5 - Amaranth	27 - Ponceau 2R	118 - Echtrot E
6 - Cochenillerot A	50 - Ponceau 3R	125 - Ponceau 6R

Barvila za barvanje živil (št. 4, 5, 6), pa tudi 18, 118, 125 se najlepše ločijo med seboj na papirju z mobilnimi fazami sol:amonijak:voda 2:20:80 (glej kr. št. 25 in 27). Barvil št. 4 in 18 te mobilne faze ne ločijo, za ločitev ostalih barvil pa je skoraj vseeno, katero sol vzamemo. Le malo slabša je ločitev z organskimi topili. Po razvitju s kislimi in nevtralnimi mobilnimi fazami n.pr.:

metiletilketon:ledocet:voda	50: 5:20	(kr. št. 26)
metiletilketon:aceton:valerianova ksl.:voda	50:20: 5:20	(kr. št. 29)
n-butanol:ledocet:voda	50:13:30	(kr. št. 30)
t-butanol:propionova ksl.:voda	50:10:40	in podobnimi
etilacetat:piridin:voda	50:23:20	
butanoli:redčila:voda	50: x:20	

ležijo ta barvila od spodaj navzgor v tem vrstnem redu: Ponceau 6R, Amaranth, Cochenillerot A, Ehtrot E, Azorubin S, Brilliantcrocein M00. Prva tri barvila nobena od teh mobilnih faz ne loči tako dobro kot amonijakalne raztopine soli; še najboljše ločitev sem dobil z mobilnima fazama: n-butanol:ledocet:voda 50:13:30

etilacetat:piridin:voda 50:23:20

Drugo trojico pa je najbolje ločila mobilna faza:

metiletilketon:aceton:valerianova ksl.:voda 50:20: 5:20
(kr. št. 29)

Po razvitju z amonijakalnimi mobilnimi fazami pa je vrstni red drugačen, pri čemer so barvila Cochenillerot A, Ehtrot E in Brilliantcrocein M00 popolnoma ločena med seboj od ostalih. Ostala tri barvila se le slabo ločijo. Violamine R se loči od ostalih rdečih barvil po tem, da leži v očetno kislih in amonijakalnih ketonskih mobilnih fazah na fronti ali tik pod njo, popolnoma ločeno od ostalih barvil. S solno - amonijakalnimi mobilnimi fazami ga je težko ločiti od ostalih rdečih barvil, pač pa ga zelo dobro ločimo od barvila Litholrot R, od katerega ga z organsko mobilno fazo ni mogoče ločiti.

Poseben problem predstavljata barvili Ponceau 2R in Ponceau 3R, ki bi se morali razlikovati med seboj samo za eno metilno skupino.

Vzorca barvil, ki sem ju imel na razpolago, sta se pri kromatografiji z organskimi topili na papirju obnašala identično. Če sem ju kromatografiral z zmesmi sol:baza: voda sta se razdelili v več difuznih lis, ki so prehajale ena v drugo. Razlika intenzivnosti posameznih lis je od-

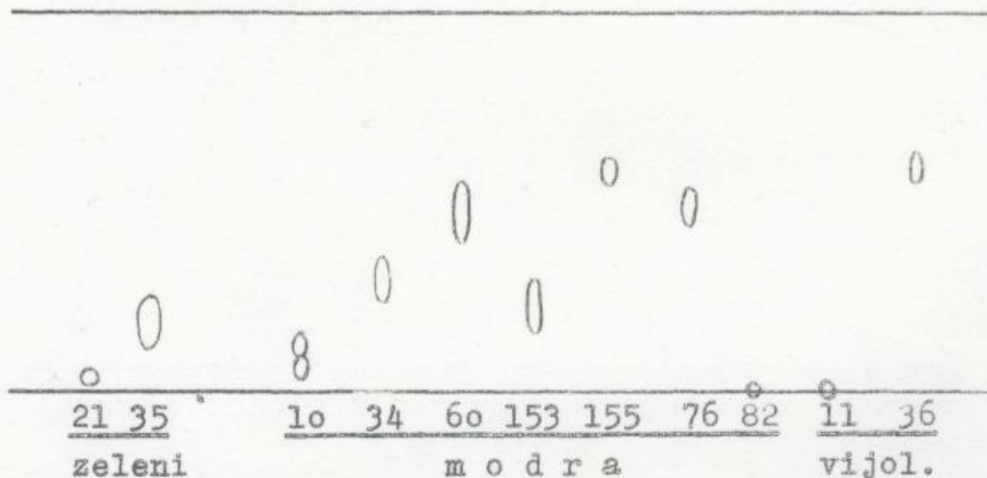
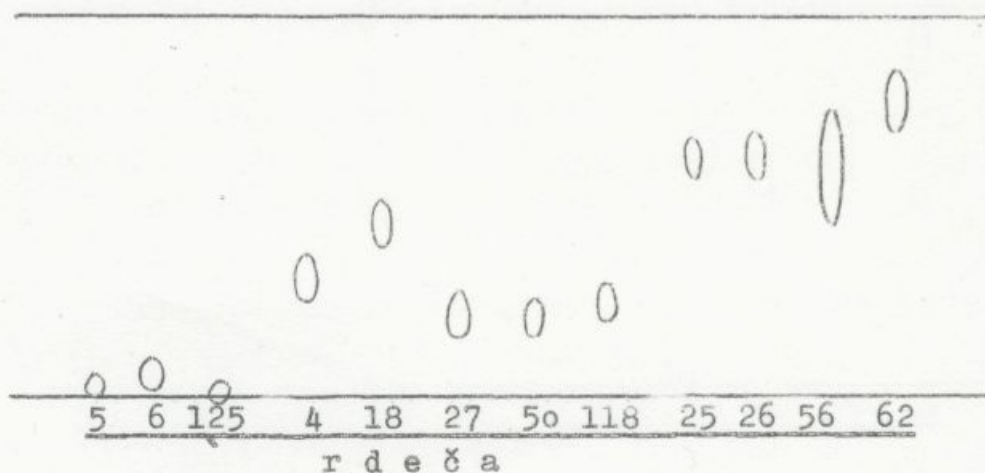
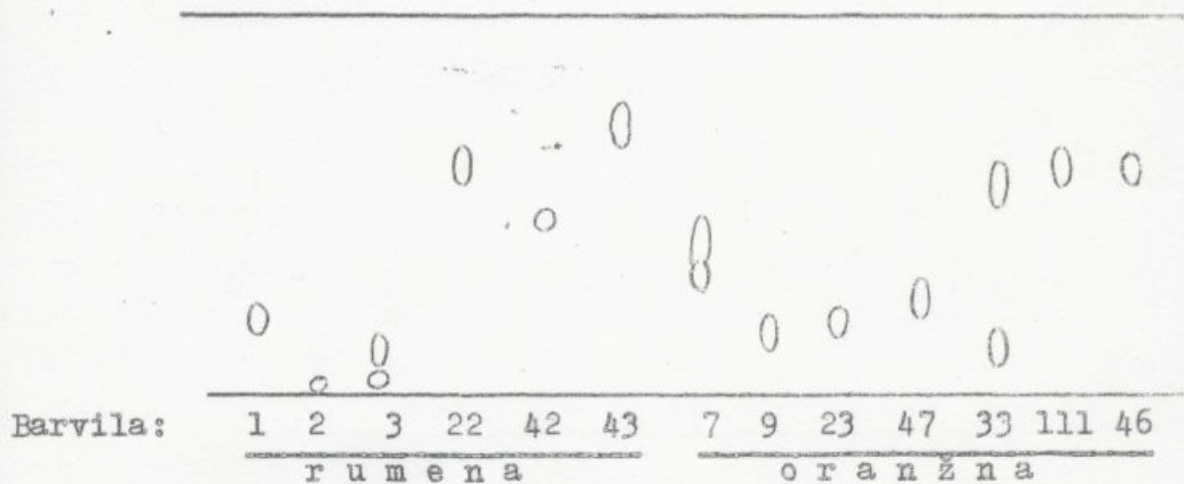
visna od mobilne faze, kar kaže na heterogeno sestavo barvil. Spremljajoča barvila, ki so prisotna v vzorcu barvila Ponceau 2R, ležijo na teh kromatogramih večinoma više kot najbolj intenzivna lisa, medtem ko pri Ponceau 3R ležijo niže. Rf-vrednosti najbolj intenzivnega predela glavne lise posameznih barvil se skoraj ne razlikujeta med seboj. Z ozirom na to, da pri uporabi teh mobilnih faz ležijo lise sorodnih skoraj identičnih, malenkostno bolj hidrofilnih barvil nekoliko više, bolj hidrofobnih pa niže, sklapam, da je povprečno število metilnih skupin v tem vzorcu barvila Ponceau 3R nekoliko višje, kot v vzorcu barvila Ponceau 2R. Z mobilno fazo Na_2SO_4 :dietilamin:voda 2:2:100, ki je dala na papirju najboljši kromatogram, sem kromatografiral ti dve barvili tudi na plošči premazani s celuloznim prahom MN 300 F (tok topila: 15 cm - kr. št. 20). Barvilo Edicol Supra Ponceau MX (=Ponceau 2R) je dalo štiri lise, od katerih so se glavna in dve spremljajoči skoraj popolnoma prekrivale, četrta je ležala nekoliko više, popolnoma ločena od ostalih.

Barvilo Ponceau 3R je dalo tri lise: glavna in ena spremljajoča sta se skoraj popolnoma prekrivali in sta ležali točno v isti višini kot spodnji dve lisi barvila Ponceau 2R. Precej močna spremljajoča lisa pa je ležala pod njima.

Pri kromatografiji na silikagelu nisem dobil take ločitve. Iz specifikacij ⁽⁵⁸⁾in podatkov o toksikoloških preiskavah ⁽¹¹¹⁾ obeh barvil je razvidno, da vsebujeta vzorca barvila, sintetizirana iz več različno metiliranih aromatskih aminov - marsikaterega izmed njih vsebujeta obe barvili, zato je slično njuno obnašanje pri kromatografiji. Po drugi strani so toksikološke raziskave pokazale, da sta obe barvili kancerogeni. To pomeni, da tudi barvilo Ponceau 2R (št. 27) ne bi smelo biti v skupini B, temveč bi smeli biti obe barvili le v skupini C - tedaj bi bilo tako iz toksikološkega kot tudi s pravnega stališča gledano vseeno, katero izmed teh dveh barvil je prisotno v izdelku.

Kromatogram št. 29

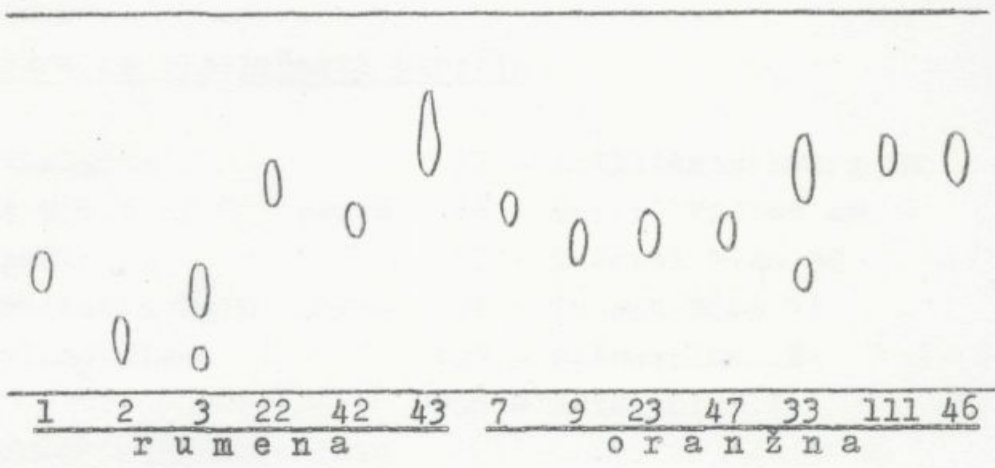
m.f.: metiletilketon:aceton:valerianova ksl.:voda 50:20:5:20
 papir: Whatman 2



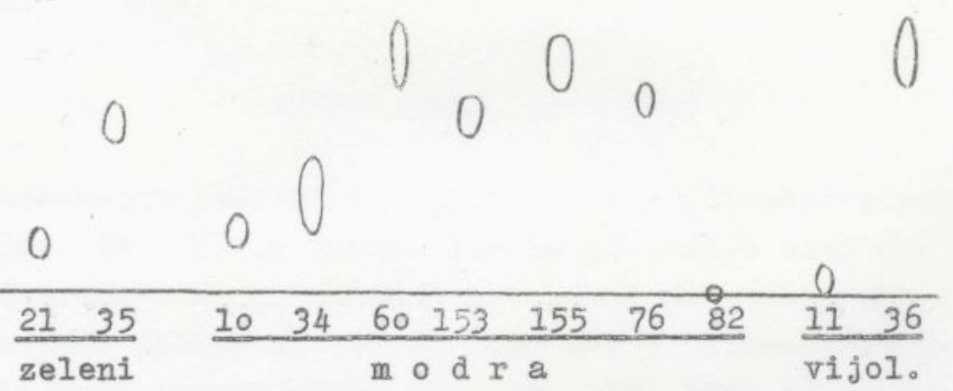
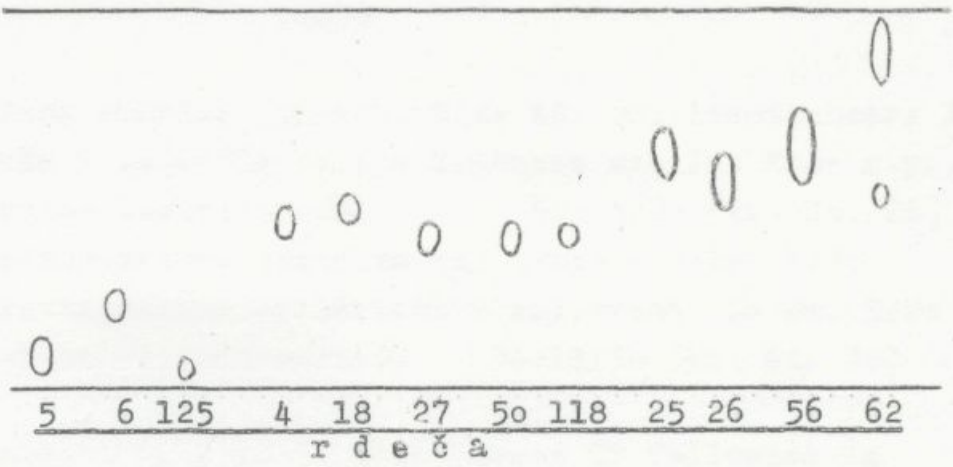
Kromatogram št. 30

m.f.: n-butanol:ledocet:voda 50:13:30

papir: Whatman 2



Barvila:



Od ostalih rdečih barvil je ti dve mogoče ločiti na papirju z organskimi mobilnimi fazami:

metiletilketon:metanol:amonijak:voda	50:5:5:15
acetilacetone :acetone :ledocet :voda	40:50:2:20
etilacetat :piridin:voda	50:23:20

Zelena, modra in vijoličasta barvila

21 - Naphtholgrün B	11 - Brilliantschwarz BN
35 - Light Green CF Yellowish	36 - Benzyl Violet 4B
10 - Indigotin IA	82 - Durazol Blue 8G
34 - Amidoschwarz 10 B	76 - Patent Blue VF
60 - Methylene Blue	153 - Patentblau AE
	155 - Patentblau V

Organske mobilne faze:

kisle

Spodaj ležeča skupina (Durazol Blue 8G, Brilliantschwarz BN, Naphtholgrün B) najbolje ločijo ketonske mobilne faze n.pr.:

metiletilketon:ledocet:voda	50: 5:20 (kr. št. 26)
metiletilketon:acetone :oksalka ksl.:voda	50:20: 1:20
metiletilketon:acetone :valerianova ksl.:voda	50:20: 5:20
pa tudi n-butanol:ledocet:voda	50:13:30 (kr. št. 30)

Barvila Amidoschwarz 10 B, Light Green CF Yellowish in Benzyl Violet 4 B najbolje loči med seboj mobilna faza t-butanol:propionova ksl.:voda 5 : 1: 4, ne loči pa jih od vseh ostalih.

nevtralne

Njihova medsebojna ločitev z mobilno fazo etilacetat:piridin:voda (kr. št. 21) je slaba, ker se ne ločijo niti dovoljena od prepovedanih, pa tudi dovoljena med seboj ne. Če pa poskušamo ločiti med seboj samo modra trifenilmetanska barvila tipa patent modro (št. 76, 153, 155) pa da ta

mobilna faza kar zadovoljive rezultate, zlasti če je stara nekaj dni.

alkalne

Pri kromatografiji z alkalnimi mobilnimi fazami Indigotin IA precej hitro razpada, zato ga je treba vedno posebej določati z nevtralnimi ali kislimi mobilnimi fazami.

Amonijakalne butanonske mobilne faze zelo dobro ločijo med seboj spodaj ležeča barvila pa tudi druga.

Mobilna faza: terc.Na-citrat:amonijak:voda 2:20:80 razdeli ta barvila v tri skupine: ob startu so Indigotin IA, Brillantschwarz BN, Amidoschwarz loB, Methylene Blue, Durazol Blue 8G, nekje v sredini Benzyl Violet 4B, ob fronti pa modra in zelena sulfonirana trifenilmetanska barvila ter barvilo Naphtholgrün B.

Nevtralne raztopine soli (n.pr. 10 % Na_2SO_4 in Na_3 -citrat) slednjim barvilom sicer nekoliko zmanjšajo R_f -vrednosti, toda ločitev je v tem slučaju še slabša.

V primeru, ko bi bilo treba analizirati zmes več modrih barvil, je torej najbolje, da jih najprej ločimo z mobilno fazo 2 % sol v 5 % amonijaku v posamezne skupine, eluiramo, ločimo od soli in ponovno kromatografiramo vsako skupino posebej s primerno mobilno fazo.

Tudi pri analitiki barvil te skupine sem naletel na nekaj problemov:

1) Brillantschwarz BN (št. 11)

Iz vzorca cockte sem izoliral barvila z volno in jih kromatografiral z mobilno fazo n-butanol:n-propanol:oksalna ksl.:voda 40:60:1:40. Namesto ene lise tega barvila sem dobil dve, ki sta se med seboj razlikovali po barvi. Primerjalno barvilo je imelo drugačno R_f -vrednost, pa tudi drugačno barvo. Enak rezultat sem dobil z mobilno fazo terc.Na-citrat:amonijak:voda 2:20:80. (glej kr. št. 31)

Kromatogram št. 31

m.f.: a) n-butanol:n-propanol:oksalna ksl.:voda 40:60:1:40

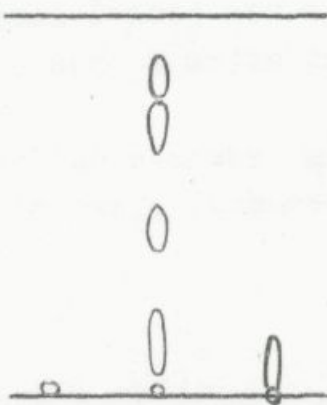
b) 2 % Na_3 -citrata v 5 % amonijaku

papir: Whatman 2

a)



b)



Barvila: 11 cockta 145

11 cockta 145

11 - Brilliantschwarz BN

145 - Schwarz 5410

Ker je bilo še pred nekaj leti dovoljeno uporabljati barvilo Schwarz 5410 sem za primerjavo kromatografiral tudi tega vendar ni bilo identično s temnimi barvili iz cockte.

Da bi izključil vpliv izolacije na ločitev, sem izoliral barvilo iz cockte še tako, da sem segreval volnene nitke v nakisani cockti le po 1 minuto, ločeno izoliral barvila iz njih ter vsak eluat posebej kromatografiral. Barvila sem izoliral s pomočjo kompleksov z Asepsolom. Na oba načina sem izoliral iz vodne raztopine tudi zmes barvil Indigotin IA, Brilliantschwarz BN, Schwarz 5410 in vse ekstrakte kromatografiral na istem listu papirja. Temno barvilo iz cockte ni bilo identično z nobenim od teh barvil - cockto bi bilo treba z ozirom na določila čl. 10 Temeljnega zakona o zdravstvenem nadzorstvu nad živili smatrati za zdravju škodljivo in izločiti iz prometa.

Ker pa izvora svojega vzorca barvila Brilliantsschwarz BN nisem poznal in sem zaradi tega hotel preveriti njegovo identiteto, sem ga primerjal tudi z drugim vzorcem tega barvila. Toda ta vzorec z mojim ni bil identičen, bil pa je precej podoben barvilu iz cockte. Zato tedaj cockti nisem mogel oporekati.

Ko pa sem dobil avtentičen vzorec barvila Brilliantsschwarz BN od firme Durand & Huguenin (Basel Švica) sem ugotovil, da je bil ta novi vzorec identičen samo z mojim prejšnjim vzorcem barvila.

Ta vzorec cockte torej ni bil pravilno obarvan, medtem ko so bili kasnejši vzorci glede na barvanje neoporečni.

2) Indigotin IA in Lichtgrün

Zaradi sporov o tem, da prodajajo v naši državi zmesi barvil, v katerih je tudi Patentblau, sem s pomočjo tenkoplastne kromatografije primerjal med seboj več vzorcev barvila Indigotin raznih proizvajalcev in pa razna barvila skupine Patentblau. Kromatografiral sem na celuloznem prahu MN 300 z mobilnimi fazami:

t-butanol:maslena kislina:voda	5:1:4
t-butanol:etilacetat:voda	5:3:4
etilacetat:n-propanol:voda	5:5:4
etilacetat:piridin:voda	50:23:20

ter na silikagelu G (Kemika) z naslednjimi mobilnimi fazami:

n-butanol:etanol:voda	5 : 2 : 2
t-butanol:etilacetat:voda	5 : 3 : 4
etilacetat:piridin:voda	6 : 2 : 1
metiletilketon:aceton:voda	14 : 6 : 3

Barvila: Indigotin I (D & H, CIBA, BASF, Kem., in drugi vzorci neznanega izvora)

Indigotetrasulfonat (Kem)

Brilliantsschwarz BN (D & H)

Patentblau AE, Erioglaucine A, Ocean Blue (neznan izvor)

Patentblau V (D & H)

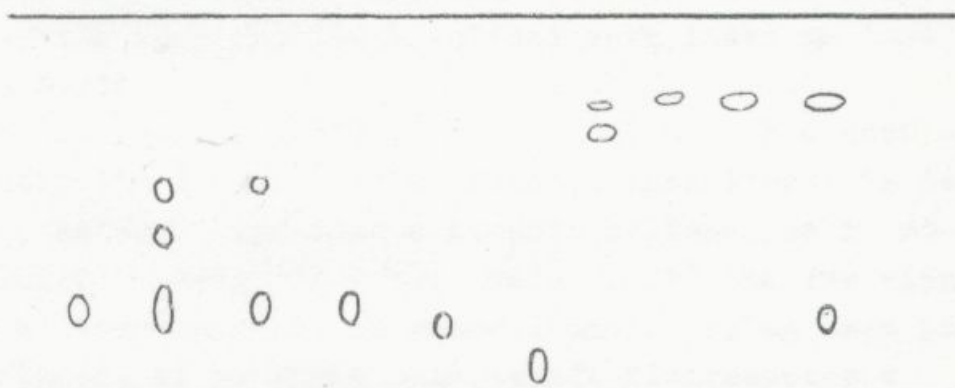
Lichtgrün (neznan izvor)

Edicol Supra Pea Green H (ICI, po njihovih podatkih je to zmes barvil Tartrazin in Patent Blue VF)

Kromatogram št. 32

m.f.: t-butanol:maslena kisl.:voda 5:1:4

adsorbent: celulozni prah MN 300



Barvila: D&H CIBA BASF KEM tetra II AE V VF Pea Gr.H

Indigotin

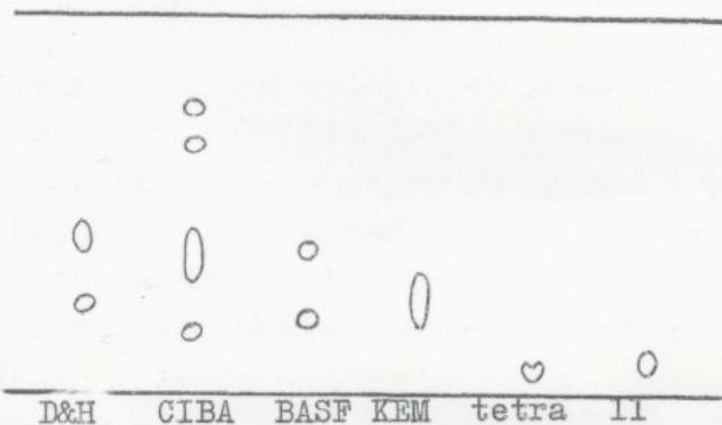
Patentblau

Primerjaj zgornji seznam barvil!

Kromatogram št. 33

m.f.: etilacetat:piridin:voda 50:23:20

adsorbent: celulozni prah MN 300



D&H

CIBA

BASF KEM

tetra

II

Ugotovitve:

Barvila Indigotin I dajo na kromatogramih po več lis.

Na splošno velja, da imajo pri kromatografiji pod temi pogoji višje Rf-vrednosti barvila, ki imajo manj sulfonskih skupin. To se vidi tudi, če primerjamo K-indigodisulfonat in K-indigotetrasulfonat (Kem).

Iz lege lis na raznih kromatogramih se vidi, da so komercialna barvila zmes različnih sulfoniranih lahko pa tudi izomernih barvil.

Videti je, da vsebuje Indigotin I (D & H) di- in monosulfonat, Indigotin I (CIBA) trisulfonat, monosulfonat in še nekaj lis, katerih lego samo s stopnjo sulfonacije ni mogoče razložiti. Indigotin I bes. rein (BASF) ima dve vidni lisi, ki bi ustrezali di- in monosulfonatu, poleg tega pa še več primesi, ki so vidne samo zaradi fluorescence v UV svetlobi.

Vzorca barvil (CIBA in BASF) sta že precej stara in je malo verjetno, da je barvilo iste šarže še v prometu.

Drugi vzorci barvila Indigotin IA - čistega ali pomešanega z drugimi barvili - dajejo lise, ki bi ustrezale mono- in disulfonatu, le pri nekaterih pa tudi trisulfonatu.

Tako visoko ležečih lis, kot jih dobimo pri kromatografiji barvila Indigotin I(CIBA), nisem opazil pri nobenem barvilu.

Barvila iz skupine Patentblau ležijo na kromatogramih razvitih na celulozi više kot indigosulfonati, toda le malo više kot najvišje lise barvila Indigotin I (CIBA). Od njih se razlikujejo po barvi, ker so bolj zelenkasta. Zlasti jih je lahko razlikovati od indigosulfonатов po nakisanju s HCl, ker postanejo rumena, medtem ko ostanejo indigosulfonati modri.

Na silikagelu G razlike v Rf-vrednosti med obema skupinama barvil niso dovolj velike, pač pa se zelo razlikujeta niansa

in oblika lis. Zlasti pri kromatografiji s ketonsko mobilno fazo so lise indigosulfonatov sivomodre, značilne oglate oblike, medtem ko so lise barvil iz skupine Patentblau ovalne, živo modre, nekatere tudi zelenkaste.

Sklep:

Preiskanim vzorcem barvila Indigotin IA niso bila primešana barvila iz skupine Patentblau.

Že na oko se vidi, da večina vzorcev ne ustreza specifikaciji FAO (56), ki dopušča prisotnost največ 1 % drugih barvil, primešanih Na₂-indigo-5,5'-disulfonatu.

Barvilo Lichtgrün je identično samo z modrim barvilom iz zmesi Edicol Supra Pea Green H - je torej v resnici Patent Blue VF. Identičnost so potrdili tudi papirni kromatogrami, elektroferogrami in absorpcijska spektra.

POVZETEK:

Ugotovil sem najugodnejša razmerja raznih topil v mobilnih fazah za papirno kromatografijo sulfoniranih v vodi topnih barvil (str. 123).

Preiskusil sem mobilne faze, ki so zelo ugodne za tenkoplastno kromatografijo na celuloznem prahu (str. 125) in silikagelu G (str. 128).

Opisal sem postopek za identifikacijo teh barvil s pomočjo Rf-vrednosti in reakcij na kromatogramih (str. 133), medsebojno lego barvil na kromatogramih, razvitih z različnimi mobilnimi fazami, pa tudi štiri primere iz analitske prakse.

2) Kisla ksantenska barvila
=====

- | | |
|---------------------------|----------------------|
| 8) Erythrosin extra | 45) Fluorescein |
| 29) Dichlorofluorescein | 48) Eosin 5 GI |
| 30) Eosin A | 72) Rose bengale DCI |
| 31) Phloxine B | 73) Rose bengale |
| 32) Erythrosine Yellowish | 178) Phloxine P |

Od drugih kislih barvil se ksantenska barvila razlikujejo po tem, da so v obliki prostih kislin netopna v vodi, medtem ko se topijo v alkoholih, estrih, etrih, aromatskih ogljikovodikih itd.

Ta lastnost močno vpliva na njihovo obnašanje pri kromatografiji. Na papirju so nekatera od teh barvil mnogi kromatografirali skupaj z ostalimi v vodi topnimi barvili. Posebej z njimi so se bavili le nekateri /^(33, 200,) najbolj uporabni so sistemi v ^(70, 156)/.

Uporabljali so nevtralne in amonijakalne mobilne faze, zlasti take, ki vsebujejo veliko vode, pa tudi nekaj takih, v katerih prevladujejo organska topila.

Za ločitve na Al_2O_3 ali silikagelu (32, 132, 194) so uporabljali mobilne faze kot zaostala v vodi topna barvila, pa tudi brezvodne zmesi ledocta z aromati ter metiletiletanonom in i-propanolom.

Ker je bila večina teh postopkov preiskušena le na nekaterih barvilih in, ker so bili dokaj pomanjkljivi (slabe ločitve ali pa dolgo trajanje), sem iskal več novih sistemov za hitro in uspešno medsebojno ločitev teh barvil. Uporabljal sem papirno in tenkoplastno kromatografijo.

Papirna kromatografija:

Celuloza je rahlo kisel hidrofilen substrat - ksantenska barvila pa se v kislem ne topijo v vodi, temveč v organskih topilih. Zato je razumljivo, da pri uporabi kisljih organskih mobilnih faz, ki se uporabljajo za kromatografijo ostalih v vodi topnih barvil, potujejo s fronto ali pa tik za njo, medtem ko se pri uporabi mnogih nevtralnih mobilnih faz razvlečejo v dolge repe. Le pri uporabi alkalnih mobilnih faz, ki povzročijo, da je tudi celulozni del sistema alkalen, lahko pričakujemo dobre rezultate. Že pri prvih poskusih uporabe alkalnih mobilnih faz (kr. št. 13) sem opazil, da ostaja Erythrosin extra v sredini kromatograma. Poskusi z butanolnimi mobilnimi fazami niso dali zadovoljivih rezultatov, ker so bile lise barvil preveč razvlečene in premalo ločene med seboj, tako da so pri analizi zmesi prehajale ena v drugo in ni bilo mogoče točno ločiti - identificirati barvil.

Prvi poskus z zmesjo etilacetat:piridin:voda 50:23:20 je dal še kar zadovoljivo ločitev, medtem ko so bili vsi naslednji kromatogrami, razviti z zmesjo enake sestave, mnogo slabši.

Vzrok: pri prvem poskusu sem uporabil piridin, ki je razžrl zamašek iz neke plastične mase in je bil zaradi tega močno onečiščen. Pri naslednjih poskusih sem uporabljal čist piridin.

Iz tega sem sklepal, da bi ločitev ksantenskih barvil izboljšala neka snov, ki ima večjo molekularno težo, a je pri tem še dovolj hidrofilna, da bi bila lahko glavna sestavina mobilne faze. Ker se višji alkoholi niso obnesli, sem iskal rešitev pri estrih in drugih spojinah, ne da bi se pri tem strogo držal zadnje ugotovitve.

Preiskusil sem naslednje mobilne faze (kr. št. 34).

Kromatogram št. 34

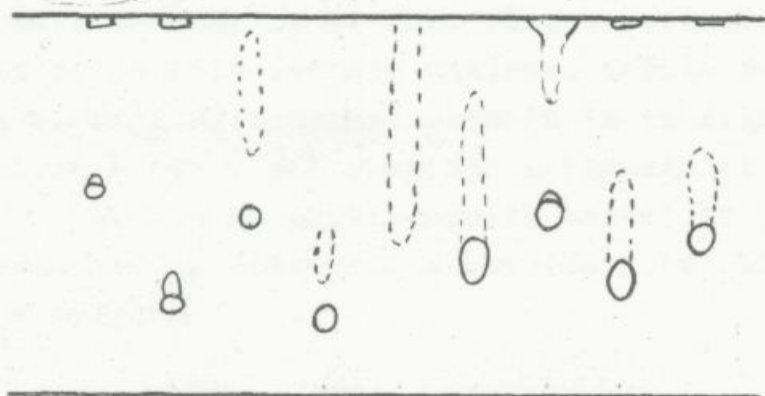
- m.f.: a) etilacetat:tetrahidrofuran:voda 2:8:3
b) acetocetni ester:tetrahidrofuran:voda 4:7:3
c) acetocetni ester:aceton:voda 10:6:3
đ) benzen:tetrahidrofuran:voda 2:35:10
d) acetocetni ester:metanol:voda 100:17:20

papir: Whatman 3 MM ...I

Whatman 3 MM impregniran z 0,1 n NaCl ...II

barvilo: komercialna zmes barvil Phloxine B + Eosin A

T = 22 °C



Vidimo, da so dale te mobilne faze lepo oblikovano le liso barvila Phloxine B; drugih barvil, zlasti jodiranih derivatov pa sploh niso ločila med seboj (ta barvila so bila razvlečena čez celo zgornjo polovico kromatogramov).

Tudi impregnacija papirja ni bistveno vplivala na obliko lis, temveč le na Rf-vrednosti.

Ko sem hotel zamenjati tem mobilnim fazam del vode z amonijakom, se je razmerje topil (n.pr. benzen:tetrahidrofuran) še poslabšalo, tako da zmesi a), b), đ) niso bile uporabne.

Med naslednjimi mobilnimi fazami:

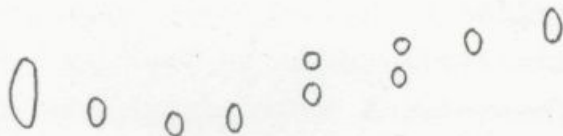
- butilacetat:piridin:voda 8: 9: 3
acetocetni ester:piridin:voda 50:15:20
acetocetni ester:n-propanol:amonijak:voda 50:17:2,5:7,5
acetocetni ester:aceton:amonijak:voda 50:45: 5: 10
acetocetni ester:metanol:amonijak:voda 50:10:2,5:7,5

sta dali najlepše kromatograme zadnji dve. Posebno zadnja je takoj po zmešanju topil dokaj ostro in daleč vsaksebi ločila di- in tetrahalogenska barvila, ker se je razmešala na papirju. Po 24 urah pa je dala že zelo razvlečene in slabo ločene lise, najbrž zaradi hidrolize estra.

Potem, ko sem z mobilno fazo acetocetni ester:etanol:amonijak:voda 50:20:2:20 skromatografiral nekaj kromatogramov s temi barvili in pri tem ugotovil, da na papirju Ederol 202 in 208 lepše loči ksantenska barvila kot na papirju Whatman 2, sem v isto, torej že "prezračeno" zmes dodal etanolamin (dva dela). Kromatogrami, dobljeni s to zmesjo, so se odlikovali po tem, da so bile lise barvil elipsaste, brez repov in da so bile ostreje omejene. Ločila so se dihalogenska barvila od tetrahalogenskih in ta delno od bolj halogeniranih ter v teh skupinah eritrozina (4 J) od eozina (4 Br), medtem ko dihalogenskih barvil ni ločilo med seboj, preslabo pa tudi ostala barvila z več halogenskimi atomi v molekuli.

Kromatogram št. 35

m.f. acetocetni ester:etanol:amonijak:etanolamin:voda
50:20:2:2:20
papir: Ederol 202



Barvila: 45 29 48 32 30 8 31 73

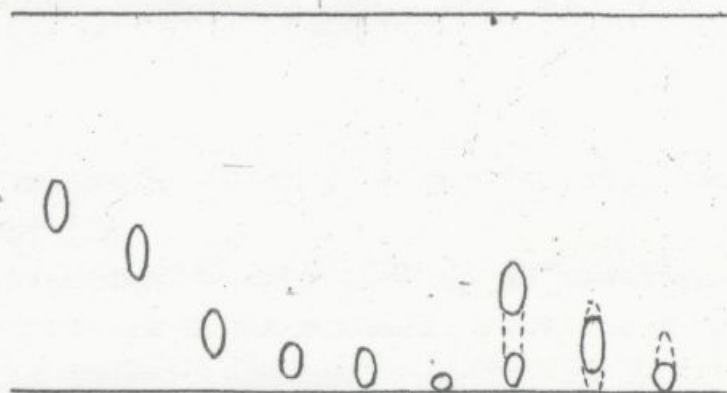
Ko sem pozneje poskušal na papirju Whatman 2 in 3 MM dobiti enako ločitev z mobilno fazo iste ali podobne sestave, nisem dobil tako lepo oblikovanih lis.

Razen z organskimi topili sem poskušal ločiti ksantenska barvila tudi z vodnimi raztopinami soli. Uporabil sem 0,1n NaCl, 1 % NaCl, 1 % Na₂SO₄ in 0,5 % terc. Na-citrat. Kromatogrami se po obliki niso dosti razlikovali med seboj.

Kromatogram št. 36

m.f.: 0,1n NaCl

papir: Whatman 2

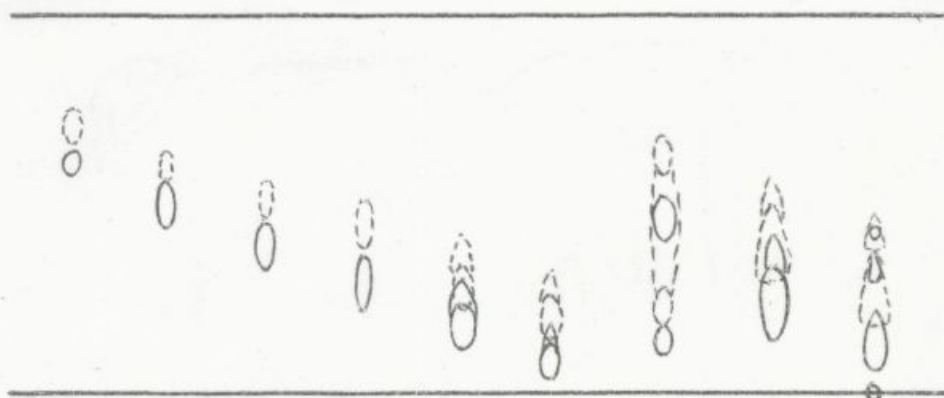


Barvila: 45 29 48 32 30 8 178 31 73

Da bi barvila bolj ločil, sem dodajal raztopinam soli različne količine NH₄OH, poskušal sem tudi z metilaminom in dietilaminom. Ti dodatki so povečali R_f-vrednost barvil. Amonijak in metilamin sta izboljšala ločitev zlasti dihalogenskih barvil pa tudi ostalih, dietilamin pa je povzročil, da je bila medsebojna lega dihalogenskih barvil slabša, ostalih pa boljša, le da se je povečala difuznost (kr. št. 37). Kljub temu, da so lise pri kromatografiji s temi mobilnimi fazami mnogo bolj difuzne kot če uporabimo mobilno fazo acetocetni ester:etanolamin:etanol:amonijak:voda 50:2:20:2:20 na papirju ederol 202, imajo vendar več

Kromatogram št. 37

m.f.: Na_2SO_4 :amonijak:voda 1:40:60 znak ○
 Na_2SO_4 :dimetilamin:voda 1: 5:95 znak ○
papir: Whatman 2



Barvila: 45 29 48 32 30 8 178 31 73

prednosti:

- 1) tečejo toliko hitreje, da z daljšo potjo kompenzirajo difuznost lis
- 2) so selektivnejše - dobro ločije na komponente barvila, ki so videti na kromatogramih, razvitih z organskimi mobilnimi fazami, enotna.

Slaba stran pa je, da se lise barvil, ki imajo halogene le na ksantenskem delu molekule, prekrivajo z onimi, ki so halogenirane tudi na fenilni substituenti.

Ti dve skupini se bolje ločita med seboj, če namesto običajnih soli uporabimo anionske detergente.

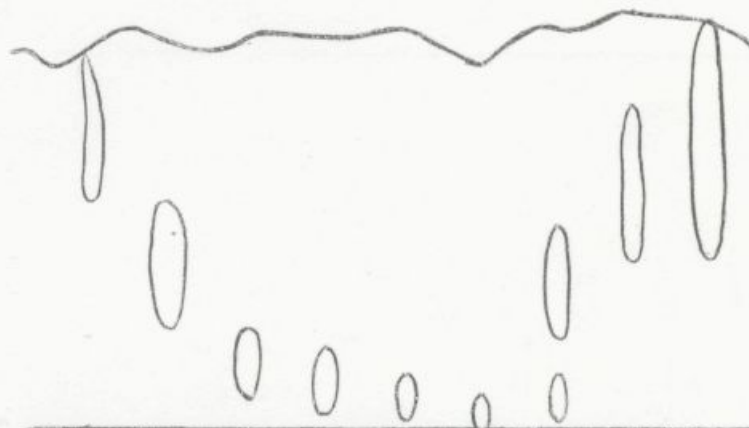
To sem ugotovil, ko sem kromatografiral ksantenska barvila z 1 in 2 % nevtralnno raztopino Ivozona 50 ali BIS-a v vodi. Barvila, halogenirana le na ksantenskem delu ostanejo v glavnem v bližini starta, kot pri kromatografiji z nevtralnimi raztopinami običajnih soli. Tista barvila, ki imajo halogene tudi na fenilni substituenti, so se dvignila precej više, tako da so se ločila od večine ostalih barvil. Njihove lise pa so bile difuzne, zveržene, tako da kaj več

kot samo ločitev med obema skupinama barvil nisem dosegel.

Kromatogram št. 38

m.f.: 2 % Ivopon 50

papir: Whatman 3 MM



Barvila: 45 29 48 32 30 8 178 31 73

Tenkoplastna kromatografija

Obnašanje ksantenskih barvil pri kromatografiji na plasteh iz celuloze je podobno kot na papirju.

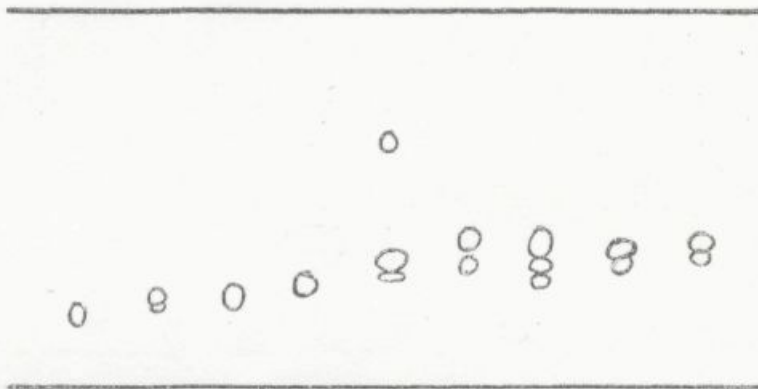
Popolnoma drugače pa se obnašajo ta barvila pri kromatografiji na silikagelu. Organske mobilne faze, ki so uporabne za kromatografijo na celulozi, sicer dajejo tudi tu lepo oblikovane in ostro omejene lise, vendar so nagnete tako tesno skupaj, da lahko že majhna nepravilnost v postopku (nečistoče, nenasičena atmosfera itd.) toliko spremeni lego barvila, da ni mogoče zagotovo reči, ali je to res le določeno barvilo, ali pa je v resnici neko drugo (kr. št. 39).

Medtem, ko pri kromatografiji na celulozi kisle in nevtralne mobilne faze niso uporabne, omogočajo na silikagelu ravno te zmesi skoraj neomejene možnosti za spreminjanje reakcijskih pogojev in za prilagajanje le teh trenutni potrebi.

To se lepo vidi na naslednjih kromatogramih:

Kromatogram št. 39

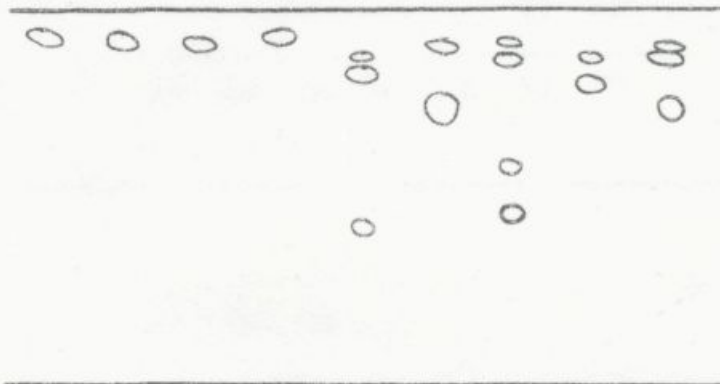
m.f.: t-butanol:toluen:amonijak:voda 6:1:1:1
adsorbent: silikagel G



Barvila: 45 29 48 32 30 8 178 31 73

Kromatogram št. 40

m.f.: butilacetat:valerianova ksl. 5:1, nasičena z vodo
adsorbent: silikagel G



Barvila: 45 29 48 32 30 8 178 31 73

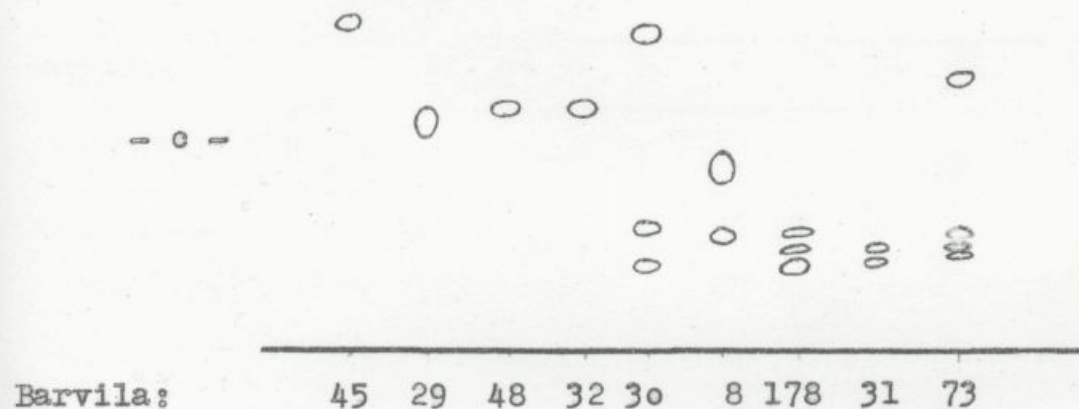
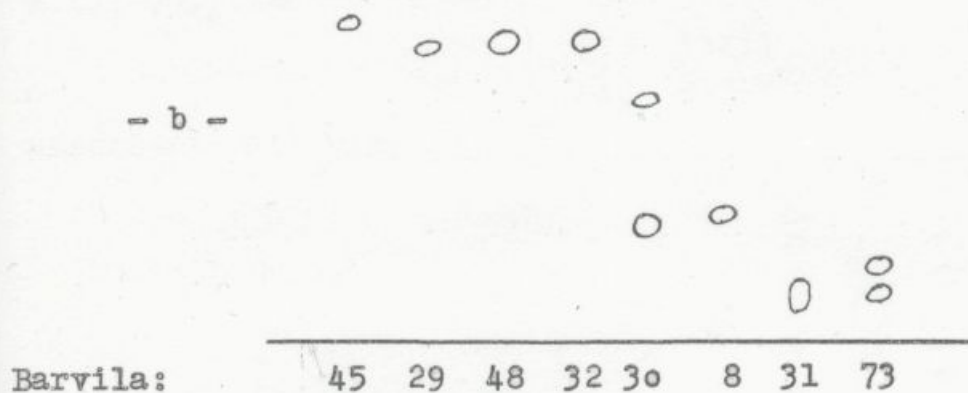
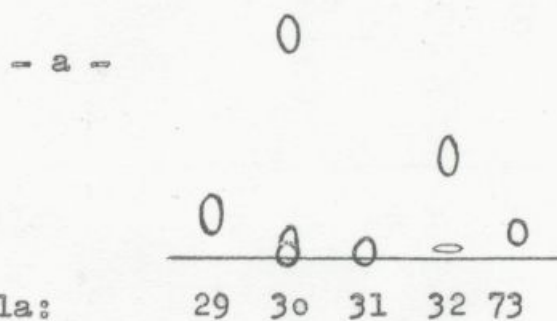
Kromatogram št. 41

m.f.: - a - metiletilketon

- b - metiletilketon nasičen z vodo

- c - metiletilketon:aceton:voda 80:15:15

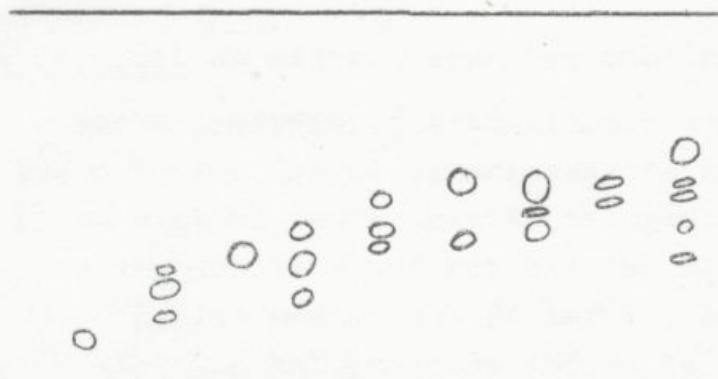
adsorbent: silikagel G



Kromatogram št. 42

m.f.: toluen:ledocet 5:2

adsorbent: silikagel G



Barvilo: 45 29 48 32 30 8 178 31 73

Kromatogram št. 43

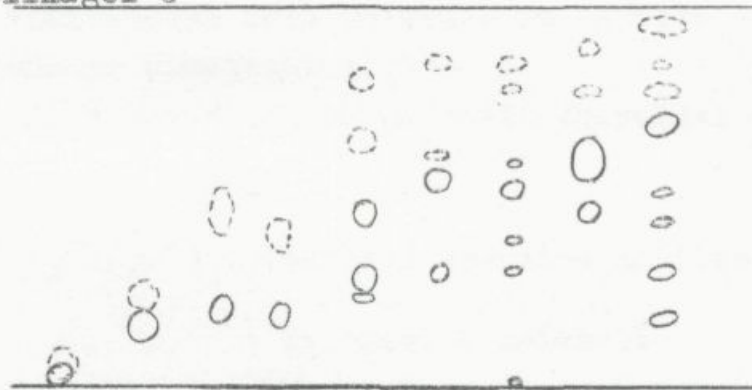
m.f.: CCl_4 : CHCl_3 :ledocet

a) 5:1:1 ○

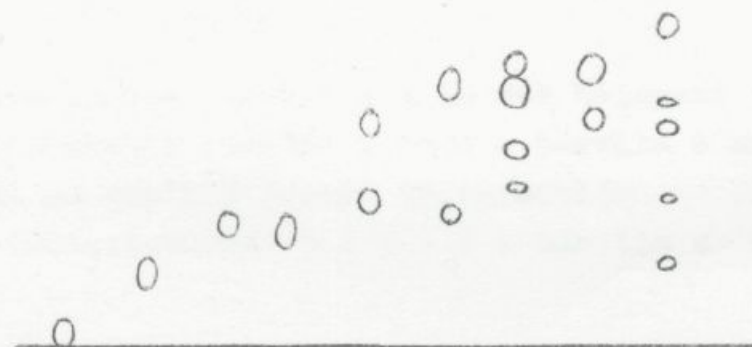
b) 5:4:1 ○

c) 5:2:1

adsorbent: silikagel G



Barvilo: 45 29 48 32 30 8 178 31 73



POVZETEK:

Kisla ksantenska barvila je mogoče ločiti med seboj tako na celulozi kot na silikagelu.

Za ločitev na celulozi so najbolj uporabne mobilne faze:

a) acetocetni ester:etanol:amonijak:etanolamin:voda
50:20:2:2:20, s katero ločimo fluorescein od dihalogenskih derivatov in te spet od tetra in više halogeniranih barvil, medtem ko se barvila z več kot štirimi halogeni v molekuli le slabo ločijo med seboj. Od barvil, substituiranih z istim številom halogenov se ločita le Eosin YS in Erythrosin extra. Papir ederol 202 in 208 je za te ločitve mnogo boljši kot papir Whatman 2 in 3 MM.

b) sistemi sol:baza:voda (n.pr. $\text{Na}_2\text{SO}_4:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:40:60
 $\text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl}:\text{o,1n NaOH}$ 0,6:100)
in podobne, ki ločijo med seboj:

barvila z različnim številom halogenih elementov

barvila z istim številom različnih halogenov,
ne ločijo nekaterih parov, ki jih sestavljajo barvila s halogeni v ksantenskem delu molekule in barvila s halogeni tudi v fenilni substituenti.

Omogočajo tudi dokazovanje prisotnosti spremljajočih barvil.

Za ločitve na silikagelu so najbolj uporabne mobilne faze:

a) za ločitve barvil z do 4 halogeni v molekuli

$\text{CCl}_4:\text{CHCl}_3$:ledocet 5 : 3 do 5 : 1

Barvila z več halogeni ne motijo, ker so pritisnjena ob fronto.

b) za medsebojno ločitev barvil s 4 in več halogeni v molekuli: metiletilketon nasičen z vodo - barvila z manj halogeni so tik pod fronto in ne motijo

$\text{CCl}_4:\text{CHCl}_3$:ledocet 5 : 1 : 1 - barvila z manj

halogeni so ob startu.

c) Univerzalna je mobilna faza $\text{CCl}_4:\text{CHCl}_3:\text{ledocet}$ 5:2:1

Za pomožne ločitve so uporabni tudi sistemi aromatski ogljikovodik:organska kisl. 10:1 do 10:5.

Kromatografija na silikagelu prekaša kromatografijo na celulozi zlasti pri ugotavljanju spremljajočih barvil.

3) V vodi topna bazična barvila

14) Methylviollette

15) Victoriablau R

16) Victoriablau B

17) Brilliantgrün

49) Rhodamin B

60) Methylene Blue

Papirna kromatografija

O kromatografiji teh barvil na neimpregniranem papirju je v literaturi (153, 107) zbranih precej podatkov. Obdelane so mobilne faze z organskimi topili in vodnimi raztopinami soli ali baz ali kislin. Kot uporabne mobilne faze omenjajo 1 % cetiltrimetilamonijev bromid (pH 7), 0,1n HCl, H_2SO_4 in H_3PO_4 .

Ko sem preiskušal te mobilne faze na papirju Whatman 2 in 3 MM, so te kisline razvlekale barvila v dolge repe.

1% alkildimetilbenzilamonijev klorid, ki sem ga uporabil kot kationski detergent, tudi ni dal uporabnih rezultatov.

Alkalne in nevtralne vodne raztopine soli so jih zadržale na startu ali pa razvlekale v dolge repe. Prav tako tudi

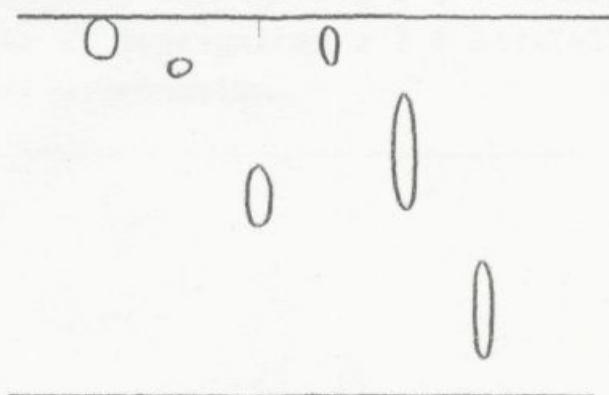
2 % KHSO_4 .

10 % HCl jih je nekoliko razdelila med seboj, vendar so ležale lise že preblizu fronte. Da bi jih zadržal v polju, sem dodal solni kislini še KHSO_4 in kromatografiral z zmesjo $\text{KHSO}_4:\text{HCl}:\text{voda}$ 2:20:100. Rezultat je prikazan na kromatogramu št. 44.

Kromatogram št. 44

m.f.: KHSO_4 :HCl:voda 2:20:100

papir: Whatman 2



Barvila: 14 15 16 17 49 60

Sklep:

Za ločitev na papirju Whatman 2 in 3 MM je uporabna le slednja mobilna faza, vendar je treba to ločitev dopolniti z drugimi sistemi.

Poskušal sem jih ločiti tudi na papirju impregniranem s parafinskim oljem, pa tudi tu uspeh ni bil zadovoljiv, ker so bile lise preveč difuzne.

Kromatografiral sem jih tudi na papirju impregniranem s 5 % cetilalkoholom v etanolu z mobilno fazo etanol:amonijak:voda 2:2:1 ⁽²²⁾ in z 2 % cetilalkoholom v etanolu ter mobilno fazo etanol:amonijak:voda 2:1:2 - glej kr. št. 45).

Sklep:

Kromatografija na papirju impregniranem s cetilalkoholom dobro dopolnjuje kromatografija na neimpregniranem papirju. Le kot dopolnilo je uporabno zaradi izredne počasnosti (4 ure za 10 cm poti).

Kromatogram št. 45 a in 45 b

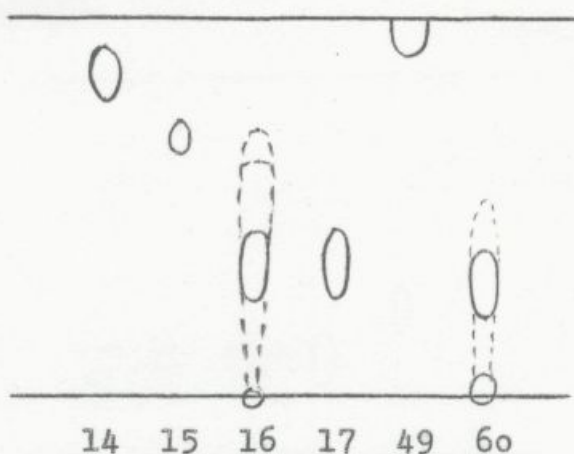
m.f.: a) etanol:amonijak:voda 2:2:1

b) etanol:amonijak:voda 2:1:2

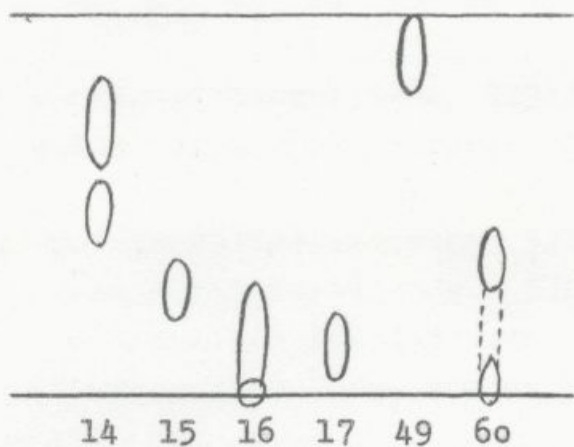
papir: a) Whatman 3MM, impregniran s 5 % cetilalkoholom

b) Whatman 2, impregniran s 2 % cetilalkoholom v etanolu

a)



Barvila:



Barvila:

Tenkoplastna kromatografija:

O tej metodi je v literaturi že nekaj podatkov (107, 132, 194), vendar ne zajemajo vseh barvil.

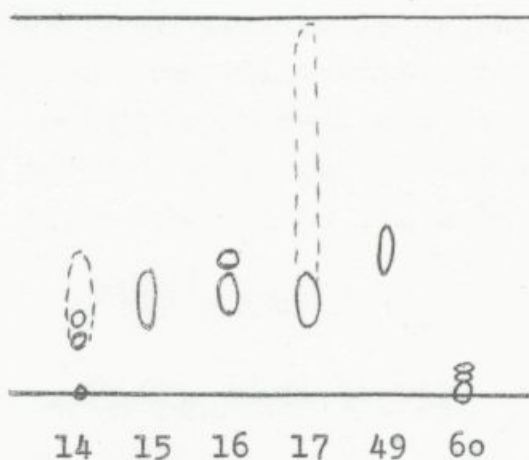
Na silikagelu G sem kromatografiral ta barvila z več mobilnimi fazami. Ugotovil sem:

1) dobre rezultate dajo naslednje mobilne faze:

etilacetat:piridin:voda 6:3:2
n-butanol:etanol:amonijak:voda 7:3:1:1
n-butanol:etanol:voda 7:3:2

Kromatogram št. 46

m.f.: etilacetat:piridin:voda 6:3:2
adsorbent: silikagel G



Barvila:

14 15 16 17 49 60

- 2) mobilna faza n-butanol:etanol:voda 7:3:2 je zelo primerna za ugotavljanje spremljajočih barvil.
- 3) mobilne faze n-butanol:ledocet:voda 3:1:5
n-butanol:etanol:voda 5:2:2
t-butanol:etilacetat:voda 5:3:4 itd.

dajo sicer lepo oblikovane lise, vendar barvila premalo ločijo med seboj.

Na silikagelu nisem dobil tako dobrih ločitev kot na papirju.

POVZETEK:

1) Če hočemo uspešno kromatografirati ta barvila na papirju, moramo uporabljati kombinacijo mobilnih faz:

KHSO_4 :HCl:voda 2:20:100 na neobdelanem papirju
etanol:amonijak:voda 2:1:2 ali 2:2:1 na papirju impregniranem z 2 ali 5 % cetilalkoholom v etanolu.

2) Za kromatografije na plasteh iz silikagela je še najbolj primerna mobilna faza etilacetat:piridin:voda 6:3:2 ker od vseh preiskušanih mobilnih faz najboljše loči ta barvila med seboj, vendar je ločitev precej slabša kot na papirju, čeprav je oblika lis zelo ugodna.

3) V maščobah topna barvila

12 - Sudanorange G	70 - Sudanbraun B
13 - Sudanrot G	190 - Sudanblau II
67 - Sudangelb GRN	192 - Sudangelb 3G

O kromatografiji v maščobah topnih barvil je v literaturi objavljenih precej člankov, ker so ravno na barvilih iz te skupine najprej opazili kancerogene efekte (p-dimetilaminoazobenzen !) in je bila potreba po eksaktni ločbi barvil toliko bolj nujna. Številni avtorji so ugotovili, da papir sam po sebi zaradi svoje hidrofилnosti ni primeren adsorbent za ta barvila, zato so poskušali delati z impregniranim in so v mnogih primerih dobili zadovoljive rezultate (36, 55, 79, 103, 113, 114, 122, 123, 162, 186, 188, 196, 211, 222, 223). Med tem časom pa so toksikološke preiskave pokazale, da predstavljajo aminska barvila, ki so se prej največ uporabljala, preveliko nevarnost za človekovo zdravje in so začeli zakonodajalci njihovo uporabo omejevati in jih zamenjavati s fenolnimi barvili, dokler niso obeh skupin zamenjali s karotenskimi barvili (pri

živilih). Za barvanje predmetov splošne rabe pa se v maščobah topna barvila - zlasti fenolna, še vedno uporabljajo, medtem ko se aminska bolj redko.

S tem, da se mnoga barvila, ki so kromatografsko precej dobro obdelana, ne uporabljajo več in da so zamenjana z drugimi, se je pokazala potreba po prilagoditvi prejšnjih postopkov novim barvilom.

Vseh barvil, ki jih omenja naša zakonodaja nisem imel na razpolago, pač pa sem uporabljal tudi nekatera barvila, ki se v inozemstvu precej pogosto uporabljajo in je možno, da bodo sčasoma dovoljena tudi pri nas ali pa da bomo kdaj uvozili izdelke pobarvane z njimi.

Papirna kromatografija

Uporabljal sem samo acetiliran in impregniran papir.

Impregniral sem ga z:

- A) nepolarnimi tekočinami (parafinsko in silikonsko olje)
- B) polarnimi tekočinami (dimetilformamid, etanolamin)
- C) s poliamidom (perlon)

Mobilne faze:

- A) S predposkusi sem ugotovil, da je za papir, impregniran s parafinskim oljem najugodnejše razmerje organsko topilo:voda za metanol 8:2, aceton 5:5, tetrahidrofuran 4:6 in pod. ter da je v primeru, ko imamo bolj polarna barvila (taka ki gredo iz petroletra v etanolamin) včasih treba dodati nekoliko več vode, medtem ko je za kromatografijo manj polarnih barvil bolje vzeti malo več organskega topila, da barvila niso preveč nagnetena ob fronti ali ob startu.

Isto velja tudi za papir, impregniran s silikonskim oljem in za acetiliran papir.

Za kromatografijo izrazito fenolnih barvil so boljše alkalne mobilne faze, za kromatografijoaminskih barvil pa kisle. Pri kromatografiji barvil, ki imajo zaradi svoje strukture te lastnosti zamaskirane, ni velikih razlik pri uporabi mobilnih faz z različnimi pH. Te ugotovitve veljajo tako za acetiliran papir kakor tudi za papir, impregniran s parafinskim in silikonskim oljem.

Najboljše mobilne faze so:

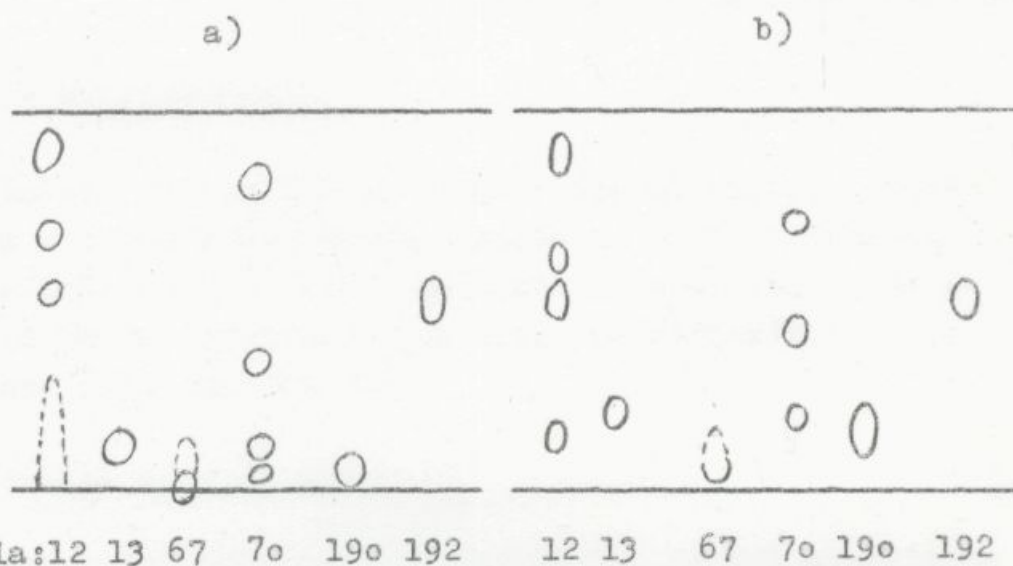
metanol:ledocet:voda (103)	80: 5:15	(kr. št. 48)
metanol:amonijak:voda	70: 5:25	
aceton:HCOCH:voda	5 : 1: 5	
aceton:ledocet:voda	4 : 1: 6	
tetrahidrofuran:amonijak:voda	4 : 1: 5	(kr. št. 47)
tetrahidrofuran:piridin:voda	3 : 1: 5	(kr. št. 49)
metanol:etanolamin:voda	75: 5:20	

Kromatogram št. 47 a, b

m.f.: tetrahidrofuran:amonijak:voda 4:1:5

papir: a) Whatman 2 impregniran z 10 % parafinskim oljem

b) Whatman 2 impregniran z 10 % silikonskim oljem
oboje v etru

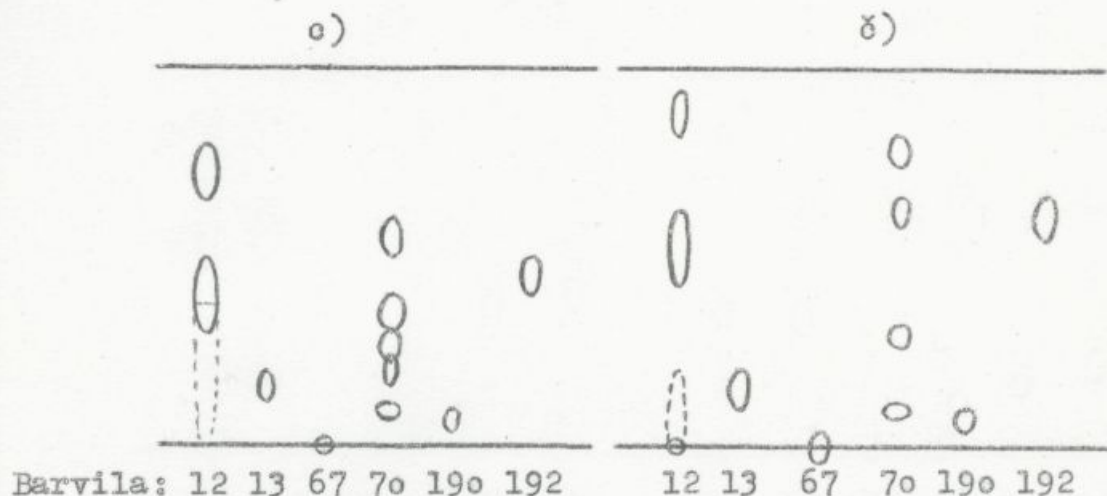


Kromatogram št. 47 c, č

m.f.: tetrahidrofuran:amonijak:voda 4:1:5

papir: MN 214 Ac/1o - c)

MN 214 Ac/2o - č)



Vpliv impregnacije na Rf-vrednosti:

- 1) Primerjava Rf-vrednosti barvil na papirju, ki je bil impregniran z:
- 1o % parafinskim oljem v etru
 - 1o % silikonskim oljem v etru
- papir z 1o % acetila (maks. ima lahko 44,8%)

a) kisle mobilne faze:

Rf-vrednosti večine barvil so največje na papirju impregniranem s parafinskim oljem, manjše na papirju impregniranem s silikonskim oljem. Na acetiliranem papirju pa je razpored barvil nekoliko drugačen, Rf-vrednosti so bolj izenačene (glej kr. št. 48).

b) nevtralne mobilne faze:

Kromatogrami so zelo podobni prejšnjim, le pri acetiliranem papirju ležijo barvila nekoliko više (glej kr. št. 49).

Kromatogram št. 48

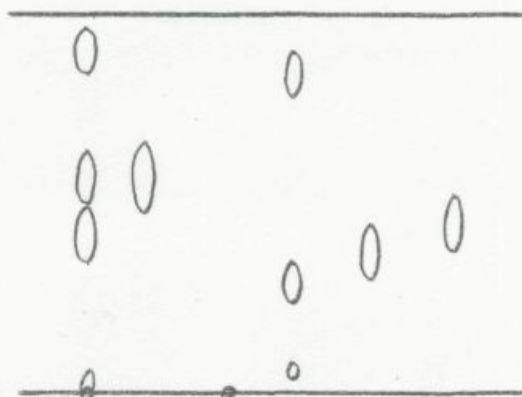
m.f.: metanol:ledocet:voda 80:5:15

papir: a) Whatman 3 MM, impregniran z 10 % parafinskim oljem

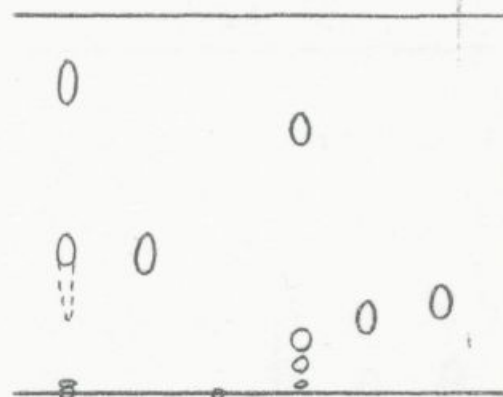
b) Whatman 2, impregniran z 10 % silikonskim oljem

c) MN 214 Ac/10

a)



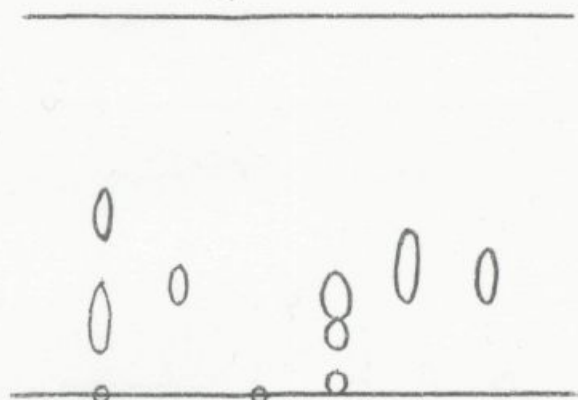
b)



Barvila: 12 13 67 70 190 192

12 13 67 70 190 192

c)



Barvila:

12 13 67 70 190 192

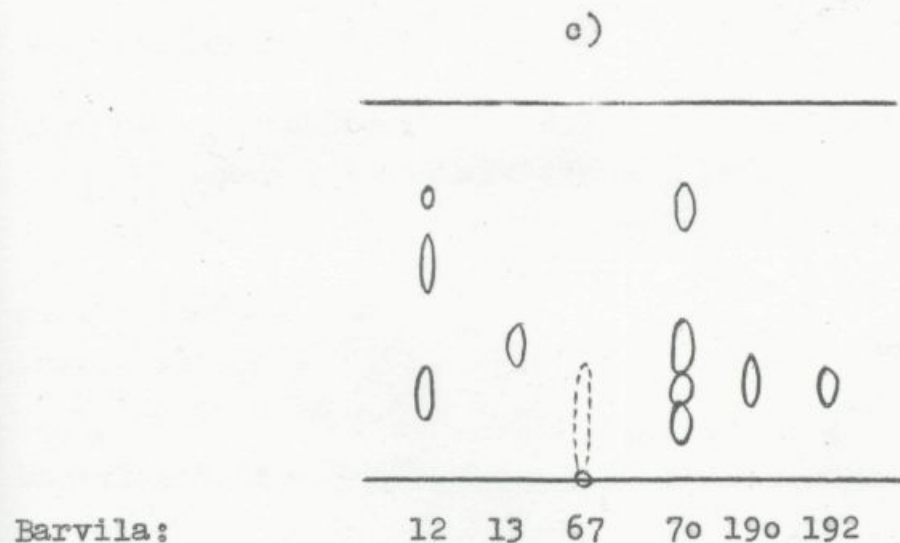
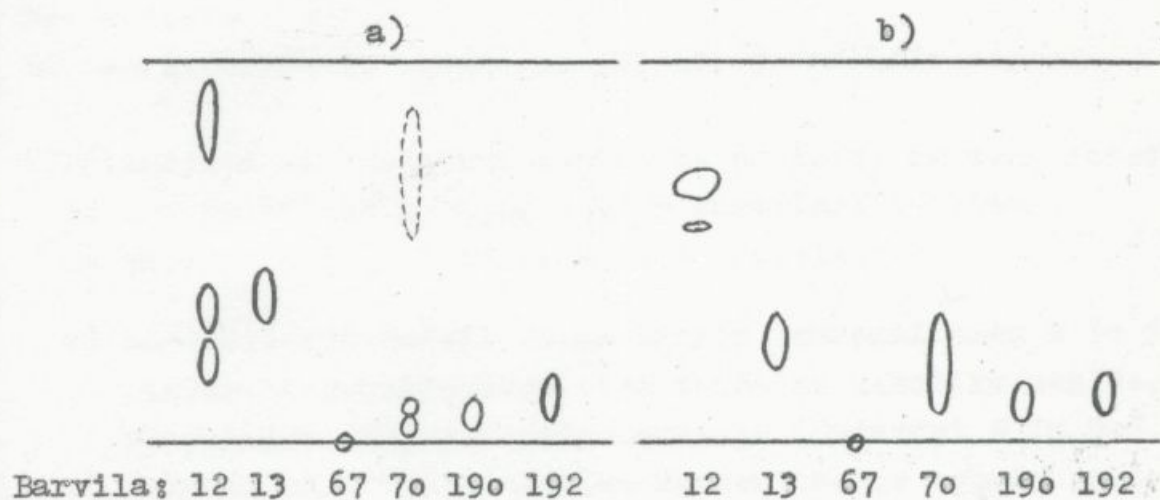
Kromatogram št. 49

m.f.: tetrahidrofuran:piridin:voda 3:1:5

papir: a) Whatman 3 MM, impregniran z 10 % parafinskim oljem

b) Whatman 2, impregniran z 10 % silikonskim oljem

c) MN 214 Ac/10



c) Alkalne mobilne faze:

Barvila s prostimi OH skupinami se porazdelijo po celem kromatogramu, medtem ko ostala barvila ostanejo ob startu (glej kr. št. 47).

Ugotovitev:

Za impregnacijo je bolje uporabljati parafinsko olje.

2) Primerjava Rf-vrednosti barvil na papirju, impregniranem s: 5 % parafinskim oljem - 10 % parafinskim oljem na papirju z 10 % acetila - 20 % acetila.

a) Rf-vrednosti barvil so na papirju impregniranem z 10 % raztopino parafinskega olja običajno nekoliko manjše, zlasti pri manj polarnih barvilih (Sudanrot G in pod.), tako da je s spreminjanjem koncentracije mogoče vplivati na ločitev.

Kromatogram št. 50

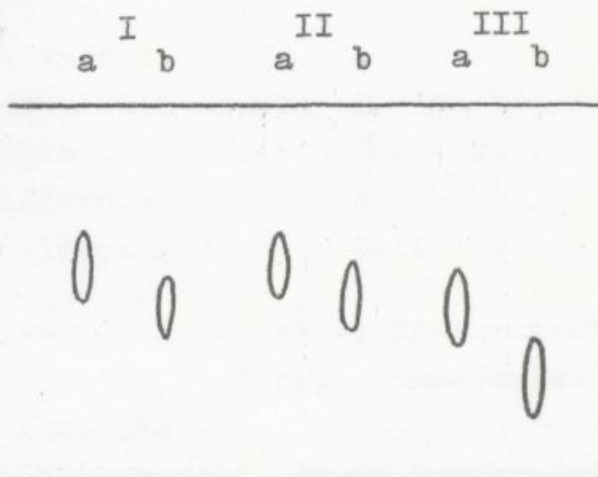
m.f.: I metanol:voda 8:2
II metanol:amonijak:voda 80: 5:15
III aceton:ledocet:voda 40:15:60

papir: Whatman 3 MM

impr.: a) 5 % parafin. olje

b) 10 % parafin. olje

barvilo: Sudanrot G



b) Na papirju z 20 % acetila se pri uporabi alkalnih mobilnih faz ločijo med seboj bolj polarna topila bolje kot na papirju z 10 % acetila. Pri ostalih mobilnih fazah pa razlike niso tako velike, vendar še omogočajo razne fineše pri ločitvah (prim. kr. št. 47).

B) Impregnacija z etanolaminom

Impregnacija papirja z etanolaminom ni dala dobrih rezultatov kljub temu, da je mogoče uporabiti kot mobilne faze veliko število topil s katerimi se ne meša. Videti je, da je vzrok za to njegova lastnost, da se zelo močno veže na proste OH skupine barvil, medtem ko so šestčlenski obroči, ki jih s pomočjo vodikove vezi tvorita azo in OH skupina barvila, zaradi resonance tako stabilni, da se etanolamin vanje ne more vključiti.

Iz tega sledi njegova prevelika selektivnost:

barvila s prostimi OH skupinami ostanejo na startu, medtem ko ostala potujejo tik za fronto.

Impregnacija z dimetilformamidom

Na papirju impregniranem z dimetilformamidom sem dobil zadovoljive ločitve barvil Sudanorange G, Sudanrot G, Sudangelb GRN, Sudanbraun B že kar s petroletrom in cikloheksanom. Ostala barvila so bila večinoma v fronti, vendar so bile njihove Rf-vrednosti nekoliko manjše, če sem jih kromatografiral s cikloheksanom.

Preiskusil sem še naslednje zmesi:

petroleter:tetraklorogljik:dimetilformamid	50:10: 2
petroleter:tetraklorogljik:dimetilformamid	50:20:20
petroleter:kloroform:dimetilformamid	80:10: 2
cikloheksan:kloroform:dimetilformamid	80:10: 2

Dodatek CCl_4 ali $CHCl_3$ je povzročil, da so se Rf-vrednosti barvil, posebno tistih, ki so bila ob fronti, zmanjšale. Ločitev se je s tem precej izboljšala.

Prevelik dodatek teh spojin pa povzroči, da se impregnacija

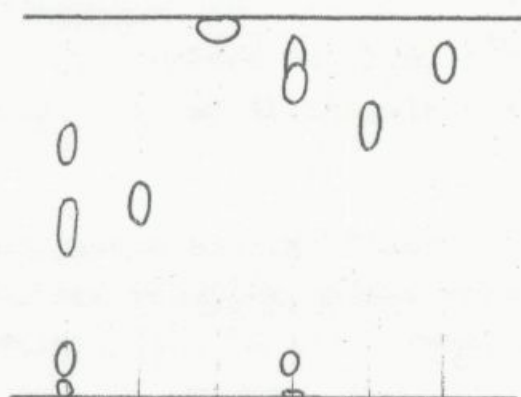
topi v mobilni fazi in s tem je razdelitveni proces nemogoč. Uporabni sta le prva in zadnja zmes.

Kromatogram št. 51

m.f.: petroleter:CCl₄:dimetilformamid 50:10: 2

papir: Whatman 3 MM

impregnacija: dimetilformamid:acetone 1:1



Barvila: 12 13 67 70 190 192

C) Impregnacija s poliamidi

Za impregnacijo sem uporabil filtrirano 5 % raztopino perlonske tkanine, ekstrahirane 6 ur z zmesjo piridin: amonijak 97:3, v mravljinčji kislini. Impregniran papir sem pomočil v vodo, da se je poliamid oboril, nato pa sem ga posušil na zraku.

Poliamid sem uporabljal zato, ker zaradi tvorbe vodikovih vezi med oksi skupinami barvil in amidnimi skupinami impregnacije zadržuje potovanje barvil.

Nepolarna in slabo polarna topila (ogljikovodiki, tetra-klorengljik) niso uporabna.

Mobilne faze, ki sem jih uporabljal za kromatografijo na hidrofobnem papirju, zlasti kisle, so barvila nekoliko ločila med seboj, vendar so bile lise preveč difuzne, razlike v R_f-vrednostih pa premajhne.

Preiskusil sem še celo vrsto drugih zmesi, vendar sem dobil kolikortoliko zadovoljivo ločitev le z mobilno fazo:

aceton:kloralhidrat:ledocet:voda 2:4:1:6.

Kromatografija v maščobah topnih barvil na papirju impregniranem s perlonom je le izhod v sili; ustreznega kompromisa med hidrofobnostjo barvil in hidrofilnim elucijskim procesom nisem uspeh najti.

Tenkoplastna kromatografija

Prva dela so bila izvršena na Al_2O_3 (30, 32, 126, 127, 130, 175), pozneje pa tudi na Silikagelu G (108, 125, 132, 163, 168, 175).

Priporočajo naslednje mobilne faze:
petroleter, tetraklorogljik, njuno zmes
benzen, tetraklorogljik in njuno zmes, amilacetat.

Pri svojem delu sem kot adsorbent uporabljal silikagel G. Preiskusil sem vrsto čistih topil: petroleter, cikloheksan, benzen, toluen, ksilen, klorbenzen, tetraklorogljik, trikloretilen, kloroform in metiletilketon.

Petroleter in cikloheksan barvil skoraj nista premaknila s starta; v vrsti ksilen, toluen, benzen pa R_f -vrednosti naraščajo in s tem se barvila tudi bolje ločujejo.

(Kr. št. 52)

Podobne so spremembe tudi v vrsti tetraklorogljik, trikloretilen, kloroform, vendar s to bistveno razliko, da je pri CCl_4 ločitev že nakazana, a so barvila še vsa v spodnji tretjini; pri trikloretilenu so že razporejena čez dve tretjini kromatograma, kloroform pa je večino izmed njih pritisknil ob fronto, le najpolarnejši (Sudanorange G in Sudanbraun B) sta ostali v polju.

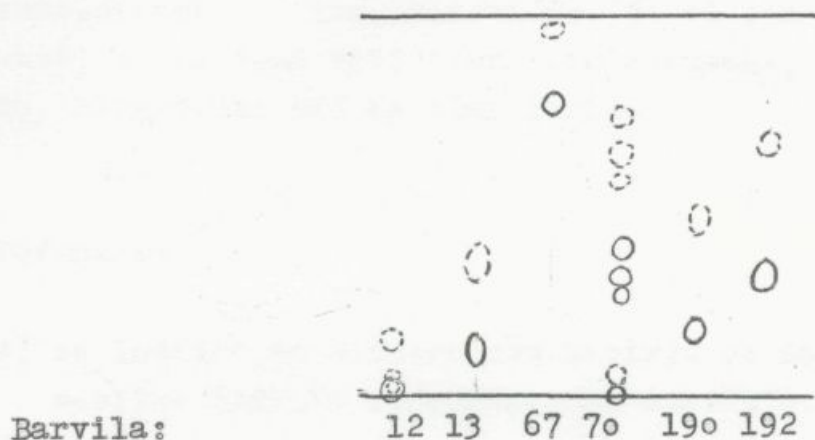
Metiletilketon je barvila sicer dvignil s starta, toda jih ni ločil med seboj.

Kromatogram št. 52

m.f.: ksilen znak: ○

benzen znak: ○

adsorbent: silikagel G

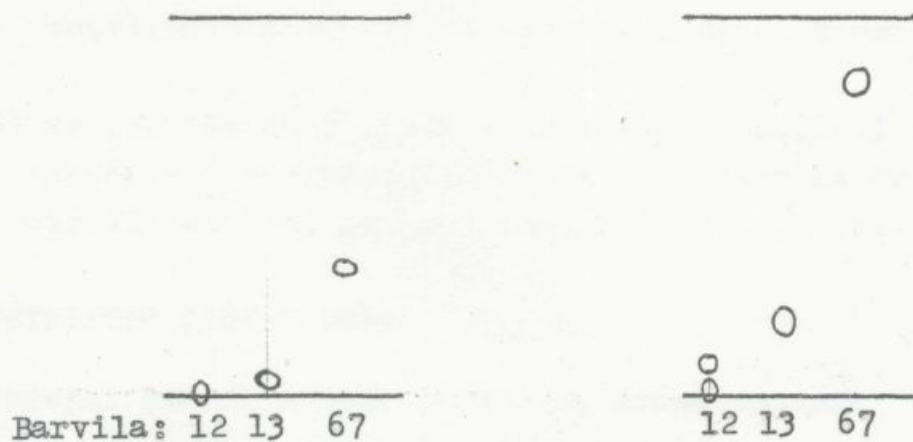


Kromatogram št. 53

m.f.: a) tetraklorogljik

b) trikloretilen

adsorbent: silikagel G



Preiskusil sem tudi zmesi: petroleter : CHCl_3 1:1

CCl_4 : CHCl_3 4:1,

vendar je dobro ločila barvila le slednja. Drugih zmesi nisem preiskušal, ker se barvila zadovoljivo ločijo že z aromatskimi ogljikovodiki in trikloretilenom. Pričakujem pa, da bi zmesi teh topil dale veliko možnosti za razne kombinirane ločitve, zlasti še, če bi jim korigiral lastnosti z manjšimi količinami cikloheksana, tetraklorogljika, kloroforma ali metilenklorida.

POVZETEK:

- a) za ločitev na hidrofobnem papirju so najbolj primerne mobilne faze, ki so našteje na str. 170.
- b) za ločitev na papirju impregniranem z dimetilformamidom so najbolj primerne naslednje mobilne faze:
- | | |
|--|----------|
| petroleter, cikloheksan | |
| petroleter:tetraklorogljik:dimetilformamid | 50:10: 2 |
| cikloheksan:kloroform:dimetilformamid | 80:10: 2 |
- c) impregnacija papirja s perlonom in etanolaminom se ni obnesla. Etanolamin je bolje uporabiti že pred kromatografije za ločitev barvil s prostimi OH skupinami od ostalih, nato pa vsako skupino posebej kromatografirati.
- č) za ločitev na plasteh silikagela so najbolj uporabni aromatski ogljikovodiki, zlasti benzen in toluen ter trikloretilen, pa tudi zmes CCl_4 : CHCl_3 4:1.

POTRDITEV IDENTITETE:

Pomagal sem si z lego barvil na kromatogramih
z reakcijami na barvilih
s spektrofotometrijo
primerjaj str. 133, 194, 201.

4) Pigmentna barvila

- | | |
|-------------------|--------------------------|
| 38) Flaming Red | 79) Tinofilbrilliantblau |
| 39) Toluidine Red | 80) Pigmentblau 4 |
| 63) Hansa Yellow | 83) Tinofilbrilliantgrün |

O kromatografiji pigmentnih barvil nisem zasledil v literaturi nobenih podatkov, zato sem si pomagal le s podatki o njihovi topnosti (glej tabelo št. 4).

Ugotovil sem:

- 1) ftalocianinski pigmenti se nekoliko topijo v kinolinu in precej v H_2SO_4 conc.

Pri kromatografiji na papirju in silikagelu jih kinolin ne premakne s starta.

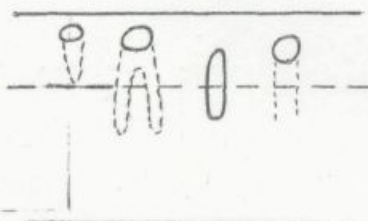
S H_2SO_4 na silikagelu sicer potujejo - zelo blizu fronte in zelo počasi - vendar je ta kromatografija zelo problematična. Lise barvil se na kromatogramu ne vidijo, dokler kisline ne razredčimo z vodo - tedaj pa se silikagel lušči in odpada. Kljub temu sem uspel dobiti kromatogram, ki je prikazan v naravni velikosti.

Kromatogram št. 54

m.f.: H_2SO_4 conc.

adsorbent: silikagel G

čas: 3 ure



pod to višino je SiO_2 v
glavnem odpadel

Barvila: 79 80 82 83

2) Pigmentna azo barvila se odlikujejo po tem, da se ne topijo v alifatskih ogljikovodikih, se zelo slabo topijo v estrih in alkoholih ter se ne topijo v vodi. Pač pa se sorazmerno dobro topijo v kloroformu in metilenkloridu. Iz tega je mogoče sklepati, da celuloza ne bo uporaben adsorbent, niti taka kot je niti če jo napravimo hidrofobno, ker barvila niso topna ne v prvem, ne v drugem mediju.

Edino impregnacija s poliamidi bi zaradi tvorbe vodikovih vezi med amidnimi skupinami adsorbenta in nitro ter OH skupinami barvila omogočila nekatere ločitve.

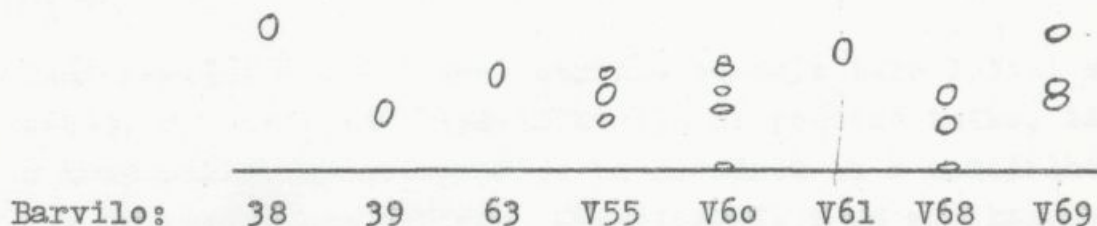
S poskusi sem se prepričal, da so bile te predpostavke v glavnem točne, le da se tudi impregnacija s poliamidi ni obnesla, ker nisem mogel najti mobilne faze, ki bi dala zadovoljivo oblikovane lise ne da bi jih pri tem vlekla s fronto ali pa pustila na startu.

Na ploščah, premazanih s silikagelom so se ta barvila obnašala podobno kot v maščobah topna barvila. Najbolj uporabni čisti topili sta benzen in trikloretilen, pa tudi zmes $\text{CCl}_4:\text{CHCl}_3$ 4:1 je dala dober rezultat. Tudi nekatera druga barvila, ki njihovih vzorcev sicer nisem imel, a sem jih izoliral iz raznih izdelkov, so dala pri kromatografiji na silikagelu G (mobilna faza benzen) lepo oblikovane dokaj ostro omejene lise. Nekatera rumena in oranžna barvila so bila nagnjena okoli lise barvila Hansa Yellow (št. 63), iz česar bi lahko sklepali na slično zgradbo barvil, ki je tudi značilna za barvila iz skupine Hansa (kr. št. 55).

Kromatogram št. 55

m.f.: benzen

adsorbent:silikagel



V - vzorec

55 - puder

60 - lak za nohte

61 - lak za nohte

68 - šminka

69 - šminka

P O V Z E T E K

Obdelal sem kromatografijo naslednjih barvil:

- 1) kisljih v vodi topnih in barvil za lake (str. 98 do 152)
- 2) kisljih ksantenskih (str. 153 do 163)
- 3) bazičnih v vodi topnih (str. 164 do 168)
- 4) v maščobah topnih (str. 168 do 179)
- 5) pigmentih (str. 180 do 182)

Za vsako skupino sem podal kromatografske sisteme, za katere smatram, da so za njihovo ločitev najbolj ugodni.

Od kisljih barvil, topnih v vodi je problematična ločitev barvil Ponceau 2R in Ponceau 3R, ker sta si zelo podobni

in ker sta obe zmes različno metiliranih barvil, od katerih nekatera vsebujeta obe. Ostala barvila je mogoče ločiti na papirju ali na silikagelu.

Kisla ksantenska barvila, zlasti tista z več halogeni, imajo po več spremljajočih barvil, zato je identifikacija vsake lise skoraj nemogoča, identifikacija glavnih lis pa ni posebno težka. Ločiti se jih da na papirju z alkalnimi vodnimi mobilnimi fazami, na silikagelu G pa s kislimi brezvodnimi mobilnimi fazami.

Tudi bazična v vodi topna barvila se dajo tako ločiti med seboj, da nadaljnja identifikacija ni posebno težka, in to s kombinacijo kromatografije na navadnem in s cetilalkoholom impregniranem papirju. Kromatografija na silikagelu je za njihovo medsebojno ločitev manj primerna, za določanje spremljajočih barvil pa je zelo uporabna.

V maščobah topna barvila sem ločil na papirju impregniranem s parafinskim, silikonskim oljem, dimetilformamidom, pa tudi na acetiliranem papirju. Pri tenkoplastni kromatografiji sem uporabljal silikagel G in tudi tu so se barvila dobro ločila.

Pigmenta azo barvila sem uspešno kromatografiral na tankih plasteh silikagela, kjer so se obnašala podobno kot v maščobah topna barvila.

Za ločitev ftalocianinskih pigmentov nisem dobil zadovoljivega postopka, čeprav kromatografija s H_2SO_4 conc. na silikagelu G nakazuje tudi to možnost.

Za identifikacijo v vodi topnih barvil sem že opisal enega od uporabljenih sistemov, ki velja tudi za večino ostalih barvil, seveda le, če uporabimo barvilom primerne kromatografske sisteme.

E L E K T R O F O R E Z A

V literaturi je bilo objavljenih več člankov o elektroforezi v vodi topnih barvil. Pri tem so uporabljali različne pufre: vodne (2, 26, 28, 29, 72, 96) in alkoholne (3, 141, 142) z različnimi pH-vrednostmi in to na papirju (2, 3, 26, 29, 72, 96) in anorganskih adsorbentih (28, 29, 141, 142).

Ker niso objavili podatkov o vseh barvilih, ki so me zanimala, sem tudi sam uporabil to tehniko. Izbral sem pufre, od katerih sem glede na ugotovitve raznih avtorjev pričakoval, da mi bodo omogočili najlepše ločitve mojih barvil. Njihove pufre sem dopolnil z nekaterimi močno alkalnimi pufri, ki sem jih pripravil po lastni presoji.

Pri svojem nadaljnjem delu sem hotel primerjati ločitev, ki nam jo nudi kromatografija z ločitvijo s pomočjo elektroforeze. S to ločitveno tehniko, ki sem jo preiskoval na aparatu IEV - Ljubljana MA 8901, z možno regulacijo napetosti od 50 do 250 V in jakosti toka od 0 do 25 mA, sem opravil celo vrsto poskusov.

Na suh papir Whatman 2 z velikostjo 35 x 17 cm sem nanašal barvila takole: po 7 cm od roba papirja sem v vrsti z medsebojno razdaljo 1 cm nanašal po 2 do 5 μ l 0,1 % raztopine barvil in jih posušil na zraku. Papir sem nato omočil v kadi s pufrom tako, da je ostal na obeh straneh barvil 0,5 do 2 cm širok suh pas in ga postavil v aparat. Puffer je potem prodiral proti barvilom z obeh strani. Običajno sta se obe fronti srečali tik ob startni črti in pogosto stisnile lise barvil v ozek pas. Nekaj trenutkov za tem sem vključil najvišjo napetost, ki sta jo dovoljevala prevodnost raztopine in aparat.

1) Kisla v vodi topna barvila

Največkrat sem uporabljal barbituratni pufer s pH 8,6, za primerjavo pa še: 0,05 n NaOH s pH = 12,7, 0,05 n oksalno kislino s pH = 2,1, 0,02 n acetatni pufer s pH = 4,67 glej elektroferograme št. 1, 2, 4.

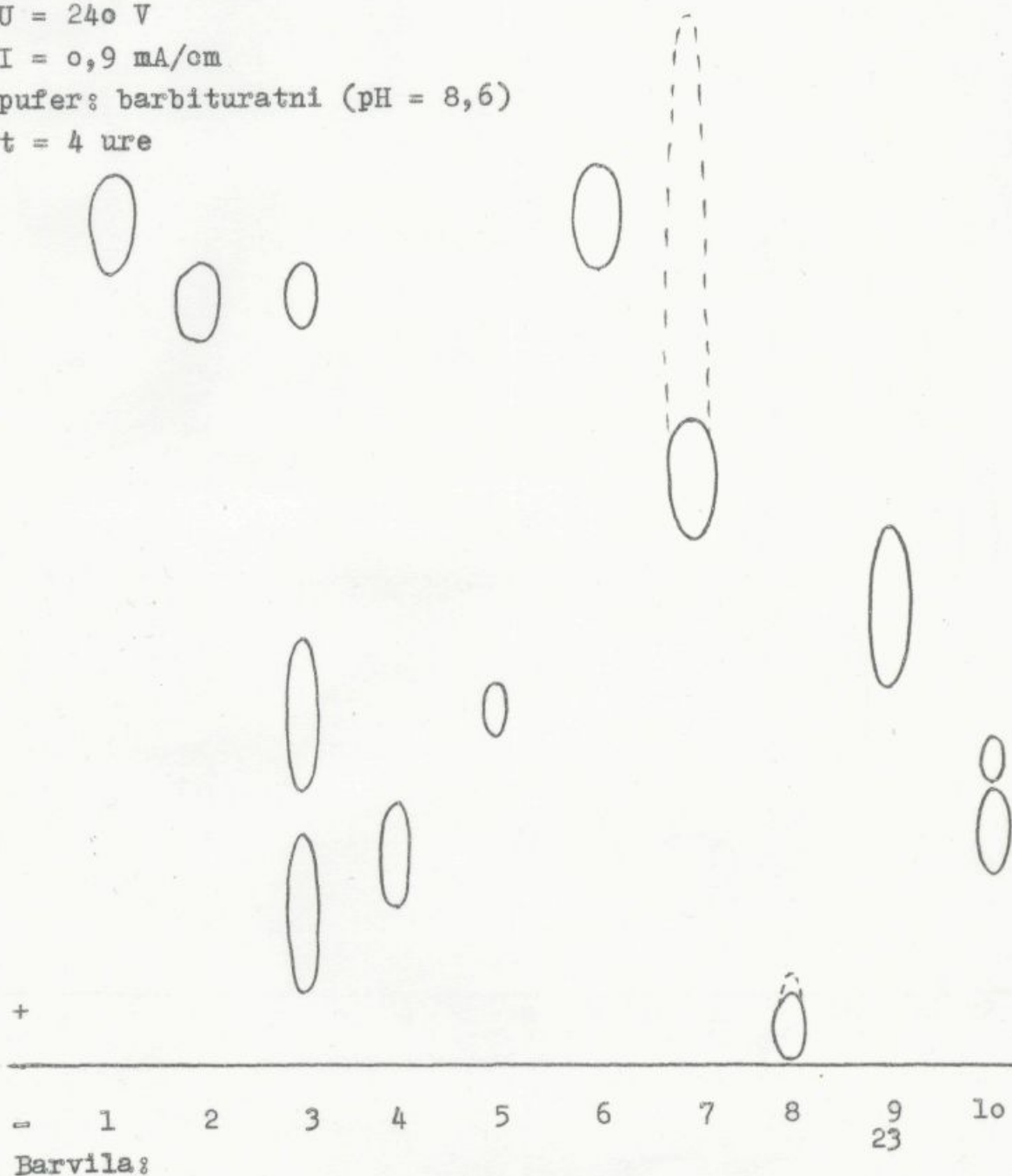
Elektroferogram št. 1

U = 240 V

I = 0,9 mA/cm

pufer: barbituratni (pH = 8,6)

t = 4 ure



Barvila:

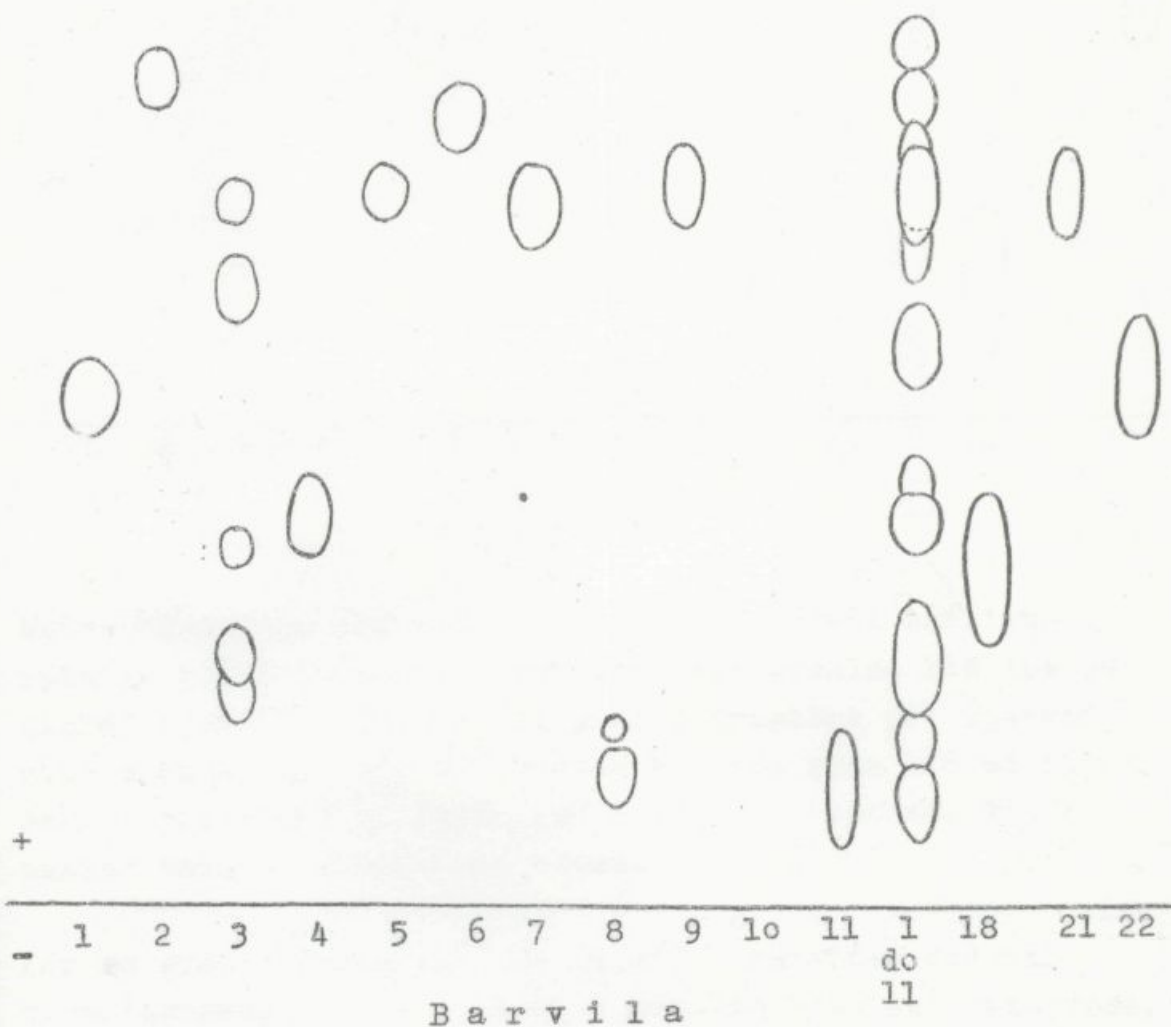
Elektroferogram št. 2

U = 190 V

I = 0,7 mA/cm

pufer: 0,05 n NaOH (pH = 12,7)

čas = 2 uri



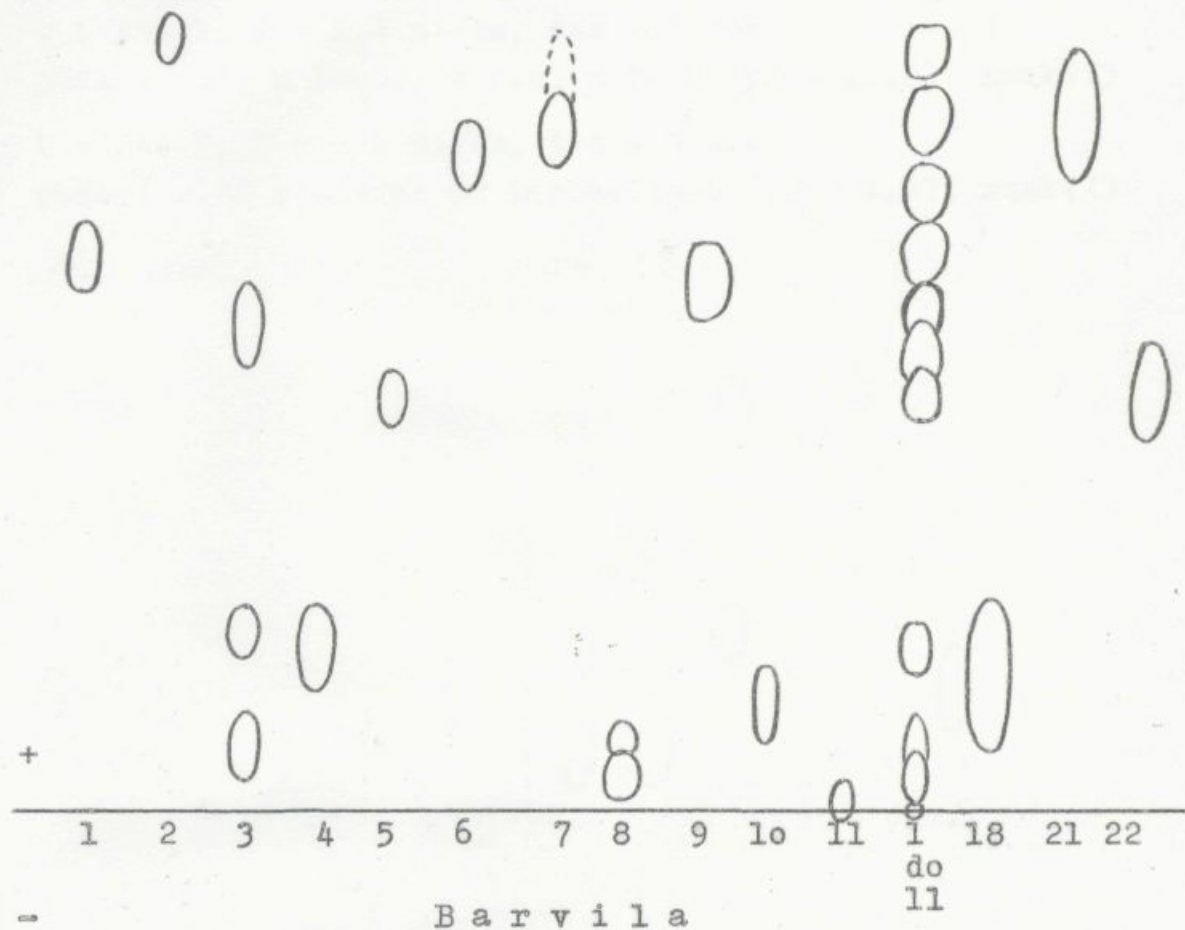
Elektroferogram št. 3

U = 130 V

I = 1,4 mA/cm

pufer: 116 ml 0,1 n NaOH + 5,0 g KCl/l (pH = 12,1)

čas = 3 ure



Medsebojna lega živilskih barvil pri uporabi barbitu-
ratnega pufera in acetatnega pufera ter oksalne kisline je
skoraj identična, pač pa je precej drugačna pri uporabi
0,05 n NaOH (el. št. 2), medtem ko daje zmes 116 ml 0,1 n
NaOH + 5,0 g KCl na liter (pH = 12,1), razpored, ki je
nekako vmesna stopnja med obema.

Ker so elektroferogrami teh barvil v marsičem podobni
kromatogramom, ki jih dobimo z mobilno fazo sol:baza:voda,
sem za primerjavo sestavil "pufer": 16,1 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
in 100 ml 0,1 n NaOH na liter (pH = 12,0) in primerjal med

seboj kromatogram, razvit z zmesjo Na_2SO_4 :amonijak:voda 2:20:80 ter elektroferogram, ki sem ga dobil s pomočjo omenjenega "pufra".

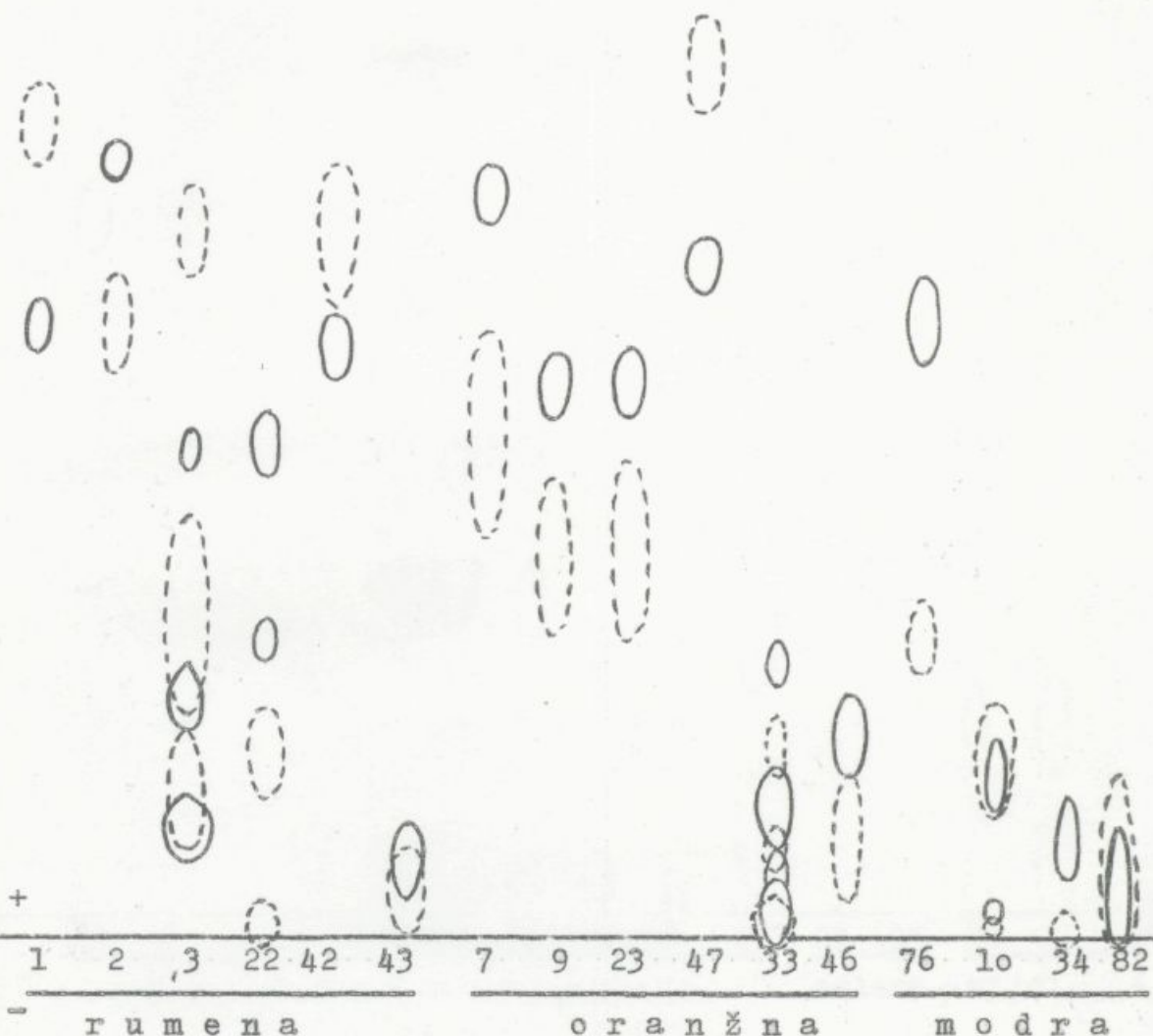
Elektroferogram št. 4 a)

U = 150 V, I = 1,4 mA/cm, čas = 3 ure

puffer: 0,05 n Na_2SO_4 v 0,01 n NaOH (pH = 12,0) znak: ○

U = 240 V, I = 0,2 mA/cm, čas = 3 ure

puffer: 0,02 n acetat po Michaelis-u (pH = 4,67) znak: ⊙



Elektroferogram št. 4 b)

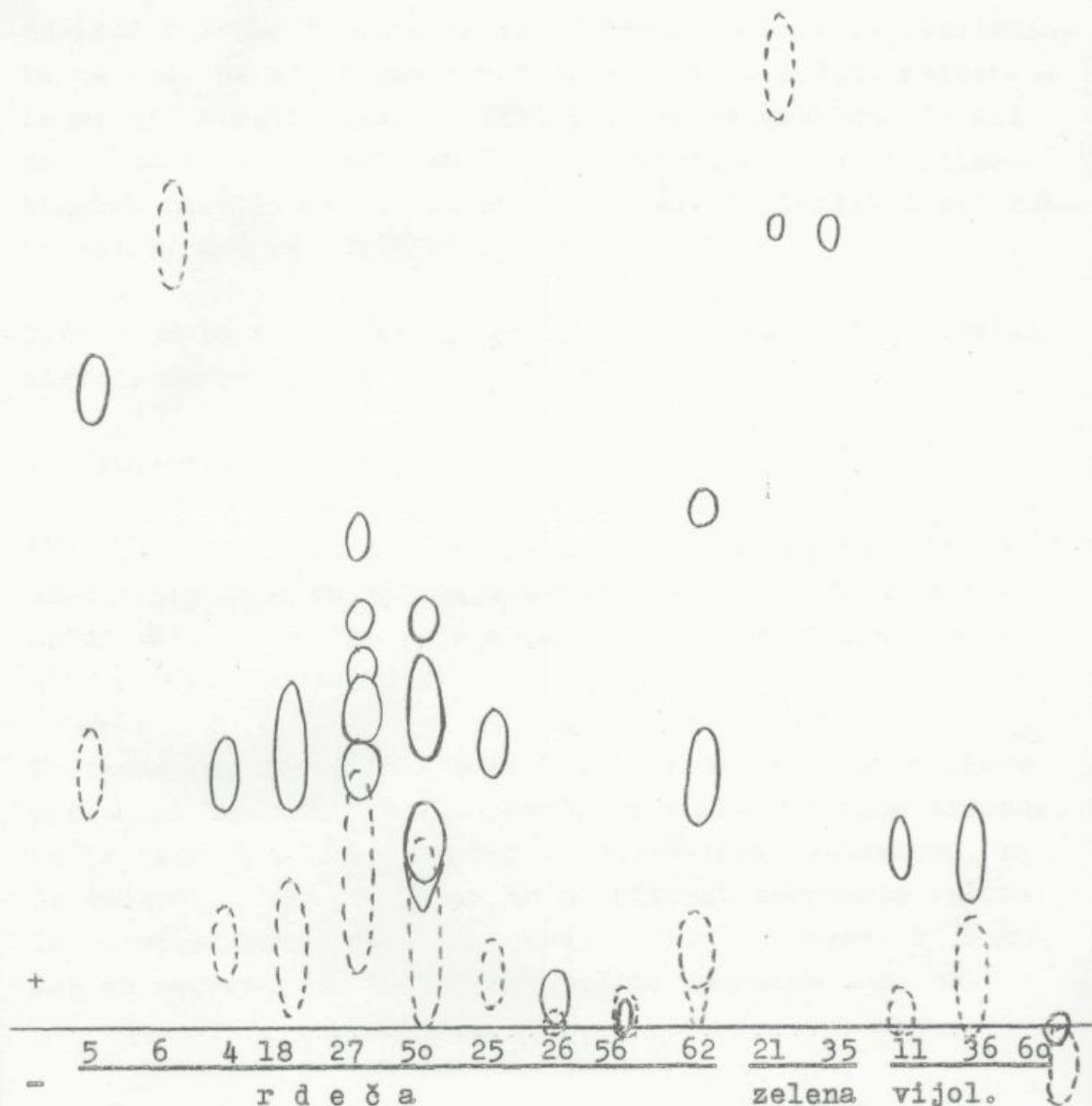
U = 150 V, I = 1,4 mA/cm, čas = 3 ure

pufer: 0,05 n Na_2SO_4 v 0,01 n NaOH (pH = 12,0) znak: O

U = 240 V, I = 0,2 mA/cm, čas = 3 ure

pufer: 0,02 n acetat po Michaelis-u (pH = 4,67) znak: ()

Elektroferogram št. 4 b)



Medsebojna lega rumenih barvil je pri obeh - z izjemo barvila Naphtholgelb S - identična. Izjemo je mogoče razložiti s tem, da pride dipolni moment nitro skupin pri elektroforezi bolj do izraza in zato to barvilo nekoliko hitreje potuje. Medsebojna lega oranžnih barvil je praktično enaka, prav tako tudi lega rdečih barvil, le da slednja potujejo v primerjavi z oranžnimi pri elektroforezi hitreje kot pri kromatografiji.

Ločitvi modrih, zelenih in vijoličastih barvil se razlikujeta po tem, da pri kromatografiji ni mogoče ločiti medsebojizomernih (Light Green SF Yellowish in Patentblau AE) ali zelo podobnih (Patentblau VF in Patentblau V) trifenilmetanskih barvil, medtem ko so se pri elektroforezi dokaj dobro ločila med seboj.

Težava je le v tem, da se barvilo Light Green SF Yellowish pogosto razbarva.

2) Ksantenska barvila

Pri uporabi kislih pufrov ostanejo na startu; pri uporabi alkalnih pufrov se gibljejo dokaj počasi, ločitev je podobna oni, ki jo dobimo z alkalnimi solnimi fazami (glej elektroferogram št. 5).

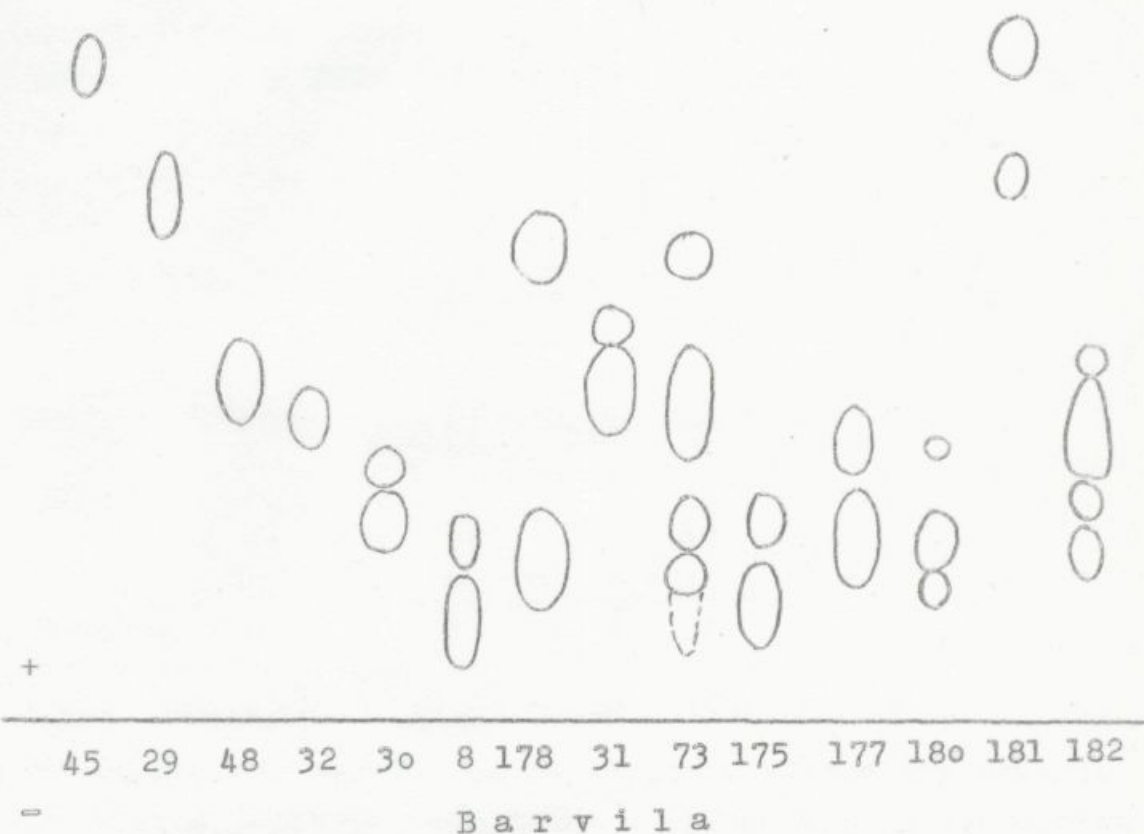
V alkoholnem puftru (0,1 n NaOH v 50 % etanolu) so njihove potovalne hitrosti skoraj popolnoma enake. Iz tega sklepam, da je dodatek alkohola porušil adsorpcijski mehanizem, ki je omogočil ločbo, tako da so na hitrost potovanja vplivale le malenkostne razlike v razporeditvi nabojev, ki nikakor ne zadostujejo za kolikor toliko uporabno ločitev.

Elektroferogram št. 5

U = 150 V, I = 1,4 mA/cm

pufer: 0,05 n Na_2SO_4 v 0,01 n NaOH (pH = 12,0)

čas: 6 ur



3) V maščobah topna barvila in pigmentna azo barvila

Vsa ta barvila imajo fenolne, nekatera pa tudi nitro skupine, zato sem predvideval, da bodo v močno alkalnem mediju disociirala in s tem postala sposobna za elektroforetsko ločitev.

V maščobah topna barvila sem poskušal ločiti, ko sem uporabil pufer 0,05 n NaOH (pH = 12,7) in sem ugotovil, da barvili s prostima OH-skupinama (Sudanorange G in Sudanbraun B) potujeta dovolj hitro da ju je mogoče od ostalih

barvil, ki so ostala na startu. Prav tako je mogoče ugotoviti iz katerih spremljajočih barvil sta sestavljeni.

Elektroferogram št. 6

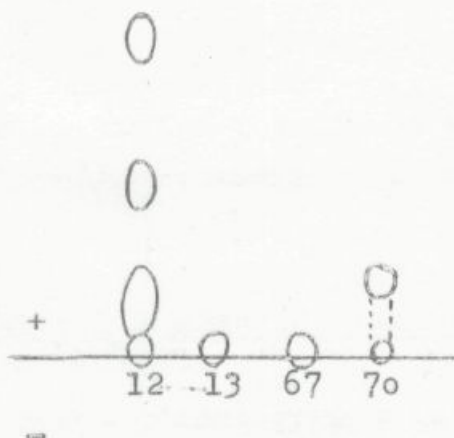
U = 190 V

I = 0,7 mA/cm

puffer: 0,05 n NaOH (pH = 12,7)

čas: 2 uri

Barvila:



Pigmentna azo barvila se ne topijo v nevtralnem etanolu in acetonu, pač pa zelo dobro v alkoholnem in acetonskem KOH. Iz tega sem sklepal, da bi bila kot puffer primerna tudi ena od teh raztopin, zlasti acetonska, ker je aceton bolj polaren.

Pigmentna in v maščobah topna barvila sem poskušal ločiti z elektroforezo s pufrom, sestavljenim iz 0,1 mola KOH, 800 ml acetona, 300 ml vode.

Rezultat je bil precej slab. Pigmentna barvila so ostala na startu. V maščobah topna barvila s keliranimi OH-skupinami je tok topila odnesel proti katodi in se niso ločila med seboj. Le barvili Sudanorange G in Sudanbraun B sta potovali proti anodi, vendar so bile njune lise izredno difuzne.

Povzetek:

Za elektroforezo kislih v vodi topnih barvil so uporabni tako kisli, kot alkalni pufri. Ločitev barvil je podobna kot pri kromatografiji z mobilno fazo: sol:amonijak:voda.

Kisla ksantenska barvila potujejo le v alkalnih pufrih. V vodnih pufrih, kjer deluje tako zvani izsoljevalni adsorpcijski mehanizem se dobro ločijo med seboj, čeprav je potrebno zato precej časa. V alkoholnih pufrih, kjer tak mehanizem ne pride do izraza, potujejo skoraj vsa enako hitro.

Od barvil, ki se ne topijo v vodi, je mogoče s to tehniko analizirati le barvili Sudanorange G in Sudanbraun B.

Identifikacija barvil s pomočjo elektroforeze:

Potem, ko smo s prvim kromatogramom (glej str. 133) ugotovili, katera barvila so najbolj verjetno prisotna, lahko dobimo nove podatke o sestavi zmesi tudi s pomočjo elektroforeze. Identiteto barvil lahko potrdimo z reakcijami (str. 201) ali pa s primerjanjem absorpcijskih spektrov (str. 194).

SPEKTROFOTOMETRIJA

Tudi s spektrofotometrijo so si pri analitiki barvil pomagali številni avtorji. Pri tem so uporabljali ultravijolno (75, 196), vidno (14, 26, 66, 67, 76, 90, 120, 139, 177, 196, 197) in infrardečo (135, 196) spektromotometrijo in sicer za barvila topna v vodi in v maščobah. V vodi topna barvila so topili v: 0,1 n HCl, v različno koncentriranem amonacetatu, 0,1 n NaOH pa tudi v drugih pufrih, v maščobah topna barvila pa v alkanih, kloriranih ogljikovodikih, alkoholih itd.

Ugotovili so:

Zaradi svojih lastnosti je ta metoda uporabna za potrditev identitete čistih barvil; za analizo zmesi pa le v izjemnih primerih (dovolj velike razlike v adsorpcijskih maksimumih).

Veliko barvila ima v vidni svetlobi maksimum pri skoraj isti valovni dolžini, zato je treba posneti spektre tudi v UV ali celo v IR območju; primerjati je treba spektre posnete v več različnih topilih in pri različnih pH-vrednostih.

Moje ugotovitve:

Spektrofotometrov, ki bi bili uporabni v vseh treh območjih, laboratoriji, ki se ukvarjajo z analitiko živil in predmetov splošne rabe, nimajo, pač pa le aparate za meritve v vidnem območju.

Na drugi strani pa sem z aparativno mnogo manj zahtevnima metodama kromatografijo in elektroforezo dobil precej podatkov o obnašanju barvil, ki lahko služijo za dokaj zanesljiva izhodišča za identifikacijo. Poleg tega ti dve metodi omogočita ugotoviti prisotnost manjših količin drugih barvil, ki jih s pomočjo spektrofotometrije ni mogoče ugotoviti. Zato sem spektrofotometrijo uporabljal le za potrditev identitete barvila, ki sem ga predhodno ločil od

ostalih z eno izmed omenjenih metod.

Spektrofotometrična potrditev identitete barvila je zelo ugodna v primeru, ko imamo opravka z enim samim barvilom. V takih primerih, ko sem predhodno s pomočjo kromatografije ugotovil, da je prisotno samo eno barvilo, sem posnel absorpcijski spekter ekstrakta iz izdelka in ga primerjal s spektrom čistega barvila.

Med tem, ko so drugi avtorji posneli spektre v vodi topnih barvil le v vodni ali alkoholni raztopini, sem uporabil pri svojem delu bolj prikladen način.

Najbolj univerzalen postopek za izolacijo kislih, v vodi topnih barvil je postopek s kationskimi detergenti in kloroformom (glej str. 84), zato sem posnel spektre teh barvil v kloroformski raztopini. Ko sem preiskoval izolacijo barvil po tem postopku, sem ugotovil, da v najmanj ugodnem slučaju lahko dosežem tako koncentracijo barvila, da je ekstinkcija pri λ_{\max} nad 0,1, običajno pa od 0,3 naprej (izolacija iz 20 g ali ml izdelka v 5 ml kloroform). Da bi lahko uporabil podatke, tudi če je v ekstraktu tako malo barvila, sem raztopine čistih barvil pred merjenjem tako razredčil, da sem pri merjenju dobil ekstinkcije pod 1,0.

λ_{\max} , dobljene na ta način, so navedene v tabeli št. 4. Vse meritve sem izvršil na aparatu Beckman B s kiveto 1 cm.

Kot primer, kako sem s pomočjo spektrofotometrije ugotavljal identičnost barvil, naj navedem analizo esence za pravo domačega ruma in sladoleda, ki mu je bila verjetno primešana malinova esenca.

Iz sladoleda sem izoliral barvila po postopku s kloroformom (str. 84) in posnel absorpcijski spekter ekstrakta. Potem sem barvila izgnal iz kloroforma v vodo, jih kromatografiral, eluiral lisi s kromatograma in posnel absorb-

cijska spektra obeh eluatov.

Rumova esenca je dovolj čista in koncentrirana, tako da sem jo lahko direktno kromatografiral. Posnel sem absorpcijske spektre razredčene esence in raztopin, ki sem jih dobil s tem, da sem barvila eluiral s kromatogramov.

Postopek:

Na dva lista papirja (Whatman 3 MM) sem nanese po nekaj μ l vodne raztopine barvil in kromatografiral z mobilnima fazama:

terc. Na citrat:amonijak:voda	2:20:80
metiletilketon:aceton:voda	5: 2: 2

Po barvi in legi lis sem sklepal, da so prisotna naslednja barvila:

rumova esenca: Tartrazin, Cochenillerot A, Gelborange S, Brilliantschwarz BN

malinov sladoled: Azorubin S, Cochenillerot A

Na nov list sem nanese v obliki 10 cm dolge črte po 60 μ l vsake raztopine. Kromatograma sem razvil z mobilno fazo: metiletilketon:aceton:voda 5:2:2.

Za 15 cm dolgo pot je mobilna faza porabila 1 uro. Kromatograma sem posušil na zraku, izrezal obarvane proge in eluiral barvila s po 5 ml 30 % etanola z navzdolno tehniko. Posnel sem absorpcijske spektre eluatov in ugotovil, da so λ_{max} iste kot pri čistih barvilih. Barvila so torej identična.

Na naslednjih straneh sem prikazal kromatograma, s katerimi sem ugotovil, katera barvila so v zmesih najbolj verjetno prisotna, absorpcijske spektre čistih barvil, s katerimi so bila obarvana živila, ki so bila zadnjih nekaj let pri nas v prodaji, absorpcijske spektre zmesi barvil, izoliranih iz obeh izdelkov ter absorpcijske spektre barvil, eluiranih s kromatogramov.

Tudi za identifikacijo ostalih barvil je ta postopek prav tako primeren, uporabljati je treba le barvilo odgovarjajoč kromatografski postopek in eluiranje.

Kromatogram št. 56

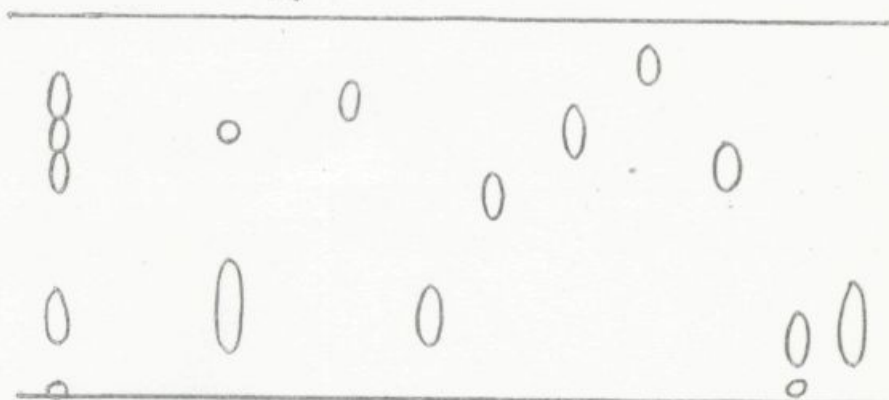
a)
m.f.: terc. Na citrat:amonijak:voda 2:20:80
papir: Whatman 3 MM

b)
m.f.: metiletilketon:aceton:voda 5:2:2
papir: Whatman 3 MM

Barvila: iz esence, sladoleda

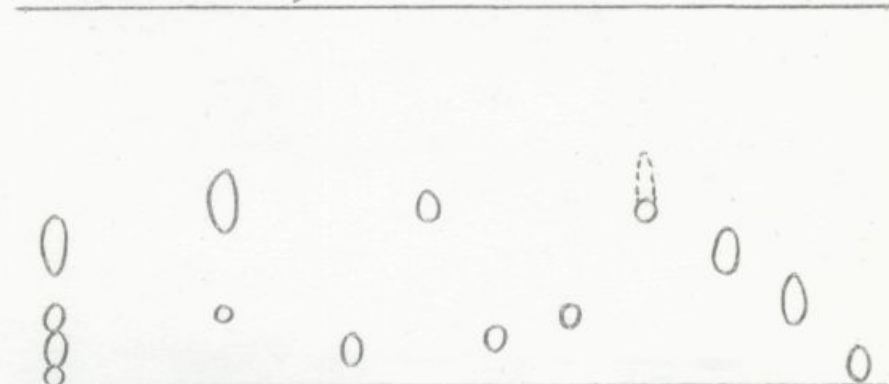
čista barvila: Tartrazin, Azorubin S, Amaranth,
Cochenillerot A, Scharlach GN,
Gelborange S, Indigotin IA,
Brilliantsschwarz BN

a)



Barvila: rum sladoled 2 4 5 6 7 9 10 11

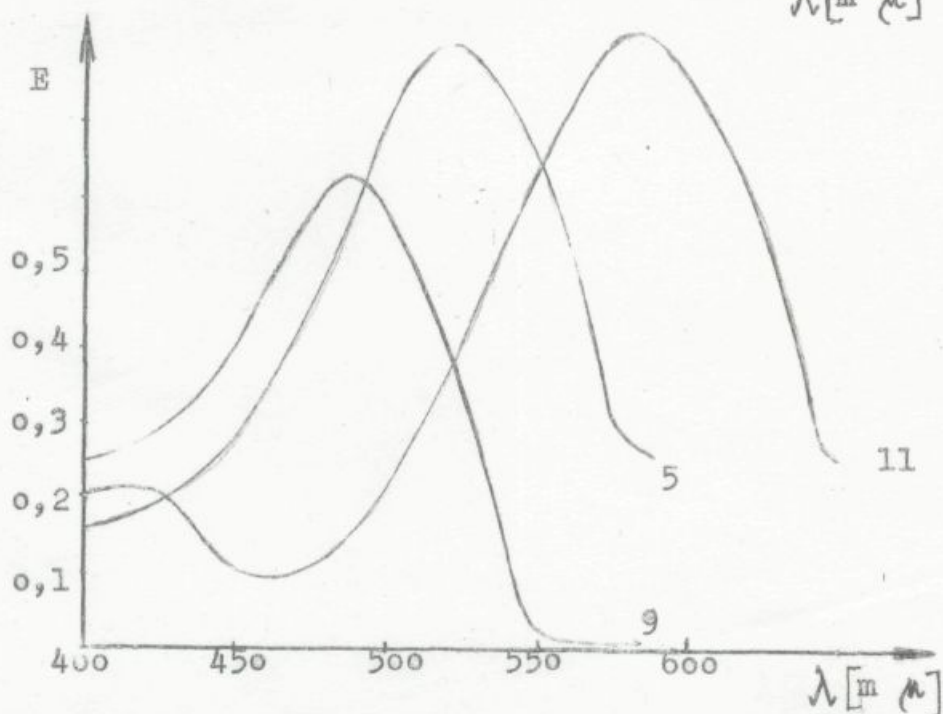
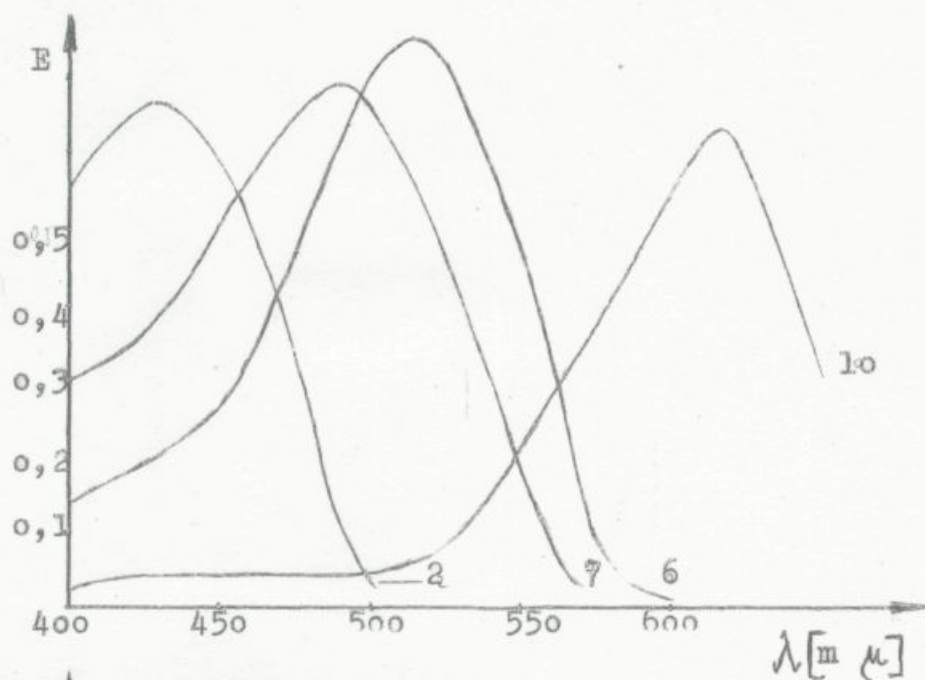
b)



Barvila: rum sladoled 2 4 5 6 7 9 10 11

ABSORBCIJSKI SPEKTRI ČISTIH BARVIL V 30 % ETANOLU

Barvila: 2 - Tartrazin	λ_{\max} / m μ /	430
6 - Cochenillerot A		515
7 - Scharlach GN		490
10 - Indigotin IA		615
5 - Amaranth		522
9 - Gelborange S		486
11 - Brilliant Schwarz BN		580

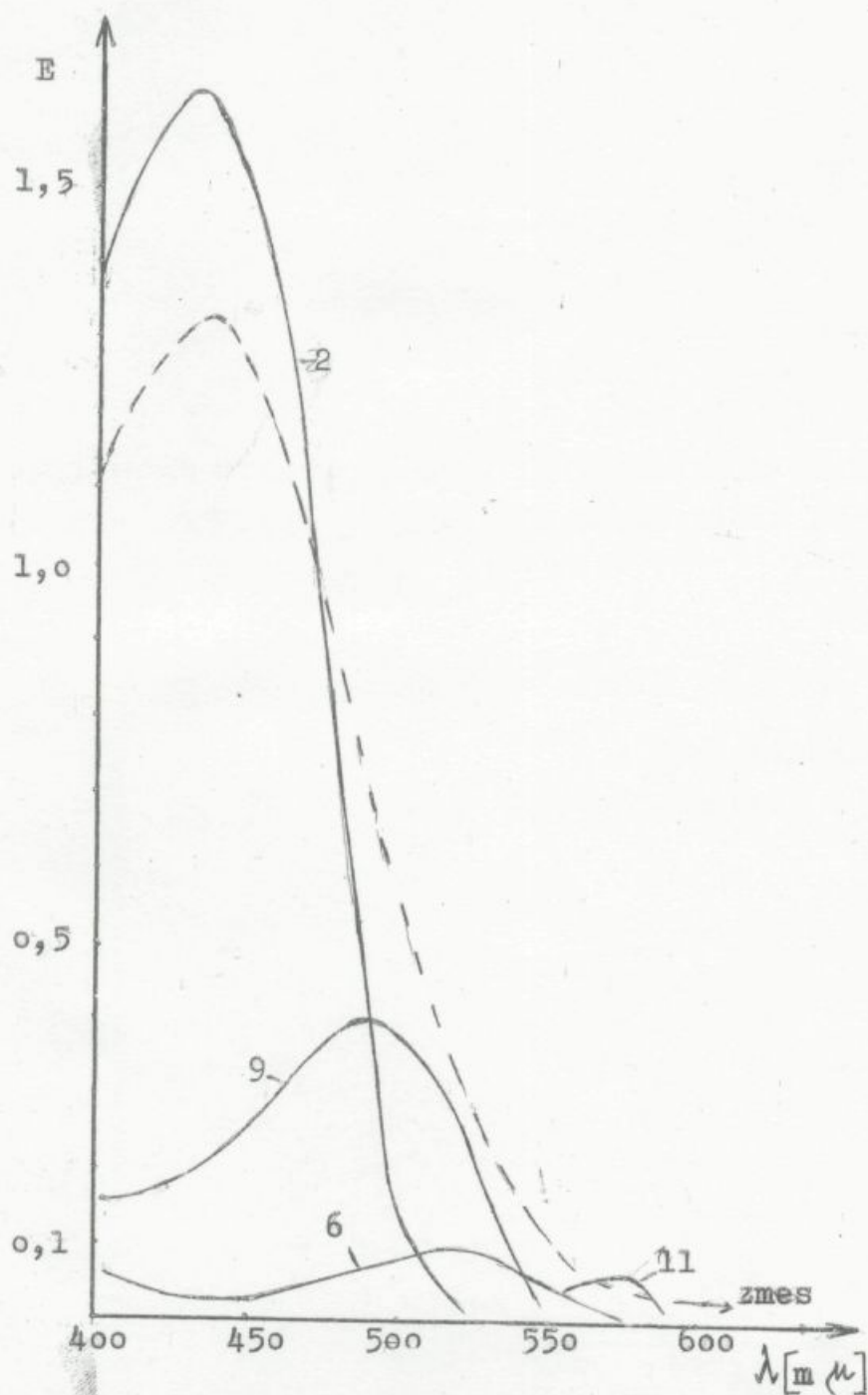


ABSORBCIJSKI SPEKTRI RUMOVE ESENCE IN BARVIL, KI SEM JIH
IZOLIRAL IZ NJE

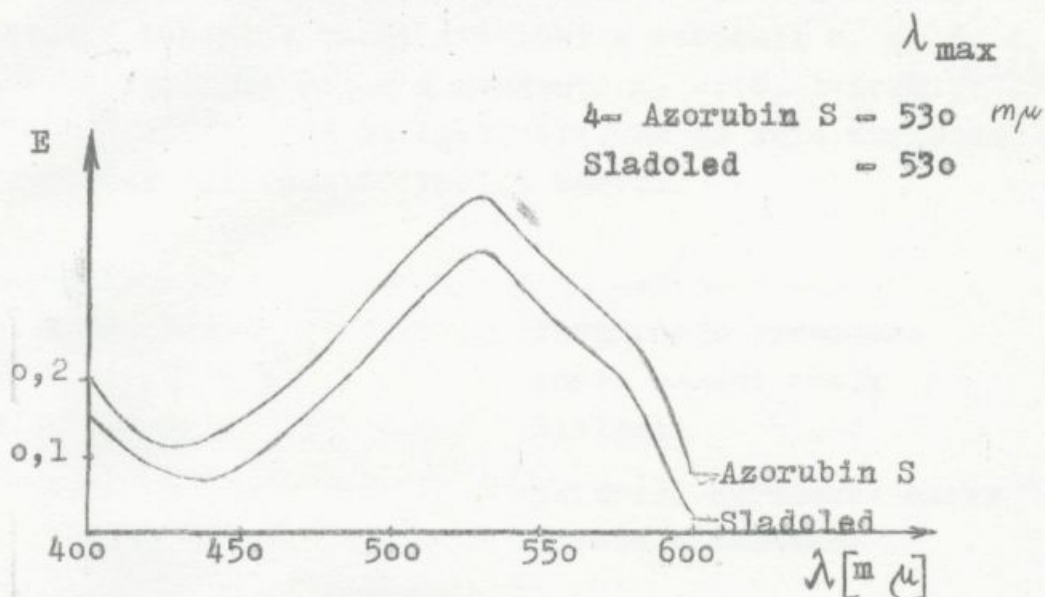
Kromatografiral sem 60 μ l esence

Lise sem eluiral s po 5 ml 30 % alkohola

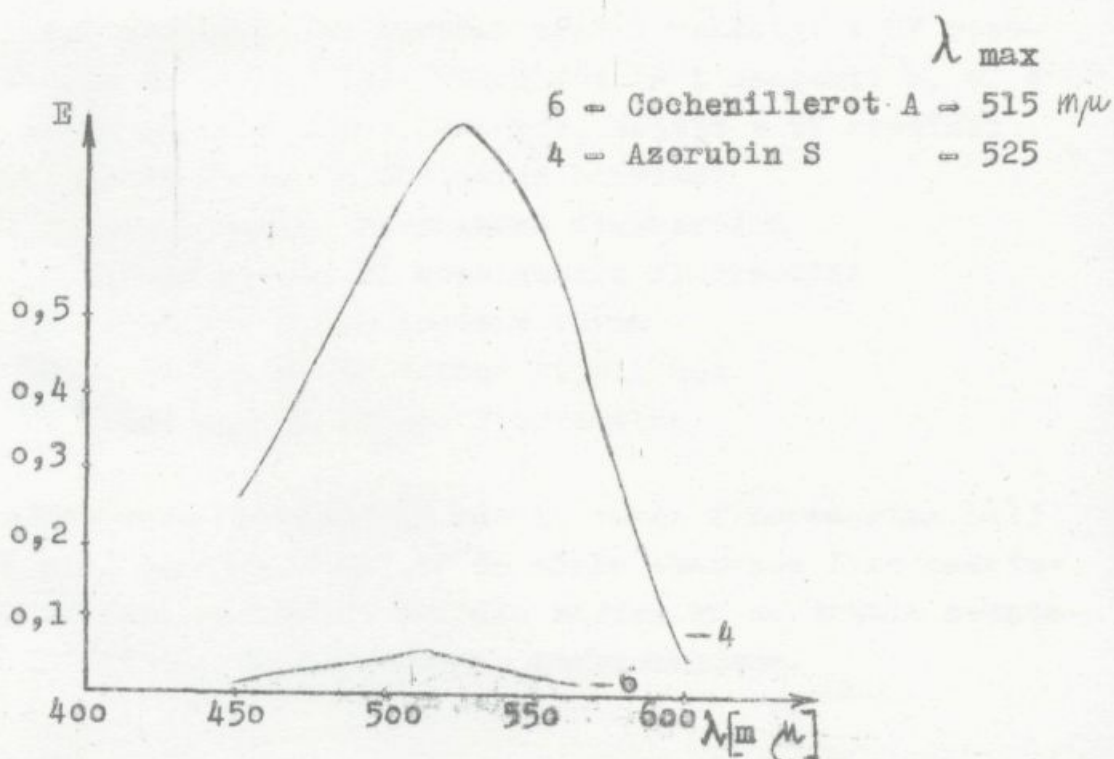
Barvila: 2 - Tartrazin	λ_{max} / m μ /	430
6 - Cochenillerot A		515
9 - Gelborange S		486
11 - Brilliant Schwarz BN		580



ABSORBCIJSKI SPEKTER Kloroformskega ekstrakta spojin
barvil za asepsolom iz malinovega sladoleda



ABSORBCIJSKI SPEKTER BARVIL, IZOLIRANIH IZ SLADOLEDA,
PO KROMATOGRAFSKI LOČITVI IN ELUIRANJU S 30 % ETANOLOM



REAKCIJE BARVIL NA KROMATOGRAMIH

V literaturi so objavljeni podatki o reakcijah mnogih od naštetih barvil v vidni svetlobi z reagenti a, c, č, d, e, v UV svetlobi pa le z reagenti a, c, č. Avtorji (143, 152, 172, 208, 211) so ugotovili, da so zelo koristen pripomoček pri identifikaciji barvil.

Reagenti:

- | | |
|---|---|
| a) H_2SO_4 conc. | Povzročajo spremembo |
| b) H_2SO_4 (1 + 3) | barve zaradi svoje |
| c) HCl conc. | kislosti |
| č) NaOH 10 % | povzroči spremembo barve |
| | zaradi alkalnosti |
| d) nasičena razt. $SnCl_2$
v HCl conc. | reducira azo, nitrozo in |
| e) nasičena razt. $Na_2S_2O_4$
v NaOH 5 % | nitro skupine v odgovar-
jajoče amine v kislem oz.
alkalnem |
| f) nasičena razt. $(NH_4)_2S_2O_8$
v H_2SO_4 (1 + 3) | oksidira barvila |

V vidni svetlobi sem izvedel vseh 7 reakcij. V UV svetlobi sem dobil uporabne rezultate le z reagenti b, c, č in e. Po dodatku raztopine $SnCl_2$ dajejo v UV svetlobi značilne reakcije le naslednja barvila:

- št. 3 Chinolingelb, ki oranžno fluorescira
- 10 Indigotin IA, ki svetlomodro fluorescira
- 56 Litholrot R, ki postane rumen
- 62 Violamine R, ki ostane vijoličast
- 74 Alizarin, ki zeleno fluorescira

Fluorescenca ksantenskih barvil razen fluoresceina bolj ali manj ugasne. Vidne so še slabo obarvane lise nekaterih trifenilmetanskih barvil, medtem ko so ostala nekatera hidrofobna barvila skoraj nespremenjena.

Tudi po dodatku $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ v H_2SO_4 (1 + 3) v UV svetlobi nisem opazil značilnih reakcij.

Opazil pa sem, da razkrojni produkti večine azobarvil, dobljeni z razklopom z $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{NaOH}$ v UV svetlobi značilno fluorescirajo, o čemer v omenjeni literaturi nisem zasledil nobenih podatkov.

Fluorescirajo razkrojni produkti večine barvil, ki so zgrajena iz naftalenovih derivatov.

Reakcije, kakor jih vidimo pri dnevni svetlobi so navedene v tabeli št. 9, uporabne reakcije, ki jih vidimo v UV svetlobi, pa v tabeli št. 10.

Te reakcije so po mojih izkušnjah za potrditev identitete barvila bolj ugodne kot spektrofotometrična določitev, čeprav je pri njih večja verjetnost, da bodo vmešane subjektivne napake.

Razlogi:

- 1) Izvršiti jih je mogoče na kromatogramu, na lisi, ki vsebuje premalo barvila za sprektrofotometrično določitev.
- 2) Barvila z zelo blizu ležečimi maksimi dajejo dostikrat zelo različne reakcije.
- 3) Reakcije na kromatogramu je mogoče izvršiti veliko hitreje kot pa eluirati posamezne lise z zadostnega števila kromatogramov, kar se zelo pozna pri analizi večjega števila vzorcev. Zanesljivost rezultatov je celo večja, saj uporabimo lahko na enem samem kromatogramu več bistveno različnih reakcijskih sistemov in vsako reakcijo posebej primerjamo z reakcijo na standardnem vzorcu barvila, ki ga je itak treba kromatografirati skupaj s preiskovanim vzorcem.

TABELA ŠT. 9

Reakcije barvil v vidni svetlobi

Št.	H ₂ SO ₄ conc.	H ₂ SO ₄ (1+3)	HCl conc.	NaOH 10 %	SnCl ₂ v HCl	Na ₂ S ₂ O ₄ /NaOH	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
1	opekastordeče	opekastordeč	rdeče	brez spr.	razbarva	razbarva	razbarva
2	malo spr.	malo spr.	malo spr.	malo spr.	razbarva	deloma razb.	deloma razb.
3	malo spr.	malo spr.	brez spr.	brez spr.	brez spr.	brez spr.	razb.
4	pomodri	brez spr.	malo spr.	temno roza	razbarva	delno razb.	delno razb.
5	pomodri	malo spr.	bolj temno	brez spr.	razbarva	razbarva	delno razb.
6	brez spr.	malo spr.	bolj temno	rjavooranž.	razbarva	razbarva	delno razb.
7	bolj rdeče	malo spr.	bolj rdeče	oranžno	razbarva	delno razb.	razbarva
8	oranžno	oranžno	oranžno	bolj intenz. rdeče	oranžno	brez spr.	razbarva
9	bolj rdeče	nek.temn.	bolj rdeče	bolj rjavo	razbarva	delno razb.	brez spr.
10	potemni	brez spr.	potemni	rumeno	razbarva	razbarva	razbarva
11	modrozeleno	brez spr.	modrozeleno	brez spr.	razbarva	oranž.	malo spr.
12	rjavo	brez spr.	rjavo	rj.oranž.	razbarva	delno razb.	malo spr.
13	modrikastord.	brez spr.	vijoličasto	malo bolj oranž.	vijol.počasi razbar.	brez spr.	malo spr.
14	rumeno	rumeno	rumeno	bolj rjavo	rumeno	razbarva	razbarva
15	bledosivo	pobleđi	rumeno	or. rjavo	bledorumeno	razbarva	razbarva
16	sivorjavo	rjavo	rdečerjavo	vijol.rjavo	or.rjavo	rjavo	razbarva
17	rumenzeleno	oranžno	oranž.	razbarva	oranž.	razbarva	razbarva
18	vijoličasto preide v modro	vij.rdeče	modro	vijol.rjavo	razbarva	razb.počasi	malo spr.
21	rjavorumeno	rumenzeleno	bledorum.	brez spr.	razbarva	razbarva	razbarva
22	oranžorum.	oranžorum.	oranž.	opekastord.	razbarva	delno razb.	delno razb.
23	bolj rdeče	nek.temnejša	bolj rdeče	brez spr.	razbarva	skorj.brez. spr.	malo spr.
25	intenz.roza	bolj roza	roza	oranžno	razbarva	razbarva	malo spr.
26	modrik.roza	roza	modrik.roza	roza	razbarva	razb.delno	malo spr.
27	izrazito rd.	brez spr.	rjavkasto	rjavorum.	počasi razb.	delno razb.	malo spr.
29	rumeno	oranž.rumeno	rumeno	oranžno	rumeno	brez spr.	malo spr.
30	bledo oranž	bledo oranžno	oranžno	brez spr.	oranžno	brez spr.	malo spr.
31	rdečkastoor.	se razb.	razbarva	brez spr.	brezb.	brez spr.	razb.
32	rumeno oranž	rumeno	oranžno	brez spr.	oranž.	brez spr.	razb.
33	rdečerjavo	malo spr.	rdečerjavo	rdečerjavo	brezb.	delno razb.	delno razb.
34	zelenkasto- modro	bolj zelenk.	modro	bolj zelenk. moder	razb.	razb.počasi	malo spr.
35	umazano rum.	umazano rum.	bledo oranž.	razbarva	bledo oranž.	razb.	razb.
36	umazano rum.	rumeno	umazano rum.	brez spr.	bledorum.	razb.	razb.
38	vijol.	brez spr.	brez spr.	brez spr.	počasi bleđi	brez spr.	brez spr.
39	vijol.	brez spr.	brez spr.	brez spr.	brez spr.	brez spr.	brez spr.
42	rumeno	brezb.	brezb.	brez spr.	zbleđi	razb.	razb.
43	vijol.	vijol.	vijol.	brez spr.	razb.	delno razb.	delno razb.
45	rumeno	zelenorum.	bolj zelenk.	bolj or.	bolj zelenk.	brez spr.	bolj oranž.
46	temno rdeče	potemni	rdeče	temno rdeče	razbarva	delno razb.	delno razb.
47	oranžno brez spr.	brez spr.	brez spr.	oranž.roza pobleđi	razbarva	delno razb.	razb.

Št.	H ₂ SO ₄ conc.	H ₂ SO ₄ (1+3)	HCl conc.	NaOH 10 %	SnCl ₂ v HCl	Na ₂ S ₂ O ₄ /NaOH	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
48	or.rumeno	rumeno	or.rumeno	brez spr.	or.rumeno	brez spr.	razb.
49	pbledi	pbledi	pbledi	malo pobi.	or.rdeče	brez spr.	razb.
50	bolj roza malo spr.	malo spr.	malo spr.	bledo	razb.	delno razb.	malo spr.
56	pomodri, vijol.	bolj vijol.	bolj vijol.	oranž.	počasi razb.	delno razb.	malo spr.
60	modrozeleno	pbledi	brez spr.	modrovij.	razb.	razb.	razb.
62	bolj rdeče manj modro	bolj intenz.	bolj intenz.	brez spr.	brez spr.	brez spr.	razbarva
63	rumeno	rumeno	rumeno	rumeno	rumeno	brez spr.	brez spr.
67	oranžnordeče	rumeno	oranžnordeče	oranžnordeče	razb.	brez spr.	brez spr.
70	vijol.	vijol.	vijol.	oranžnorjavo	vij.počasi razbarva	delno razb.	razbarva
73	umazanoooranž.	brezb.	brezb.	brez spr.	razb.	brez spr.	razb.
74	rdečkasto or.	rumeno	rumeno	vijol.	rumeno	vijol.	rumeno
76	rumenozeleno	oran.rumeno	oranžno	modro	oranžno	razb.	delno razb.

TABELA ŠT. 10

Reakcije barvil v UV svetlobi

Št.	Suha lisa	H ₂ SO ₄ (1+3)	HCl	NaOH 10 %	Na ₂ S ₂ O ₄ /NaOH
1	zelenkastorj.	rdeče	rdeče	potemni	modro fl.
2	rumeno fl.	rumeno ne fl.	malo spr.	izgine	krem ne fl.
3	rumenozeleno	rumenozeleno	malo spr.	potemni	oranžno
4	rdeče fl.	rdeče fl.	intenz.fl.	potemni	sv.modro fl.
5	vijol.modrik. fl.	vijol.	vijol.	potemni	modro fl.
6	vijol. fl.	brez spr.	brez spr.	potemni	vijol. fl.
7	rjavo	bolj svetlo	svetlorjavo	potemni	brezb.
8	oranž fl.	rjavo	svetlorjavo	oranžne fl.	oranž. fl.
9	rjavo	malo spr.	malo spr.	malo spr.	rjavo
10	temnomodro	sv.modro	malo spr.	rumeno fl.	rumeno fl.
11	črnomodro	brez spr.	malo spr.	malo spr.	krem fl.
12	rjavo	malo spr.	temnorjavo	malo spr.	malo spr.
13	rdeče fl.	roza fl.	fl.delno ugasne	malo spr.	malo spr.
14	vijol.	rumeno	oranž.	potemni	vijol.
15	modro	rumeno	rjavosivo	rjavo	sv.modro
16	modro	sivo	modrosivo	vij.rjavo	modro
17	zeleno	rumeno	rumeno	izgine	brezb.
18	rdečerjavo	malo spr.	temno modro	izgine	rumeno
21	olivnozeleno	izgine	izgine	malo spr.	zelenk.belo
22	rumenorjavo	bledorumeno	t.rjavo	potemni	rjavo

23	oranžnorjavo	brez spr.	malo spr.	izgine	zelenkast.belo fl.
25	rdeče fl.	bolj intenz.	malo spr.	skoraj izg.	krem fl.
26	rdeče fl.	bolj intenz.	malo spr.	opekasto rd.	vijol. belo fl.
27	temno rdeče fl.	bolj intenz.	malo spr.	izgine	zel. fl.
29	rumeno zel. fl.	oslabi	oslabi	bolj zelenk.	
30	rumeno fl.	skoraj izg.	skoraj izg.	malo spr.	
31	rdeče fl.	izgine	izgine	skor. ugasne	
32	oranž. fl.	temno rjavo	temno rjavo	rjavkasto	
33	črnorjavo	brez spr.	malo spr.	malo spr.	
34	temno modro	svetlo modro	temno modro	malo spr.	zel. fl.
35	zeleno	rumeno	roza	izgine	vij. fl.
36	vijol.	rumeno	zelenorjavo	malo spr.	vijol.
38	rjavo	brez spr.	brez spr.	brez spr.	malo spr.
39	rdečerjavo	brez spr.	brez spr.	brez spr.	malo spr.
42	olivnozeleno	zbledi	zbledi	brez spr.	belomodro fl.
43	rjavo	vijol.	vijol.	brez spr.	vijol. fl.
45	rumenozel. fl.	modroz. fl.	delno ugasne	bolj modro fl.	rum. fl.
46	žamet. rdečerj.	brez spr.	brez spr.	potemni	modro fl.
47	rjavo	brez spr.	brez spr.	izgine	rumenorj. fl.
48	rum. zel. fl.	rum. ne fl.	rum. ne fl.	malo spr.	zeleno fl.
49	oranžno fl.	oslabi	oslabi	malo spr.	rdeče fl.
50	roza fl.	bolj int.	bolj int.	skoraj izg.	zel.in rjavo fl.
56	oranžnord. fl.	živordeče	živordeče	malo spr.	vijol. fl.

Št.	Suha liša	H ₂ SO ₄ (1+3)	HCl	NaOH 10 %	Na ₂ S ₂ O ₄ /NaOH
60	temno modro	svetlo modro	izgine	malo spr.	izgine
62	roza fl.	vijol.	rd. vijol.	temno vij.	roza fl.
63	zelen. rjavo	brez spr.	brez spr.	malo spr.	rjavo
67	rumenozeleno	brez spr.	brez spr.	rdečkasto	rjavo
70	črnorjavo	črno	temnovij.	rdeče (fl.)	rdeče fl.
73	rdeče fl.	izgine	izgine	roza (ne fl.)	belozeleno fl.
74	oranžnosivo	brez spr.	brez spr.	vijol.	zelenorum. fl.
76	modro	rumeno	rumeno	temnomodro	brez spr.
82	modro	brez spr.	brez spr.	brez spr.	brez spr.

Z A K L J U Č E K

V svojem disertacijskem delu sem izdelal metode, s katerimi bo mogoče tudi v slabše opremljenih laboratorijih analizirati barvila, s katerimi so barvana živila in predmeti splošne rabe.

EKSTRAKCIJA

Znane metode za ekstrakcijo barvil iz živil in predmetov splošne rabe sem preiskusil in ugotovil mnoge pomanjkljivosti. Z različnimi modifikacijami sem dosegel boljše uspehe, preiskusil in opisal sem tudi metode, ki sem jih povsem na novo izdelal, n. pr. za ekstrakcije iz:

jajčnih lupin
žigov
šmink
krem, pudrov
lakov za nohte
zobnih past
šamponov, mil

Za izolacijo barvil iz surovega ekstrakta sem nekatere metode izboljšal in nekatere na novo izdelal. Po mojih dognanjih je najboljši postopek sledeč:

za kislja barvila: postopek z detergenti in kloroformom (str. 84), ker je najbolj univerzalen in dovolj selektiven. Za dokaz prisotnosti večine barvil v ekstraktih, ki ne vsebujejo beljakovin, tudi postopek s poliamidi.

Za kislja ksantenska barvila: (ta obravnavam posebej zaradi njihovih posebnih lastnosti - str. 98, 153).

Ekstrakcija iz očetno kisle vodne raztopine z etrom, etilacetatom, metilenkloridom, toluenom itd.

Za bazična barvila: ekstrakcija iz alkalne vodne raztopine z etrom, etilacetatom itd.

Za v maščobah topna barvila: frakcionirana ekstrakcija s 60 % etanolaminom, dimetilformamidom, solno kislino metanolom (str. 70).

Za barvila iz lakov: ekstrakcija z organskim topilom potem, ko je substrat vezan v stabilnejši kompleks (str.90)

Za pigmentna barvila: raztapljanje v primernih topilih potem, ko so bile predhodno odstranjene vse topne primesi (str.91)

KROMATOGRAFSKA LOČITEV

Za ločitev barvilnih komponent kakor tudi za odločitev barvil od primesi sem se poslužil najprej papirne in tenkoplastne kromatografije. Preiskusal sem veliko število topilnih sistemov in ugotovil:

kisla barvila:

A) na papirju

Najbolj so primerne zmesi z naslednjo sestavo (primerjaj str.123)

- a) 1. organsko topilo, ki se z vodo delno meša: 50 delov
2. organsko topilo, ki se z vodo meša v vseh razmerjih: 2 dela več kot je potrebno, da se pomešata topilo pod 1. in voda
3. kisline ali baze: 0,5 do 10 delov
4. voda: 20 do 30 delov, le za t-butanol 40.

ali pa:

- zmes 1. in 2.: 50 delov, vendar tako, da je končna zmes enofazna in da je topila 1. čim več.
3. 0,5 do 10 delov
 4. 20 do 30 delov

b) sol:baza:voda 2 : 2do5 : 100

Od teh so zaradi hitrega potovanja najbolj primerne ke-
tonske in esterske mobilne faze iz skupine a) ter zmesi
iz skupine b).

B) na silikagelu

Uporabne so zmesi istih topil kakor pod A a), vendar je
običajno treba vzeti več topila, ki se meša z vodo v vseh
razmerjih in manj vode, da se zmes med procesom ne razme-
ša (primerjaj str.132)

Kisla ksantenska barvila (prim. str.163)

A) na papirju

Najbolj primerne so raztopine sol:baza:voda 1 : 2dolo :
: 100, medtem ko zmesi organskih topil ne dajo tako dob-
rih rezultatov. Od baz je najbolj uporaben amonijak.

B) na silikagelu

Najbolj primerna je zmes CCl_4 : CHCl_3 :ledocet 5:x:1
(x = 1 do 4), dobre rezultate dasta tudi sistema metil-
etilketon:acetone:voda in aromatski ogljikovodik:ledocet.

Bazična barvila (prim. str.168)

Najbolj uspešna je ločitev na papirju impregniranem s cetil-
alkoholom (2 do 5 %) z mobilno fazo etanol:amonijak:voda
(2: 1do2 : 2dol), ki jo je treba dopolniti z ločitvijo
na navadnem papirju z zmesjo KHSO_4 : HCl : H_2O 2:20:100.

V maščobah topna barvila (prim. str.179)

A) na papirju

Uporaben je: a) hidrofoben papir (acetiliran, impregniran s parafinskim ali silikonskim oljem) in topila kot n.pr. 80 % metanol, 50 % aceton, 40 % tetrahidrofuran, ki jim dodamo za spreminjanje lastnosti po nekaj % kisline ali baze.

b) papir impregniran z dimetilformamidom
Za mobilne faze lahko uporabimo le alkane in cikloalkane z majhnim dodatkom CCl_4 ali CHCl_3 .

B) na silikagelu

Najbolj uporabni topilni sistemi so: benzen, trikloretilen, $\text{CCl}_4:\text{CHCl}_3$ 4:1; pa tudi drugi aromatski ogljikovodiki.

Pigmentna barvila

Ftalocianinski pigmenti so premalo topni, zato jih ni mogoče uspešno kromatografirati (str. 180).

Azo barvila je mogoče ločiti na silikagelu s topili: benzen, trikloretilen itd. (str. 181).

ELEKTROFORETSKA LOČITEV

Za primerjanje ločitve sem poleg kromatografskih metod preiskusil tudi elektroforezo. Pričakoval sem eventuelne spremembe v zaporedju in razporeditvi barvil ter lažjo odločitev primesi.

Uporabljal sem papirno elektroforezo.

Kisla barvila (prim. str. 185)

Ugotovil sem, da je ločitev podobna kot pri papirni kroma-

tografiji z mobilno fazo sol:baza:voda, vendar se medsebojna lega nekaterih barvil toliko razlikuje, da je ta postopek koristno dopolnilo kromatografiji.

Kisla ksantenska barvila (prim.str. 190)

potujejo le v alkalnih pufrih. Ločitev je taka kot pri uporabi mobilnih faz sol:baza:voda, le da je za enako ločitev potreben šestkrat daljši čas. V alkoholnih pufrih potujejo vsa skoraj enako hitro.

V maščobah topna barvila in pigmentna barvila (prim. str. 191)

S to tehniko je mogoče preiskovati le tista barvila, ki imajo popolnoma prosto vsaj eno OH skupino.

IDENTIFIKACIJA BARVIL

Za identifikacijo barvil, ki sem jih ekstrahirал iz živil ali predmetov splošne rabe sem uporabil tri metode:

1) Primerjava Rf-vrednosti

Za identični sem smatral barvili, ki sta imeli isto nianso in praktično isto Rf-vrednost pri kromatografiji z več bistveno različnimi mobilnimi fazami.

2) Reakcije na kromatogramu

Z nekaterimi reakcijami, ki jih napravimo kar na kromatogramu, je mogoče identificirati barvila, če ne bi bili sigurni pri primerjavi Rf-vrednosti.

Na lise na kromatogramih sem kanil po eno kapljico reagenta (HCl, H₂SO₄ dil, NaOH, Na₂S₂O₄ v NaOH, SnCl₂ v HCl, (NH₄)₂S₂O₈ v H₂SO₄ dil) in opazoval spremembo v vidni in UV svetlobi (prim.str. 201), ter jih primerjal s spremembami na lisah standardnih barvil.

3) Primerjanje absorpcijskih krivulj

Ta postopek sem uporabil v dveh variantah.

Kadar sem imel v ekstraktu le po eno barvilo ali pa po dve z veliko razliko v absorpcijskih maksimih, sem posnel absorpcijsko krivuljo ekstrakta in jo primerjal s krivuljami čistih barvil, dobljenimi pod enakimi pogoji (glej str. 194).

Kadar sem imel opravka z zmesmi več barvil, sem le ta ločil s pomočjo kromatografije, vsako liso posebej eluiral in posnel njeno absorpcijsko krivuljo ter jo primerjal s krivuljami čistih barvil.

Razen zadnje metode se dajo vsi analitski postopki izdelati z enostavnimi pripomočki in sorazmerno hitro, tako da jih je mogoče uporabiti v vsakem laboratoriju.

L I T E R A T U R A

1. G.Ambanelli; *Ind. conserve* 32,75 (1957)
2. J.R.A. Anderson, C.C.Lock, E.C. Martin; *Aust.J.Appl. Sci.* 8,112 (1957)
3. M.H.Anwar, S.Norman, B.Anwar, P.Laplaca; *J.Chem.Educ.* 40,537 (1963)
4. N.Arata; *Z.Analyt. Chem.* 28,639 (1889), ref. K.Rauscher (165)
5. F.H. Banfield; *Voeding* 22,53 (1961)
6. F.H. Banfield; *Dtsch. Lebensm. Rdsch.* 56,231 (1960)
7. J.F. Barrett, A.J.Ryan; *Nature* 199,372 (1963)
8. J.Barrolier; *Naturwissenschaften* 48,404 (1961)
9. J.Bastianutti; *Boll. Lab.Chim.Provinciali* 13,179 (1962)
10. J.Bastianutti; *Boll. Lab.Chim.Provinciali* 14,16 (1963)
11. J.Bastianutti; *Boll. Lab.Chim.Provinciali* 14,530 (1963)
12. J.N.Be Miller; *J.Chem.Educ.* 41,608 (1964)
13. E.Benk, I.Wolff, H.Treiber; *Dtsch. Lebensm.Rdsch.* 59,39 (1963)
14. C.Bersano; *Ind. conserve* 34,11 (1959)
15. A.Beythien, W.Diemair; *Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker* Verlag von Theodor Steinkopff Dresden und Leipzig 1962, 8 izd.
16. J.W.H.van Buuren, F.Hoeke; *Chem.Weekbl.* 58,155 (1962)
17. H.J.Cahnmann, T.Matsuura; *J.Am.Chem.Soc.* 82,2050 (1960)
18. C.Calzorali, E.Cerma; *Chim.ind.* 41,425 (1959)
19. D.S.E.Campbell, D.Catchart, C.H.Giles; *J.Soc.Dyers Colorists* 73,546 (1957)
20. A.Canuti; *Chim.e Ind.* 41,1086 (1959)
21. A.Canuti, B.Luboz Magrassi; *Chim.e Ind.* 46,284 (1964)
22. J.Ciglar, J.Kolšek, M.Perpar; *Chem.Ztg.* 86,41 (1962)
23. J.E.Clements; *J.Ass. Offic.Agric.Chem.* 38,838 (1955)
24. C.H.Coleman, D.W.Ezersky, C.Butnis, T.G.Muruane; *J.Ass. Offic.Agric.Chem.* 45,463 (1962)
25. K.A.Connors; *Anal.Chem.* 37(2),261 (1965)

26. F.Cotta Ramasino, A.Stacchini; Boll.Lab.Chim.Provincia-
li 14,379 (1963)
27. A.D.Cremer; Z.Lebensm.Unters. 96,189 (1953)
28. W.J.Criddle, G.J.Moody, J.D.R.Thomas; J.Chem.Educ.
41,609 (1964)
29. W.J.Criddle, G.J.Moody, J.D.R.Thomas; Nature 202,1327
(1964)
30. J.Davide, J.Pokorny, G.Janiček; Z.Lebensm.Unters. 116,13
(1961)
31. W.Deckenbrock; Alkohol Industrie 71,13 (1958)
32. J.Deshusses, P.Desbaumes; Mitt. Lebensm.Hyg. 43,501
(1952)
33. J.Deshusses, P.Desbaumes; Mitt.Lebensm.Hyg. 44,500
(1953)
34. J.Deshusses, P.Desbaumes; Mitt.Lebensm.Hyg. 45,484
(1954)
35. J.Deshusses, P.Desbaumes; Mitt.Lebensm.Hyg. 46,193
(1955)
36. J.Deshusses, P.Desbaumes; Mitt.Lebensm.Hyg. 46,258
(1955)
37. J.Deshusses, P.Desbaumes; Mitt.Lebensm.Hyg. 47,15
(1956)
38. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung
Verlag Chemie Weinheim 1960 3. izd. str. H 23
39. B.Devon, J.Laur; Ann.Fals.Fraudes 52,155 (1959)
40. W.Diemair, H.Janecke; Dtsch. Lebensm.Rdsch. 46,110 (1950)
41. J.Dobaš; Chem.Listy 51,1202 (1957)
42. M.Dolinsky; J.Ass. Offic.Agric.Chem. 38,359 (1955)
43. M.Dolinsky C.Stein; J.Ass.Offic.Agric.Chem. 45,767
(1963)
44. H.Druckrey; Arzneimittel - Forsch. 2,503 (1952)
45. H.Druckrey; Parfüm. Kosm. 43,245 (1962)
46. H.Druckrey; Z.Krebsforschung 60,344 (1955)
47. H.Druckrey; Z.Lebensm.Unters. 120,375 (1963)
48. L.F.Druding; J.Chem.Educ. 40,536 (1963)
49. D.Dušinsky, A.Szokolay; Nahrung 4,356 (1960)
50. M.C.Dutt; Analyst 89,142 (1964)
51. J.Eisenbrand; Dtsch.Lebensm.Rdsch. 50,248 (1954)
52. J.Eisenbrand, B.Koether; Z Lebensm.Unters. 109,218 (1959)

53. H.Endres.H.Hörmann; Angew.Chem. 75,288 (1963)
54. J.Engelbreth - Holm.S.Iversen; Acta Path.Scand.37,483(1955)
55. G.J.van Esch,H.van Genderen, H.H.Vink; Z.Lebensm. Unters. 111,93 (1959)
56. FAO-WHO Specifications for Identity and Purity of Food Additives, Vol.II. Rim 1963
57. C.Fauli,J.M.Pla Delfina; Galenica Acta 12,417 (1959)
58. Federal Register (USA) Vol. 24, N^o 138 str. 5707
16.7.1959
59. A.L.Fischbach; Am.Perfumer Cosmet. 79 (10), 47 (1964)
60. J.M.Formiguera; Galenica Acta 12,425 (1959)
61. K.A.Freeman; J.Ass.Offic. Agric. Chem. 38,353 (1955)
62. H.Friedrich, C.Horstmann; Pharmazie 16,319 (1961)
63. I.Gál; Elelmiszervizsgálati Közlemények 5,11 (1959)
64. J.Geminder, E.E.Me Donough; J.Amer Oil Chem. Soc. 34,314 (1957)
65. J.P.Gill; Chem. Prods. 25,56 (1962)
66. R.de Gori,P.Cantagalli; Boll.Lab.Chim.Provinciali, 8,23 (1957)
67. R.de Gori, P.Cantagalli; Boll. Lab.Chim. Provinciali 8,123 (1957)
68. R.de Gori, F.Grandi; Boll. Lab.Chim.Provinciali 9,168 (1958)
69. R.de Gori, F.Grandi; Bol.Lab.Chim.Provinciali 9,276 (1958)
70. C.Graichen,J.C.Molitor; J.Ass.Offic.Agric.Chem. 42,149 (1959)
71. C.Graichen,R.N.Solar,N.Ettelstein,K.A.Freeman; J.Ass Offic. Agric. Chem. 38,792 (1955)
72. W.Grassmann,L.Hübner; Leder 5,49 (1954)
73. L.Greenberg, D.Lester;Handbook of Cosmetic Materials Interscience Publishers Inc. New York (1954)
74. H.Gütter, Koblenz; Dtsch. Lebensm.Rdsch. 49,237 (1953)
75. L.S.Harrow,J.H.Jones; J.Ass.Offic.Agric.Chem. 36,914 (1953)
76. L.S.Harrow,J.O.Milham; J.Ass.Offic.Agric.Chem. 38,172 (1955)
77. G.Hartmann; Alkohol Industrie 73,151 (1960)

78. R.F.Hill; J.Oil Colour Chem.Assoc. 48,603 (1965)
79. F.Hoeke, H.Onrust; Chem. Weekbl. 52,186 (1956)
80. L.Hörhammer, H.Wogner; Pharm,Z. 104,783 (1959)
81. L.Horner, H.Müller; Chem.Berichte 89,2756 (1956)
82. J.Illi; Mitt. Lebensm. Hyg. 54,434 (1963)
83. P.W.Jewel; J.Ass.Offic.Agric.Chem. 38,348 (1953)
84. J.H.Jones, J.S.Harrow, K.S.Heine; J.Ass.Offic.Agric. Chem. 38,949 (1955)
85. J.H. Jones, M.Dolinsky, L.S.Harrow, K.S.Heine., J. in M.C.Staves; J.Ass.Offic.Agric.Chem.38,977 (1955)
86. E.Kaplan; J.Chem.Educ. 37,82 (1960)
87. J.Kiger, R.Bon; Ann.Pharm.Franc. 18,853 (1960)
88. L.Koch; J.Ass.Offic.Agric.Chem. 44,56 (1961)
89. L.Koch; J.Ass.Offic.Agric.Chem. 41,249 (1958)
90. B.Koether; Dtsch.Lebensm.Rdsch. 56,7 (1960)
91. J.Kolšek; Chem. Ztg. 82,35 (1958)
92. J.Kolšek; Chem. Ztg. 82,457 (1958)
93. J.Kolšek; Chem. Ztg. 83,478 (1959)
94. J.Kolšek, F.Mlakar, M.Perpar; Chem.Ztg. 86,883 (1962)
95. Konferenca EVROTOX-a, London 1961 - Arzneimittel Forsch.12,729 (1962)
96. S.Krauze, L.Piekarski; Acta Pol. Pharm. 16,395 (1959)
97. S.Krauze, L.Piekarski, Z.Arendt, W.Kalbarczyk; Roczn. Zakl.Hig. 12,519 (1961)
98. R.König; Seife Ole Fette Wachse 87,40 (1961)
99. E.L. Krugers Dagnaux, A.J.Weide; Chem.Weekbl. 54,675 (1958)
100. L.Kuiper; Chem. Weekbl. 55,684 (1959)
101. R.Lecoq; Manuel d'Analyses alimentaires et d'Expertises usuelles Editions Doin Deren & C^{ie} Paris 1965
102. S.Lewin; Lab. Practice 13,1191 (1964)
103. W.Lindberg; Z.Lebensm.Unters. 103,1 (1956)
104. W.F. Lindner; Chem. Ztg. 86,103 (1962)
105. W.B.Link; J.Ass.Off.Agric.Chem. 44,53 (1961)
106. W.B.Link; J.Ass.Off.Agric.Chem. 44,43 (1961)
107. S.Logar, J.Perkavac, M.Perpar; Mikrochim.Acta 712 (1964)
108. D.C.Malins, J.C. Wekell; J.Chem. Educ. 40,531 (1963)

109. W.A.Manuell, H.C.Grice, I.Dupuis; Food Cosm.Toxicol. 2,345 (1964)
110. W.A.Manuell, H.C.Grice; J.Pharm.Pharmacol. 16,56 (1964)
111. W.A.Manuell; Food Cosm.Toxicol. 2,169 (1964)
112. E.Mark, G.G. Mc Keown; J.Ass.Off.Agric.Chem, 41,817 (1958)
113. E.Mark, G.G. Mc Keown; J.Ass.Off.Agric.Chem, 42,213 (1959)
114. G.G.Mc Keown; J.Ass.Off.Agric.Chem, 44,347 (1961)
115. L.Meckel; Textil Praxis 7,737 (1961)
116. L.Meckel; Textil Rdsch. 15,353 (1960)
117. L.Meckel, H.Miloter, U.Krause; Textil Praxis 7,1032 (1961)
118. R.Mecke, D.Schmahl; Arzneimitt.Forsch. 7,355 (1957)
119. G. de Meuron; Mitt.Lebensm.Hyg. 44,184 (1953)
120. E.Miglietta; Boll. Lab. Chim. Provinciali 11,216 (1960)
121. R.G.Minor; Lab. Practice 11,33 (1962)
122. R.G.Minor; Lab. Practice 11,130 (1962)
123. L.C.Mitchell; J.Ass.Off.Agric.Chem. 36,943 (1953)
124. J.Monselise, D.Miranda; Ind.Agric.Aliment. 71,223 (1964)
125. A.Montag; Z.Lebensm.Unters 116,413 (1961)
126. M.Mottier,M.Potterat; Z.Lebensm.Unters. 95,264 (1953)
127. M.Mottier,M.Potterat; Mitt.Lebensm.Hyg. 43,118 (1952)
128. M.Mottier,M.Potterat; Mitt.Lebensm.Hyg. 44,192 (1953)
129. M.Mottier,M.Potterat; Mitt.Lebensm.Hyg. 44,293 (1963)
130. M.Mottier,M.Potterat; Mitt.Lebensm.Hyg. 47,372 (1956)
131. K.Müller,K.Täufel; Ernährungsforschung 1,354 (1956)
132. M.B.Naff.A.S.Naff; J.Chem.Educ. 40,534 (1963)
133. S.H.Newburger; J.Ass.Off.Agric.Chem. 38,524 (1955)
134. S.H.Newburger; A Manual of Cosmetic Analysis, Ass.Off. Agric.Chem. Washington 1962
135. M.Ney,K.G.Bergner,H.Sperlich,H.Miethke;Dtsch.Lebensm. Rdsch. 61,148 (1965)
136. G.A.Nowak, G.Holzner; Am.Perfumer Cosmet. 79(10),41(1964)
137. Official Methods of Analysis of the Ass.Off.Agric.Chem. Association of Official Agricultural Chemists,Washington (1960)

138. H. Onrust; Chem. Weekblad 55, 637 (1959)
139. H. Onrust, F. Hoeke; Chem. Weekblad 54, 465 (1958)
140. G. Panopoulos, J. Megaldiokonomos; Chim. Anal. 36, 68 (1954)
141. G. Pastuska, H. Trinks; Chem. Ztg. 85, 535 (1961)
142. G. Pastuska, H. Trinks; Chem. Ztg. 86, 134 (1962)
143. F. Pellerin, J. A. Gautier, J. G. Kiger; Am. Pharm. Franc. 21, 355 (1963)
144. L. Piekarski, S. Krauze; Acta Pol. Pharm, 18, 103 (1961)
145. L. Piekarski, S. Krauze; Roczn. Zakl. Hig. 11, 551 (1960)
146. L. Piekarski, S. Krauze; Roczn. Zakl. Hig. 10, 495 (1959)
147. M. E. Pietrak, S. H. Newburger; J. Ass. Off. Agric. Chem. 41, 453 (1958)
148. H. P. Pietsch, R. Meyer; Nahrung 9, 154 (1965)
149. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 12, 1 (1959)
150. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 12, 91 (1959)
151. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 12, 181 (1959)
152. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 12, 255 (1959)
153. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 12, 363 (1959)
154. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 12, 431 (1959)
155. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 13, 21 (1960)
156. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 13, 85 (1960)
157. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 13, 177 (1960)
158. J. M. Pla Delfina; Galenica Acta 13, 259 (1960)
159. L. Polzela; Boll. Lab. Chim. Provinciali 9, 96 (1958)
160. Priručnik laboratoriskih (hemiskih) metoda za ispitivanje životnih namirnica Med. knjiga Beograd-Zagreb 1954
161. W. Przybylski, G. G. Mc Keown; J. Ass. Off. Agric. Chem. 43, 800 (1960)
162. W. Przybylski, R. B. Smith G. G. Mc Keown; J. Ass. Off. Agric. Chem. 43, 274 (1960)
163. M. K. Ramamurthy, V. R. Bhalerao; Analyst 89, 740 (1964)
164. V. Kondal Rao, P. S. Nataraja Sarma; J. Sci. Ind. Research 21D, 61 (1962)
165. K. Rauscher, Untersuchung von Lebensmitteln VEB Fachbuchverlag Leipzig 1963
166. R. H. Reed, D. M. Heinekey; Analyst 87, 391 (1962)
167. J. C. Riemersma, F. J. M. Heslinga; Mitt. Lebensm. Hyg. 51, 94 (1960)

168. G.Rispoli, A. di Giacomo; Boll. Lab. Chim. Provinciali 13, 587 (1962)
169. C.D.Ritchie, J.A.Wenninger, J.H.Jones; J.Ass.Off.Agric Chem. 44, 733 (1961)
170. C.D.Ritchie, J.A.Wenninger, J.H. Jones; J.Ass.Off. Agric.Chem. 42, 720 (1959)
171. K.Rotheman; Das Grosse Rezeptbuch der Haut- und Körperpflagemittel Dr. Alfred Hüthig Verlag Heidelberg 1962
172. B.R.Roy, A.R.Sundararajan, S.N.Mitra; J.Sci.Ind.Research 18 C, 38 (1959)
173. W.Ruf; Z. Lebensm.Unters. 94, 190 (1952)
174. I.Saenz Lascano Ruiz, P.Chovin, H.Moreau; Actuel.Sci. Ind. 1046, (1948) Herman & C^{ie} Paris
175. I.Saenz Lascano Ruiz, C.Laroche; Bull.Soc.Chim.France 8-9, 1594 (1963)
176. I.Saenz Lascano Ruiz; Ann.Fals.Expert.Chim. 57, 115 (1964)
177. T.Salo, K.Salminen; Suomen Kem.35 B, 146 (1962)
178. A.Schmidt; Dtsch.Lebensm.Rdsch. 48, 211 (1952)
179. H.Schwarz; Seife Öle Fette Wache 84, 489 (1958)
180. W.Schweisheimer; Fette Seif. Anstrichmittel 61, 1138 (1959)
181. R.N.Sclar, K.A.Freeman; J.Ass.Off.Agric.Chim 36, 930 (1953)
182. R.N.Sclar, K.A.Freeman; J.Ass.Off.Agric.Chim 38, 796 (1955)
183. G.Seris; Ann.Fals.Fraudes 45, 110 (1952)
184. A.Shansky, P.P.Carrubba; Am.Perfumer Cosmet. 78(7) 13 (1963)
185. E.Sidi Verträglichkeit von Kosmetischen Präparaten - Klinik und Grundlagenforschung Dr.Alfred Hüthig Verlag Heidelberg 1957
186. R.C. Silk; J.Ass.Off.Agric.Chim. 42, 427 (1959)
187. E.R.Simonetti; Anales Fac.Quim.Farm.Univ.Chile 13, 118 (1961)
188. R.B.Smyth, G.G.Me Keown; J.Cromatography 5, 395 (1961)
189. E.Somflay, K.S. Ausch; J.Chromatography 2, 327 (1959)

190. E.Stahl,W.Specht; Chem.Ztg. 85,371 (1961)
191. R.L.Stanley,P.L.Kirk; J Agric.Food Chem. 11,492 (1963)
192. M.E.Stas, T.A.Schippers; Chem.Weekbl, 58,159 (1962)
193. H.Stelzer ; Nutr.Bromatol.Toxicol. 1,31 (1962) ref.
Z.Lebensm.Unters, 119,285 (1963)
194. A.Stier,W.Specht; Naturwissenschaften 50,549 (1963)
195. H.Suter,H.Hadorn; Mitt.Lebensm.Hyg. 51,293 (1960)
196. A.Szokolay; Z.Lebensm.Unters. 120,295 (1963)
197. A.Szokolay, A.Pogačova; Prumysl Potravin 12,656 (1961)
198. Z.Šestak, J.Chromatography 1,293 (1958)
199. K.Teichert, E.Mutschler,H.Rochelmeyer; Dtsch.Apoth.Ztg.
100,283 (1960)
200. S.N.Tewari; Arch.Kriminol. 126,26 (1960)
201. H.Thaler, R.Scheler; Z.Lebensm.Unters. 93,220 (1951)
202. H.Thaler, R.Scheler; Z.Lebensm.Unters. 93,286 (1951)
203. H.Thaler, R.Scheler; Z.Lebensm.Unters. 95,1 (1952)
204. H.Thaler,G. Sommer; Z.Lebensm.Unters. 97,345 (1953)
205. H.Thaler, G.Sommer; Z.Lebensm.Unters. 97,441 (1953)
206. H.Thaler,F.H.Mühlberger; Z.Lebensm.Unters.108,17 (1958)
207. D.H.Thilden; J.Ass.Off.Agric.Chem. 35,423 (1952)
208. D.H.Thilden; J.Ass.Off.Agric.Chem. 36,802 (1953)
209. Trace Materials Committee; Analyst 88,864 (1963)
210. H.Wagner; Mitt.Lebensm.Hyg. 51,416 (1960)
211. H.Wagner, J.Pflug; Melliand Textilberichte 44,281 (1963)
212. R.Wasicky; Naturwissenschaften 50,569 (1963)
213. H.Wilman; Parfum.Kosm. 43,245 (1962)
214. K.Woidich, T.Langer, L.Schmid; Dtsch.Lebensm.Rdsch.
56,73 (1960)
215. G.Wolf, E.Rödel; Lebensm.Ind. 10,111 (1963)
216. P.Wollenweber; J.Chromatography 7,557 (1962)
217. P.Wollenweber; Lab.Practice 13,1194 (1964)
218. L.I.Woolf; J.Chromatography 2,431 (1959)
219. M.Wurst, E.Wurstova; Chem. Prumysl 11,398 (1961)
220. A.Venturini, L.Zanoni; Boll.Lab.Chim.Provinciali 7,16
(1956)
221. M.R.Verma,R.J.Dass; J.Sci.Ind.Research 15 C,186 (1956)
222. M.R.Verma,R.J.Dass; J.Sci.Ind.Research 16 B,131 (1957)

223. M.R.Verma, R.J. Dass; Naturwissenschaften 44,351 (1957)
224. Y.Yanuka, Y.Shalon, E.Weissenberg, J.Nir-Grosfeld
Analyst 87,791 (1962)
225. Y.Yanuka, Y.Shalon, E.Weissenberg, J.Nir-Grosfeld
Analyst 88,872 (1963)

K A Z A L O

Uvod	1
Zakonodaja	10
Preglednica in lastnosti barvil	25
Dokaz prisotnosti in izolacija sintetskih barvil	51
A - Izolacija iz izdelkov - priprava surovih ekstraktov	52
B - Izolacija iz surovih ekstraktov	63
Barvila topna v maščobah	63
Barvila topna v vodi	72
Laki in pigmenti	90
Povzetek	92
Ločitev in identifikacija barvil	93
Kromatografija	94
V vodi topna kislina barvila	98
Identifikacija barvil	133
Povzetek	152
Kislina ksantenska barvila	153
Povzetek	163
V vodi topna bazična barvila	164
Povzetek	168
V maščobah topna barvila	168
Povzetek	179
Pigmentna barvila	180
Povzetek	182
Elektroforeza	184
V vodi topna kislina barvila	185
Kislina ksantenska barvila	190
V maščobah topna barvila in pigmentna azo barvila	191
Povzetek	193
Identifikacija barvil s pomočjo elektroforeze	193

Spektrofotometrija	194
Reakcije barvil na kromatogramih	201
Zaključek	209
Literatura	215

