

УДК 663/664:620(076.5)

## Отработка условий хроматографического разделения в методике измерения синтетических красителей в молочных продуктах

Канд. техн. наук **А.П. Пацовский**, patsovskiy\_ap@mail.ru,

Научно-исследовательский центр целевой доставки лекарств (НИЦЦДЛ), ОАО «ГаленоФарм»,  
191144, Россия, Санкт-Петербург, ул. Моисеенко, 24а

Канд. техн. наук **В.В. Назарова**, vvnazarova@yandex.ru

Университет ИТМО  
197101, Россия, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

*Изучено влияние матриц молочных продуктов на хроматографическое разделение синтетических красителей азо-, трифенилметанового и индигоидного ряда, разрешенных к применению в пищевой промышленности РФ. Воспроизведена известная методика определения содержания красителей. Объектами исследования являлись пастеризованное молоко, биокефир и йогурт, в состав которых вводился комплекс синтетических красителей: «Тартразин» (E102), «Солнечный закат» (E110), «Кармуазин» (E122), «Амарант» (E123), «Понсо 4R» (E124), «Очаровательный красный» (E129), «Патентованный синий» (E131), «Индигокармин» (E132) и «Зеленый S» (E142) с концентрацией каждого 10 ppm. Исследования проводились с помощью жидкостного хроматографа Shimadzu LC-20 Prominence. Установлено, что на стадии фильтрации пробы молочных продуктов через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм имеет место значительная потеря красителей, что значительно ухудшает метрологические характеристики методики измерения. Показана эффективность альтернативного подхода для идентификации и определения содержания в молочных продуктах пищевых синтетических красителей хроматографическим методом исследования, позволяющим одновременно разделять девять взятых для исследования красителей, и заметно ускорять и упрощать анализ в целом. Полнота извлечения введенных в матрицы молочной продукции пищевых синтетических красителей составила 74,7–99,2% для всех видов исследуемых продуктов. При этом относительные стандартные отклонения площадей и времени удерживания пиков красителей составили не более 5%, что обеспечивает прохождение проверки пригодности хроматографической системы. Время хроматографирования не превышает 15 мин, что позволяет оперативно проводить контроль синтетических красителей в продуктах питания.*

**Ключевые слова:** пищевые синтетические красители; фальсификация молочных продуктов; стабилизация белков; хроматографическое разделение.

DOI: 10.17586/2310-1164-2016-9-4-10-16

## Simulation of chromatographic separation conditions for measurement of synthetic dyes in dairy products

Ph.D. **Alexander P. Patsovskiy**, patsovskiy\_ap@mail.ru

Research center for targeted drug delivery, "Galenopharm"  
191144, Russia, St. Petersburg, Moiseenko str., 24a

Ph.D. **Victoria V. Nazarova**, vvnazarova@yandex.ru

ITMO University  
197101, Russia, St. Petersburg, Kronverkskiy ave., 49

*The article deals with the effect of dairy products matrices on the chromatographic separation of azo-, triphenylmethane, and indigo carmine synthetic dyes that are permitted currently for use in the food industry in Russian Federation. The well-known method of determining the content of dyes is reproduced. Research objects are: pasteurized milk, biokefir and yogurt, into which the following complex of synthetic dyes was added: Tartrazine (E102), Sunset yellow FCF (E110), Azorubine (E122), Amaranthe (E123), Ponceau 4R (E124), Allura red AC (E129), Patent blue V (E131), Indigotine (E132) and Green S (E142), with concentration of each being 10 ppm. Researches were conducted by means of Shimadzu LC-20 Prominence liquid chromatograph. When samples of*

*dairy products are filtered through a membrane filter with pore diameter of 0.2  $\mu\text{m}$  a significant loss of dye, which negatively affects the metrological characteristics of measurement techniques, is found to occur. The effectiveness of the alternative method for identification and determination of synthetic dye content in dairy products by chromatography is proved. The extraction rate of synthetic food dyes added in the matrices of dairy products is 74.7–99.2% for all types of dairy products being investigated. At the same time relative standard deviations of the peak area and peak retention time of dyes are within 5% that justifies the use of chromatography. Chromatography time doesn't exceed 15 min that, in turn, allows to carry out control synthetic dyes in food in due time.*

**Keywords:** synthetic food dyes; adulteration of dairy products; stabilization of proteins; chromatographic separation.

## Введение

Широкое применение пищевых синтетических красителей в производстве продуктов питания привело к необходимости разработки современных и оперативных методов их качественного и количественного контроля [1]. Синтетические красители не безвредны и в определенных концентрациях могут оказывать негативное влияние на здоровье человека, в частности, вызывать различные аллергические реакции и гиперактивность у детей [2].

Несмотря на их регламентированное применение в пищевой продукции, существующие случаи бесконтрольного использования синтетических красителей приводят к превышению допустимых концентраций и фальсификации продуктов. В связи с этим необходим оперативный контроль их содержания в продуктах питания, что является сложной задачей, связанной с трудностью их извлечения из сложных пищевых матриц.

Нормативные документы для определения синтетических пищевых красителей в пищевой продукции начали разрабатывать с 1992 г. в связи со значительным притоком на российский рынок импортных товаров. Настоящим прорывом в этом направлении следует считать период с 1999 по 2002 г., когда был разработан способ, основанный на сорбции красителей из пищевых продуктов на окись алюминия [3–5] с последующим хроматографическим разделением и денситометрическим измерением содержания красителей [6–8]. Позже стали прорабатываться и другие подходы, связанные с привлечением высокоаналитических средств измерений [3, 9].

Авторами критически рассмотрен разработанный в 2009 г. нормативный документ [10], регламентирующий методику измерения содержания красителей в молочных продуктах при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), имеющий ряд недостатков:

- неудовлетворительные метрологические характеристики результатов измерений – границы относительной погрешности от 45 до 57%;
- объектов измерений – красителей – всего пять из значительно большего многообразия искусственных ингредиентов, используемых в настоящее время для придания цвета пищевым продуктам;
- детектирование проводится на разных длинах волн, сообразно максимумам светопоглощения каждого красителя, что значительно усложняет и замедляет анализ.

Указанные недостатки создают немалые трудности для специалистов, занятых анализом красителей в молочных продуктах и существенно снижают значение самого нормативного документа.

Цель данной работы состояла в подборе хроматографических условий, обеспечивающих наилучшие временные и метрологические характеристики результатов анализа с одновременным увеличением объектов измерений, на которых распространяется методика измерений.

## Теоретическая часть

В настоящее время многие натуральные источники энергии для человека в значительной степени замещены идентичными натуральным или искусственными ингредиентами. Это в полной мере относится к жирам и углеводам, но не к белкам, которые имеют сложный состав и незаменимость функций аминокислотных звеньев для жизнедеятельности человека.

Использование пищевых синтетических красителей для придания необходимой цветовой гаммы молочной продукции с химической точки зрения тесно связано с взаимодействием сульфонатриевых

групп, входящих в состав всех разрешенных сегодня в пищевой промышленности синтетических красителей [3] с радикалами аминокислот.

Изначально предполагалось, что красители должны быть отделены от белковой матрицы либо в процессе проведения подготовки проб, либо, если не удастся подобрать условия для количественного извлечения, непосредственно на колонке. Основное преимущество последнего подхода в ускорении анализа в целом, а существенные недостатки – частая смена предколонок и наличие неинформативных пиков, затрудняющих обработку хроматографических данных. Если будет установлено, что наличие таких пиков не препятствует чтению хроматограмм, подход следует признать приемлемым.

Имеющиеся научные данные о конфигурации и конформации белковых матриц свидетельствуют о том, что в глобулярных белках гидрофобные участки молекулы находятся в глубине молекулы [11–14]. Соединяясь между собой, гидрофобные радикалы образуют кластеры. Это является проявлением двойственности свойств белковой молекулы: на поверхности молекулы – гидрофильные группировки, поэтому молекула в целом гидрофильная, а в глубине молекулы – спрятаны гидрофобные радикалы. Взаимодействие белка с ингредиентами пищевых продуктов часто приводит к сорбции молекулы этих веществ молекулами белка. В молоке содержится в среднем около 3,2% белков. Основным белком молока является казеин, содержание которого в молоке составляет от 2,3 до 2,9%.

К факторам стабилизации белка в растворе следует отнести:

- наличие гидратной оболочки – слоя молекул воды, определенным образом ориентированных на поверхности белковой молекулы. Вода гидратной оболочки обладает особым свойством: окружая молекулы белка, она не дает им сблизиться, соединиться и выпасть в осадок;
- наличие свободных заряженных групп. Изоэлектрическая точка (ИЭТ), т.е. кислотность среды, при которой поверхность не несет электрического заряда, большинства белков находится в слабокислой среде. Для казеина она составляет 4,6. Это означает, что количество кислотных групп в нем больше количества основных.

Когда стоит задача осаждения белков из раствора, то необходимо лишить его обоих факторов стабилизации: и заряда, и гидратной оболочки. Для устранения гидратной оболочки широко применяют высаливание, т.е. осаждение белков высокими концентрациями нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов, поскольку такие соли очень гидрофильны и обладают в высоких концентрациях водоотнимающими свойствами. По мере добавления к раствору белка они сначала растворяются в свободной воде, а затем при дальнейшем повышении концентрации соли конкурируют с белками за обладание водой, которая входит в состав гидратных оболочек [12, 15]. Тем не менее, в сильно кислой или сильно щелочной среде молекулы белка в осадок не выпадают, поскольку у них остается один из факторов стабилизации – заряд. Заряд белковой молекулы устраняют, приблизив рН среды к ИЭТ.

Если бы удалось количественно перевести красители в надосадочную жидкость, то такой подход получил бы обоснование. В противном случае коагуляция белковых матриц, несущих значительную часть красителей, – процесс скорее нежелательный, ведущий к неприемлемым потерям при выделении анализируемых компонентов.

### **Результаты предварительных испытаний**

Воспроизведена методика определения содержания красителей, изложенная в [10]. Установлено, что на стадии фильтрации пробы молочных продуктов через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм имеет место значительная потеря красителей. То же наблюдается при центрифугировании анализируемых проб. Промывка фильтра и осадка после центрифугирования с последующим объединением проб ситуации не изменила. Использование физических факторов денатурации белков – ультразвукового воздействия рабочей частотой 40 кГц и нагревания до 60°C – также не дало положительного результата.

При использовании химических факторов воздействия на белки с последующей фильтрацией было выявлено следующее: применение нейтральных солей (хлорида натрия и кальция) и органических растворителей (метанола, ацетона) значительно не повлияло на степень извлечения красителей; при добавлении 10% гидроксида натрия со сдвигом рН до 8,5–9,0 степень извлечения отдельных красителей

(E102, E110, E142) достигала приемлемых значений – более 85%, зато для другой группы красителей (E122, E131, E132) составляла менее 40%. Сдвиг рН в кислую сторону до 3,0 привел только к агрегации белков при хорошо заметном визуальном обесцвечивании исследуемого продукта.

Учитывая полученные результаты, было решено отказаться от проведения многостадийной подготовки пробы и ограничиться подщелачиванием анализируемых образцов (рН 7,5–8,0).

### Объекты и методы исследования

Исследуемые образцы: пастеризованное молоко, биокефир и йогурт, в состав которых вводился сложный комплекс синтетических красителей: «Тартразин» (E102), «Желтый солнечный закат» (E110), «Кармуазин» (E122), «Амарант» (E123), «Понсо 4R» (E124), «Красный очаровательный АС» (E129), «Синий патентованный V» (E131), «Индигокармин» (E132) и «Зеленый S» (E142) с концентрацией 10 ppm каждый.

Для проведения эксперимента использовали жидкостный хроматограф Shimadzu LC-20 Prominence в базовой комплектации, без детектора на основе диодной матрицы, поскольку измерения проводились на определенных длинах волн с максимальным упрощением анализа. Полученные результаты обрабатывались посредством пакета прикладных программ к хроматографическому оборудованию Shimadzu LCsolution. Реагенты: ацетонитрил, ос. ч., «Криохром», сорт 0; натрия ацетат, *Sigma*.

Хроматографические условия:

Колонка	250×4,6 мм, октадецилсиликагель, 5 мкм, Inertsil C18 (2) 150A, Phenomenex с предколонкой KJO-4282
ПФ	0,02 М раствор натрия ацетата – ацетонитрил с программно изменяемым градиентом состава подвижной фазы: от 95:5 до соотношения компонентов 60:40 в течение первых 3 мин и далее 12 мин при соотношении 60:40
Скорость потока	1,0 мл/мин
Температура колонки	25°C
Детектор	280 нм и 370 нм
Объем пробы	82 мкл
Время хроматографирования	15 мин
Время удерживания	показано на рисунке

Результаты анализа считались достоверными, если выполнялись требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Для проверки пригодности уравнивали хроматографическую систему до стабилизации базовой линии.

Для оценки чувствительности хроматографировали раствор, для приготовления которого в колбе объемом 500 мл дистиллированной водой растворяли по 1 мл красителей «Тартразин» (E102) и «Синий патентованный V» (E131). Хроматографическая система считалась пригодной, если отношение сигнал–шум для пиков красителей было не менее 10.

Последовательно хроматографировали раствор для проверки пригодности хроматографической системы не менее пяти раз. Хроматографическая система считалась пригодной, если выполнялись следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанной по пикам красителей, не менее 5000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пиков красителей не более 2,0;
- относительное стандартное отклонение площадей и времени удерживания пиков красителей не более 5%.

### Полученные результаты

Типовые хроматограммы раствора сравнения, содержащего комплекс синтетических красителей в деионизированной воде, и раствора того же комплекса красителей в той же концентрации в матрице образца молочной продукции показаны на рисунке.

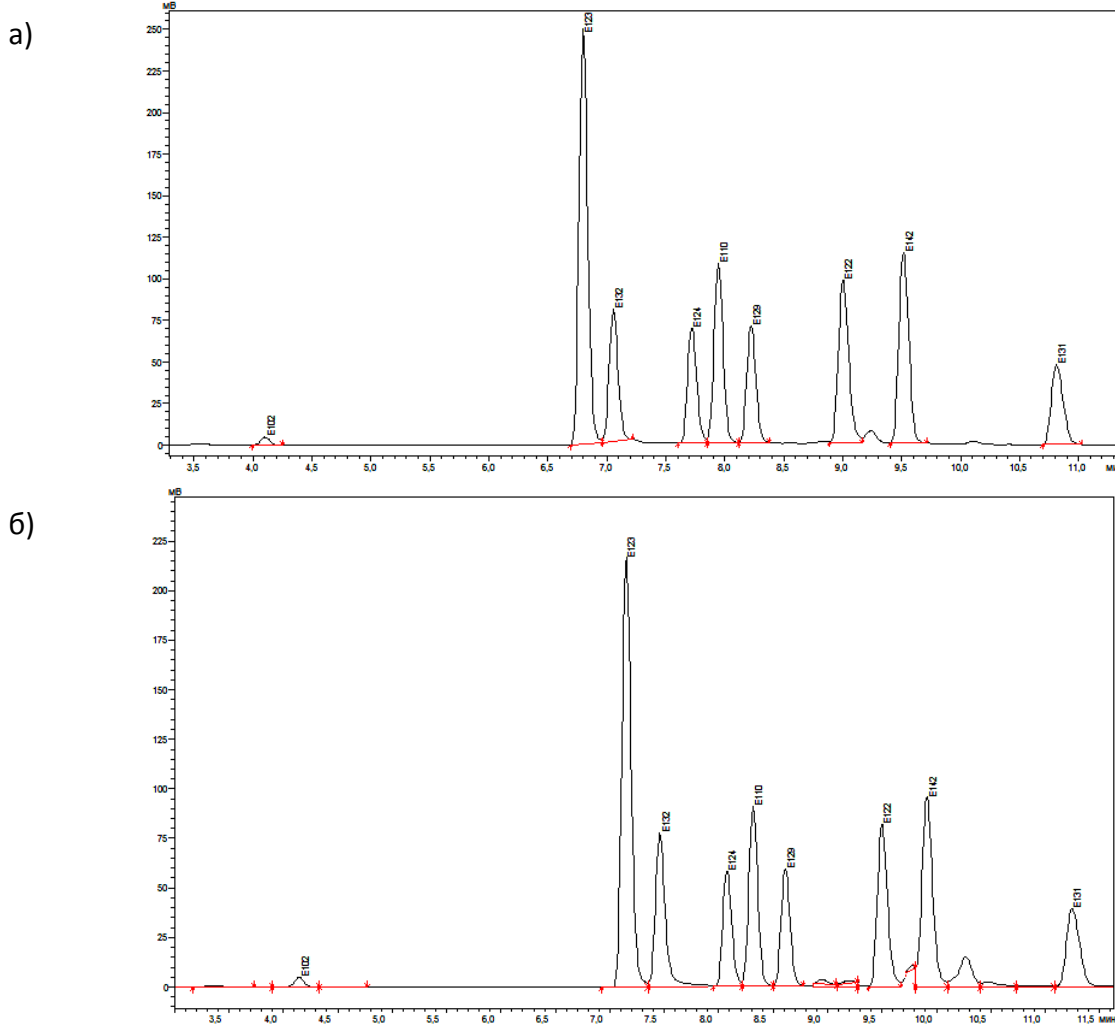


Рисунок – Хроматограммы окрашенных растворов

а) хроматограмма раствора сравнения, содержащего комплекс пищевых синтетических красителей в деионизированной воде; б) хроматограмма раствора того же комплекса красителей, в той же концентрации, в матрице биокефира

Полнота извлечения введенных в матрицы молочной продукции пищевых синтетических красителей определялась путем обработки данных хроматограмм раствора сравнения, содержащего комплекс пищевых синтетических красителей в деионизированной воде и раствора того же комплекса красителей в той же концентрации в матрице молочной продукции (таблица).

Таблица – Полнота извлечения пищевых синтетических красителей из матриц молочной продукции

Краситель	Время удерживания	Полнота извлечения из продукта при 370* нм, %		
		молоко	биокефир	йогурт
E102	6,080**	91,3***	90,3	98,3
E123	8,854	76,9	74,7	72,1
E132	9,102	90,7	86,5	88,8
E124	9,771	86,8	86,5	85,3
E110	9,987	90,7	97,6	93,9
E129	10,262	99,2	93,7	91,1
E122	11,063	91,1	92,3	92,7
E142	11,664	91,1	88,1	86,2
E131	13,154	98,1	92,1	95,3

\* Указанная длина волны не приходится на максимум поглощения какого-либо из исследуемых пищевых синтетических красителей, но позволяет проводить идентификацию и определение содержания красителей на основании сравнения с рабочими стандартными образцами. Выбор длины волны в данном случае обусловлен избирательным поглощением красителей. Прочие ингредиенты в таких условиях в значительной степени не препятствуют детектированию.

\*\* Идентификация красителей проводилась также с использованием внутреннего стандарта: исследуемый раствор разбавлялся 1:2 раствором сравнения. На полученных хроматограммах посторонних пиков обнаружено не было, а анализ площадей и форм пиков однозначно указывал на правильность идентификации.

\*\*\* Для количественного анализа интерес представлял только йогурт, поскольку в молоке и не ароматизированных кисломолочных продуктах, согласно требованиям Технического регламента таможенного Союза ТР ТС 029/2012 [2], красителей быть не должно. Данные по содержанию красителей в молоке и биокефире даны в качестве сравнения.

### Обсуждение результатов и выводы

Водные растворы пищевых синтетических красителей легко проходят через инертный фильтр, размеры пор которого на несколько порядков больше размера молекул любого из взятых на анализ образцов красителей, находящихся в растворе. Для смывания остаточного количества красителя с фильтра обычно достаточно использовать слегка подщелоченную воду (рН 7,5–8,0) для предотвращения ионизации сульфонатриевых групп. Следовательно, потери на этой стадии подготовки пробы могут быть объяснены только сорбционным удерживанием красителей матриксами белков молочных продуктов. То же самое имеет место при центрифугировании. Физические и химические пути воздействия, призванные усилить десорбцию красителей из белковых матриксов, должного воздействия не возымели, вследствие чего было принято решение отказаться от проведения многостадийной подготовки пробы, ограничившись лишь подщелачиванием анализируемых образцов.

В ходе исследования подобраны хроматографические условия, существенно повышающие, по сравнению с изложенными в [10] измерениями, эффективность метода ВЭЖХ для идентификации и определения содержания в молочных продуктах пищевых синтетических красителей азо-, трифенилметанового и индигоидного ряда, разрешенных к применению в пищевой промышленности. Степень извлечения девяти исследуемых красителей, определяемая путем расчета площадей пиков анализируемых образцов и образцов сравнения, составила 74,7–99,2% для всех видов исследуемых молочных продуктов. При этом время хроматографирования составило 15 мин, а относительные стандартные отклонения площадей и времени удерживания пиков красителей составили не более 5%, что обеспечивает прохождение проверки пригодности хроматографической системы.

### Литература

1. *Титова Н.Д.* Пищевые добавки как алиментарные аллергены // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008. № 2. С. 41–46.
2. ТР ТС 029/2012. Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств // Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю): утв. комиссией ТС 25.05.2010 [с изм. на 10.11.2015]. М., 2011. 331 с.
3. *Пацовский А.П., Рудометова Н.В., Каменцев Я.С.* Электрофоретическое определение синтетических красителей в алкогольных напитках // Журнал аналитической химии, 2004. Т. 59. № 2. С. 170–175.
4. *Рудометова Н.В., Красникова Е.В.* Методика контроля синтетических красителей в пряностях // Пищевые ингредиенты: сырье и добавки. 2008. № 1. С. 51–52.
5. *Рудометова Н.В.* Больше внимания контролю пищевых красителей // Кондитерское производство. 2010. № 1. С. 27–28.
6. *Пацовский А.П.* Текущее состояние мониторинга красителей в пищевых продуктах // Контроль. Диагностика. 2016. № 5. С. 68–72.
7. *Рудометова Н.В., Попов В.С.* Методика контроля синтетических красителей в консервированных компотах // Пищевые ингредиенты: сырье и добавки. 2008. № 2. С. 82.

8. Рудометова Н.В., Красникова Е.В. Синтетические красящие вещества в пряностях // Хранение и переработка сельхозсырья. 2009. № 8. С. 23–24.
9. Пацовский А.П. Красители пищевые. Методы их анализа в продовольственных товарах. Lambert Academic Publishing, 2016. 328 с.
10. ГОСТ Р 53752-2009. Молоко и молочная продукция. Определение содержания консервантов и красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Введ. 15.12.2009. М.: Стандартинформ, 2010. 16 с.
11. Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., van Boekel M.A.J.S. *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. 189 p.
12. Тенел А. Химия и физика молока. М.: Пищевая промышленность, 1979. 323 с.
13. Ling G. *Life at the cell and below-cell level: The hidden history of a fundamental revolution in biology*. Pacific Press, New York, 2001.
14. Pollack G.H. *The fourth phase of water: beyond solid, liquid, and vapor*. Ebner and Sons Publishers, Seattle WA, 2014.
15. Friggens N.C., Ridder C., Løvendahl P. On the use of milk composition measures to predict the energy balance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2007, Vol. 90, no. 12, pp. 5453–5467.

### References

1. Titova N.D. Pishchevye dobavki kak alimentarnye allergeny [Nutritional supplements as alimentary allergens]. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2008, no. 2, pp. 41–46.
2. TR TS 029/2012. Trebovaniya bezopasnosti pishchevykh dobavok, aromatizatorov i tekhnologicheskikh vspomogatel'nykh sredstv. *Edinye sanitarno-epidemiologicheskie i gigienicheskie trebovaniya k produkcii (tovaram), podlezhashchei sanitarno-epidemiologicheskomu nadzoru (kontrolyu)* [Uniform sanitary and epidemiological and hygienic requirements for the product (goods) subject to sanitary-and-epidemiologic supervision (control)]. Moscow, 2011, 331 p.
3. Patsovskii A.P., Rudometova N.V., Kamentsev Ya.S. Elektroforeticheskoe opredelenie sinteticheskikh krasitelei v alkogol'nykh napitkakh [Electrophoretic determination of synthetic dyes in alcoholic beverages]. *Journal of Analytical Chemistry*. 2004, V. 59, no. 2, pp. 170–175.
4. Rudometova N.V., Krasnikova E.V. Metodika kontrolya sinteticheskikh krasitelei v pryanostryakh [Methods of synthetic dyes in spices monitoring // Food ingredients: raw materials and additives]. *Food ingredients: raw materials and additives*. 2008, no. 1, pp. 51–52.
5. Rudometova N.V. Bol'she vnimaniya kontrolyu pishchevykh krasitelei [More attention to the control of food dyes]. *Confectionery production*. 2010, no. 1, pp. 27–28.
6. Patsovskii A.P. Tekushchee sostoyanie monitoringa krasitelei v pishchevykh produktakh [The current state of dyes in food monitoring]. *Control. Diagnostics*. 2016, no. 5, pp. 68–72.
7. Rudometova N.V., Popov V.S. Metodika kontrolya sinteticheskikh krasitelei v konservirovannykh kompotakh [Methods of synthetic dyes in the control of canned compotes]. *Food ingredients: raw materials and additives*. 2008, no. 2, P. 82.
8. Rudometova N.V., Krasnikova E.V. Sinteticheskie krasyashchie veshchestva v pryanostryakh [Synthetic dyes in spices]. *Storage and processing of agricultural raw materials*. 2009, no. 8, pp. 23–24.
9. Patsovskii A.P. *Krasiteli pishchevye. Metody ikh analiza v prodovol'stvennykh tovarakh* [Food colors. Methods of analysis of food products]. Lambert Academic Publishing, 2016. 328 p.
10. GOST R 53752-2009. *Moloko i molochnaya produkciya. Opredelenie sodержaniya konservantov i krasitelei metodom vysokoeffektivnoi zhidkostnoi khromatografii* [State Standard 53752-2009. Milk and dairy products. Determination of content of preservatives and dyes by method of a highly effective liquid chromatography]. Moscow, Standartinform Publ., 2010. 16 p.
11. Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., van Boekel M.A.J.S. *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. 189 p.
12. Tepel A. *Khimiya i fizika moloka* [Chemistry and physics of milk]. Moscow, Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1979. 323 p.
13. Ling G. *Life at the cell and below-cell level: The hidden history of a fundamental revolution in biology*. Pacific Press, New York, 2001.
14. Pollack G.H. *The fourth phase of water: beyond solid, liquid, and vapor*. Ebner and Sons Publishers, Seattle WA, 2014.
15. Friggens N.C., Ridder C., Løvendahl P. On the use of milk composition measures to predict the energy balance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2007, Vol. 90, no. 12, pp. 5453–5467.

Статья поступила в редакцию 14.07.2016