

Определение красящих веществ в пищевых добавках, содержащих краситель Кармины E120, с использованием спектрофотометрического и хроматографических методов

Канд. хим. наук **Н.В. Рудометова**^{1,2}, natrudjob@mail.ru
И.С. Ким¹, kimirishka@mail.ru, **К.В. Курилов**¹, kvkbbk@bk.ru

¹ВНИИПД – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова, РАН
 191014, Россия, Санкт-Петербург, Литейный пр., 55

²Университет ИТМО
 190002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

Российская нормативная база не обеспечивает полного контроля над использованием красителей в пищевых производствах, что является одной из причин фальсификации пищевой продукции. Существующие подходы к качественной и количественной оценке пищевых красителей в действующей нормативной документации базируются, преимущественно, на анализе основного красящего вещества в индивидуальных пищевых красителях. Для фальсификации пищевого красителя Кармины E120 чаще всего используется пищевой краситель Понсо 4R E124 и 4-аминокарминовая кислота. Проведена оценка приемлемости методов спектрофотометрии, высокоэффективной тонкослойной и жидкостной хроматографии для идентификации и количественного анализа красителей Кармины E120, Понсо 4R E124 и 4-аминокарминовой кислоты при их совместном присутствии. Выбраны элюенты для идентификации карминовой кислоты и Понсо 4R методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. По результатам проведенных экспериментов выбраны условия, обеспечивающие разделение красителей с индексами удерживания ($4,5 \pm 0,2$) мин для карминовой кислоты, ($7,3 \pm 0,2$) мин для Понсо 4R, ($3,6 \pm 0,2$) мин для 4-аминокарминовой кислоты. С использованием метода внешнего стандарта определено содержание красителей при их совместном присутствии в образцах. Предложен последовательный комплексный подход к анализу красителей и разработаны условия их идентификации. Проведен анализ 37 коммерческих образцов пищевых добавок, в маркировке которых указан краситель Кармины E120. В 12 образцах обнаружены фальсифицирующие красящие вещества. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости контроля пищевых красителей и комплексных пищевых добавок, содержащих Кармины, на наличие в них красителей Понсо 4R E124 и 4-аминокарминовой кислоты для предотвращения фальсификации и обеспечения требований безопасности. Предложенные методы имеют практическое значение и могут быть рекомендованы для контроля красителей на предприятиях пищевой отрасли и в контролирующих организациях.

Ключевые слова: пищевые красители; карминовая кислота; 4-аминокарминовая кислота; фальсификация; безопасность пищевой продукции; спектрофотометрия; тонкослойная хроматография; высокоэффективная жидкостная хроматография.

DOI: 10.17586/2310-1164-2020-10-2-29-40

Colouring substances determination in food additives containing Carmine E120, using spectrophotometric and chromatographic methods

Ph.D. **Natalya V. Rudometova**^{1,2}, natrudjob@mail.ru
Irina S. Kim¹, kimirishka@mail.ru, **Kirill V. Kurilov**¹, kvkbbk@bk.ru

¹All-Russian Research Institute for Food Additives – Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS
 55, Liteyniy ave., St. Petersburg, 191014, Russia

²ITMO University
 9, Lomonosov str., St. Petersburg, 190002, Russia

Russian national standards do not provide full control over the use of colours in food production. This is one of the reasons for the falsification of food products. The current normative documentation contains mainly qualitative and quantitative methods for the analysis of the main coloring substances in individual food colors. Carmines E120 food colour is most often falsified by Ponceau 4R E124 and 4-aminocarminic acid. The acceptability of spectrophotometric and chromatographic methods for the identification and quantitative analysis of Carmines E120, Ponceau 4R E124, and 4-aminocarminic acid with their joint presence was

determined. Elements for the identification of carminic acid and Ponceau 4R by high-performance thin-layer chromatography were selected. Conditions were selected that ensure the separation of colours with retention indices of (4.5 ± 0.5) minutes for carmine acid, (7.3 ± 0.2) minutes for Ponceau 4R, and (3.6 ± 0.2) minutes for 4-aminocarminic acid. The colour content in the samples was determined by the method of external standard. A consistent integrated approach to the analysis of colours is proposed and conditions for their identification are developed. The conditions for reverse phase high performance liquid chromatography for the quantitative determination of colours have been developed. The analysis of 37 commercial samples of food additives containing carminic acid was carried out. Falsifying colouring matters were found in 12 samples. The need for identification of carminic acid in food colours and complex food additives is confirmed. A consistent integrated approach to the analysis of Carmines E120, Ponceau 4R E124, and 4-aminocarminic acid in food additives will prevent their falsification and ensure food safety. The proposed methods can be recommended for colour control in laboratories and in food production.

Keywords: food colours; carminic acid; 4-aminocarminic acid; falsification; food safety; spectrophotometry; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography.

Введение

Цвет пищевого продукта, без сомнения, одна из самых важных характеристик, определяющих выбор потребителя. С другой стороны, вызывают настороженность продукты, в составе которых присутствуют красители, получаемые методами химического синтеза, что побуждает производителей заменять их природными красителями растительного или животного происхождения. Красители – пищевые добавки, предназначенные для придания, усиления или восстановления окраски пищевой продукции, относятся к наиболее часто и широко применяемым пищевым ингредиентам. Наряду с красителями – пищевыми добавками используются и комплексные пищевые добавки, в состав которых могут входить различные по своей химической природе красители и другие ингредиенты. Так как применение большинства красителей регламентировано техническими регламентами Таможенного союза, необходимо контролировать качественный и количественный состав красителей в комплексных пищевых добавках и пищевой продукции. Результаты регулярно проводимого нами мониторинга [1, 2] показали, что фальсификация красителей в пищевых добавках достигает в ряде случаев 50%. Одной из причин нарушений пищевого законодательства недобросовестными производителями является то, что российская нормативная база пока не обеспечивает полного контроля над использованием красителей.

Краситель Кармины E120 является одним из наиболее востребованных [3]. Основным красящим веществом красного пищевого красителя Кармины E120 является карминовая кислота (7-D-глюкопиранозил-3,5,6,8-тетрагидрокси-1-метил-9,10-диоксоантрацен-2-карбоновая кислота) и алюминиевый лак (хелат) карминовой кислоты (КК) [4]. Краситель получают из водных, водно-спиртовых или спиртовых экстрактов высушенных тел самок насекомых *Dactylopius coccus Costa* (кошенили), паразитирующих на кактусах рода *Opuntia*. Красные красители антрахинонового строения можно получать и из насекомых других видов: *Porphyrophora polonica*, *Porphyrophora hamelii*, *Kermes vermilio*, *Kermococcus vermilis Planchon* и *Kerria lacca* [5, 6]. Техническим регламентом Таможенного союза 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» установлен максимальный допустимый уровень КК в пищевой продукции, который, в зависимости от вида продукции, колеблется от 50 до 500 мг/кг. Критерии чистоты красителя Кармины не регламентированы, что создает условия для его фальсификации пищевым красителем Понсо 4R E124, который из-за сходства цвета даже имеет несистематическое название «кошенилевый красный», и 4-аминокарминовой кислотой (АКК). Цвет растворов АКК, в отличие от КК не зависит от pH. Данные о токсичности АКК отсутствуют, ее допустимое суточное поступление в организм человека не установлено, поэтому она не разрешена для использования в производстве пищевой продукции [7].

Для идентификации красителей применяют методы спектрофотометрии (СФ) [7], высокоэффективной тонкослойной (ВЭТСХ) [2] или жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии [8–10] с изократическим [11] и градиентным элюированием [12–14], а также другие инструментальные методы анализа [15, 16]. Приведенные в статьях методики не являются универсальными и не распространяются на анализ

Карминов Е120, Понсо 4R Е124 и АКК при их совместном присутствии в комплексных пищевых добавках и продуктах. Регламентация применения красителей в производстве пищевой продукции, в том числе Карминов Е120 и Понсо 4R Е124, существенно различается. В связи с этим для соблюдения требований безопасности и предотвращения фальсификации пищевой продукции, при входном контроле на производственных предприятиях и испытательных лабораториях, часто не требуется проведение количественного анализа, достаточно идентифицировать состав красящих веществ пищевой добавки. В зависимости от решаемой задачи, выбор метода анализа будет определяться не только составом добавки, но и оснащенностью и квалификацией персонала каждой конкретной лаборатории.

Цель работы заключалась в исследовании коммерческих образцов пищевых красителей и комплексных пищевых добавок, содержащих краситель Кармины Е120, разработке методов качественного и количественного анализа для предотвращения фальсификации и обеспечения безопасного применения красителей в производстве пищевой продукции.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили образцы коммерческих пищевых красителей и комплексных пищевых добавок, содержащих КК, согласно маркировке. В работе использовалась деионизованная вода с удельным сопротивлением 18,2 Мом·см при 25°C, химически чистые и особо чистые реактивы, пищевые красители (Roha Dyechem Pvt. Ltd., Индия) в качестве образцов сравнения (ОС).

Качественный и количественный анализ образцов проводили на дуолучевом сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 в соответствии с методиками [4, 7], методом ВЭТСХ на тонкослойных пластинах Sorbfil ПТСХ-П-В и TLC Cellulose, Merck и методом обращенно фазовой ВЭЖХ на хроматографе VARIAN 920 – LC с диодно-матричным детектором на колонках Chromsep Microsorb 100 5 C18 250×4,6 мм (5 мкм) и Polaris C8A 150×4,6 мм (5 мкм). Пробы предварительно фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Объем вводимых проб – от 20 до 50 мм³. Параметры ВЭТСХ анализа представлены в таблице 1, условия хроматографического разделения и режимы элюирования приведены в таблице 2. Обработку полученных хроматограмм проводили с использованием программы GALAXIE. Математическую обработку экспериментальных данных проводили в программах Microsoft Excel 2013. Все измерения проводили в трех повторностях, доверительные интервалы рассчитывали для доверительной вероятности $P = 95\%$.

Таблица 1. Условия анализа красителей методом ВЭТСХ

Table 1. Conditions for the colors assay by HPTLC method

Элюент	Состав элюента в объемных соотношениях	ТСХ пластина	Литература
1	пиридин : 3-метил-1-бутанол : 2-метилпропанол-1 : этанол : аммиак 25% (3:3:3:4:4)	Sorbfil ПТСХ-П-В	[17]
2	н-этилэтанамин : трихлорметан: этанол : аммиак 12,5% (6:5:6:3)	Sorbfil ПТСХ-П-В	[17]
3	1/15 М фосфатный буферный раствор с рН 5,6	Cellulose Merck	[18]
4	петролейный эфир : этилацетат (9:1)	Sorbfil ПТСХ-П-В	[19]
5	вода : хлористоводородная кислота : метановая кислота (8:4:1)	Cellulose Merck	[19]
6	пропан-2-он : бутан-2-он : аммиак 25% : вода (60:140:1:60)	Sorbfil ПТСХ-П-В	[20]

Таблица 2. Условия анализа красителей методом ВЭЖХ

Table 2. Conditions for the colours assay by HPLC method

Колонка	Элюент		Режим элюирования	Скорость потока, см ³ /мин	Температура колонки, °С	Литература
	№	Состав				
Chromsep Microsorb 100 5 C18, 250x4,6 мм 5 мкм	7	0,1% раствор метановой кислоты : ацетонитрил	градиентный	0,8	35	[6]
	8	0,004 М фосфатный буферный раствор с рН 6,0 : ацетонитрил	изократический	0,8	28	[3]
	9	0,02 М раствор ацетата натрия : ацетонитрил	градиентный	0,8	28	[21]
	10	0,02 М раствор ацетата натрия : ацетонитрил	изократический	0,8	28	–
	11	0,1 М раствор ацетата аммония : ацетонитрил	градиентный	1,0	40	[22]
Polaris C8 A, 150x4,6 мм 5 мкм	12	2% раствор этановой кислоты : ацетонитрил	изократический	0,6	40	[13]
	13	2% раствор этановой кислоты : ацетонитрил	градиентный	0,6	40	[13]
	14	0,004 М фосфатный буферный раствор с рН 6,0 : ацетонитрил	градиентный	0,6	28	[3]
	15	0,02 М раствор ацетата натрия : ацетонитрил	градиентный	0,6	40	–
	16	0,02 М раствор ацетата натрия : ацетонитрил	изократический	0,6	28	–

Результаты и обсуждение

Результаты анализа ОС красителей показали, что достоверно идентифицировать СФ методом КК и Понсо 4R при их совместном присутствии в анализируемом образце, практически невозможно, так как спектры поглощения перекрываются (рисунок 1) и имеют близкие максимумы (таблица 3).

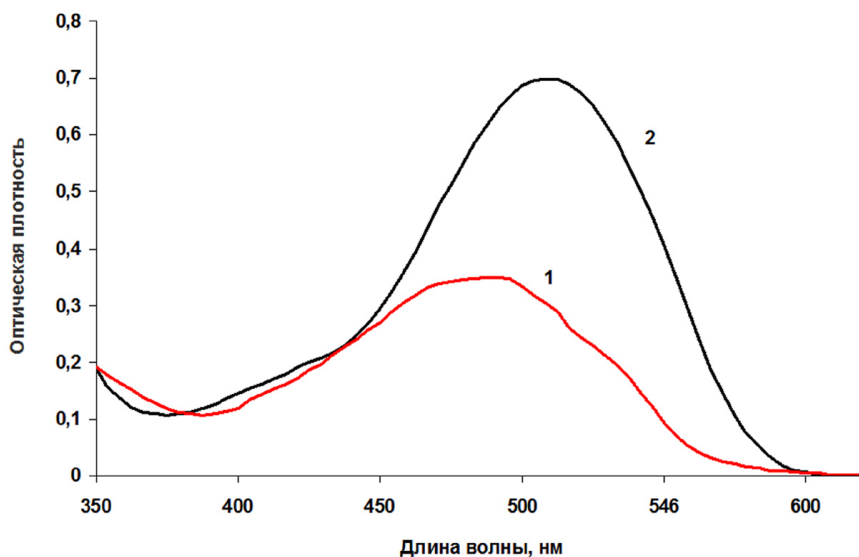


Рисунок 1– Спектры поглощения образцов сравнения красителей в воде: 1 – карминовая кислота; 2 – Понсо 4R
 Figure 1. Absorption spectrum for comparison samples of the colours in water: 1 – carminic acid; 2 – Ponceau 4R

Таблица 3. Результаты спектрофотометрического анализа образцов сравнения красителей
Table 3. Spectrophotometric analysis results for comparison samples of colours

Показатель	ОС красителя		
	Понсо 4R	КК	АКК
Максимум светопоглощения, нм:			
в воде	506 ± 1	493 ± 1	–
в 0,1н хлористоводородной кислоте	506 ± 1	493 ± 1	530 ± 1; 565 ± 1
в водном растворе аммиака с рН 9,5	506 ± 1	518 ± 1	535 ± 1; 572 ± 1
Удельный коэффициент светопоглощения, % ⁻¹ · см ⁻¹ [4, 7]:			
в воде	430	–	–
в 0,1н хлористоводородной кислоте	–	139	–
в водном растворе аммиака с рН 9,5	–	–	260

Спектр поглощения КК, в отличие от АКК, имеет батохромный сдвиг максимума (25 ± 2 нм) при изменении рН растворов с 2 до 9,5 ед. рН (рисунки 2 и 3), что является одним из идентификационных признаков КК.

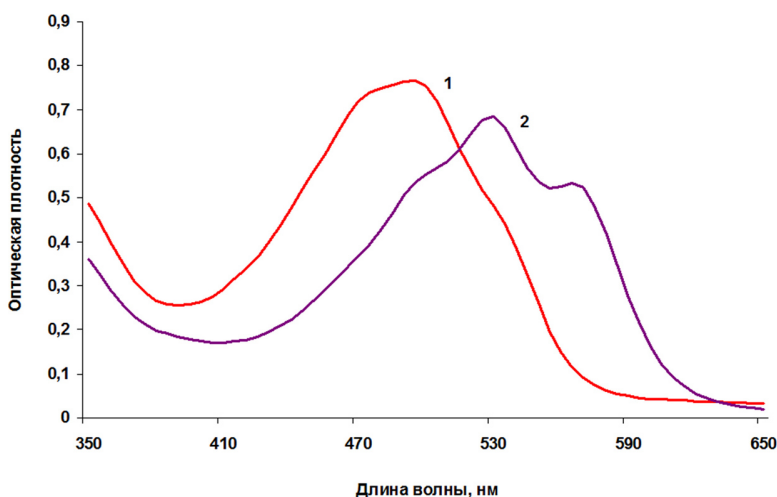


Рисунок 2 – Спектры поглощения образцов сравнения красителей в 0,1 н растворе соляной кислоты: 1 – карминовая кислота; 2 – 4-аминокарминовая кислота

Figure 2. Absorption spectra for comparison samples of the colours in 0.1 N hydrochloric acid solution: 1 – carminic acid; 2 – 4-aminocarminic acid

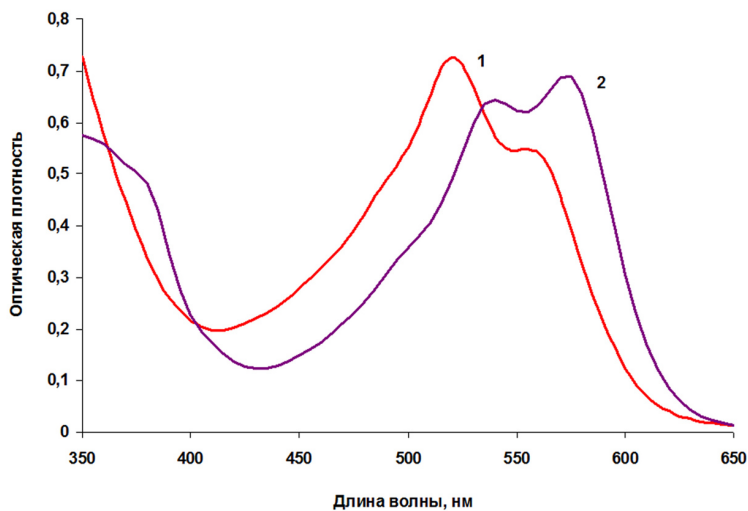


Рисунок 3 – Спектры поглощения образцов сравнения красителей в водном растворе аммиака с рН 9,5: 1 – карминовая кислота; 2 – 4-аминокарминовая кислота

Figure 3. Absorption spectra for comparison samples of the colours in aqueous ammonia solution, pH 9,5: 1 – carminic acid; 2 – 4-aminocarminic acid

При апробации разработанных нами ранее условий ВЭТСХ анализа синтетических красителей [17], были определены факторы удерживания (R_f) и установлено, что на пластинах Sorbfil ПТСХ-П-В при использовании элюентов № 1 и 2 происходит разделение КК и Понсо 4R (таблица 4). Апробация этих элюентов для разделения КК и АКК, показала, что факторы их удерживания различаются незначительно. Поэтому для идентификации АКК предложены элюенты № 3 и № 5 (таблица 4). Примеры результатов идентификации красителей представлены на рисунках 4 и 5.

Таблица 4. Результаты ВЭТСХ анализа образцов сравнения красителей

Table 4. HPTLC analysis results for comparison samples of the colours

Условия анализа		Значения R_f ОС красителей			
элюент		ТСХ пластина	Понсо 4R	КК	АКК
№	состав, об. соотношения				
1	пиридин : -метил-1-бутанол : 2-метилпропанол-1 : этанол : аммиак 25 % (3 : 3 : 3 : 4 : 4)	Sorbfil ПТСХ-П-В	0,23 ± 0,03	0,00	0,06 ÷ 0,33
2	н-этилэтанамиин : трихлорметан: этанол : аммиак 12,5 % (6 : 5 : 6 : 3)	Sorbfil ПТСХ-П-В	0,42 ± 0,03	0,00	0,00
3	1/15 М фосфатный буферный раствор с рН 5.6	Cellulose Merck	0,40 ± 0,03	0,95 ± 0,02	0,26 ± 0,02
4	петролейный эфир : этилацетат (9 : 1)	Sorbfil ПТСХ-П-В	–	0,00	0,00
5	вода : хлористоводородная кислота : метановая кислота (8 : 4 : 1)	Cellulose Merck	–	0,20 ± 0,03	0,53 ± 0,03

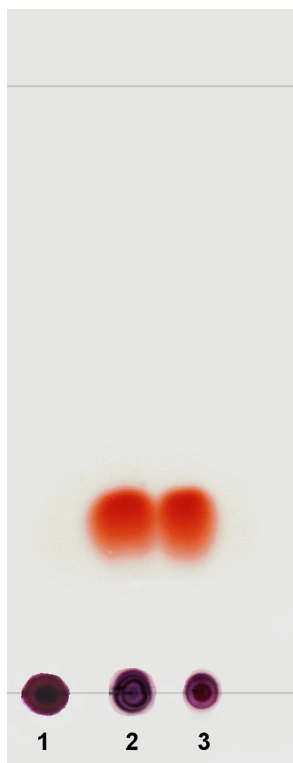


Рисунок 4 – Хроматограмма красителей:

1 – образец сравнения карминовой кислоты; 2 – модельная смесь образца сравнения карминовой кислоты и образца сравнения Понсо 4R; 3 – комплексная пищевая добавка (коммерческий образец). ВЭТСХ пластина Sorbfil ПТСХ-П-В. Элюент: пиридин; 3-метил-1-бутанол; 2-метилпропанол-1; этанол; аммиак 25% в объемных соотношениях 3:3:3:4:4

Figure 4. Chromatogram for the colours:

1 – comparison sample of carminic acid; 2 – model mixture of comparison sample of carminic acid and comparison sample of Ponceau 4R; 3 – complex food additive (commercial sample). HPTLC plate Sorbfil PTCX-P-B. Eluent: pyridine; 3-Methyl-1-butanol; 2-methylpropanol-1; ethanol; ammonia 25% in volume ratios

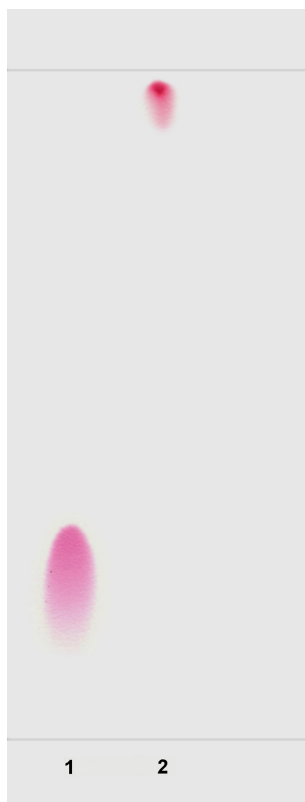


Рисунок 5 – Хроматограмма красителей:

1 – образец сравнения 4-аминокарминовой кислоты; 2 – образец сравнения карминовой кислоты.
TLC пластина TLC Cellulose Merck. Элюент: 1/15 М фосфатный буферный раствор с pH 5,6

Figure 5. Chromatogram for the colours:

1 – comparison samples of 4-aminocarminic acid; 2 – reference samples of carminic acid.
TLC plate Cellulose Merck. Eluent: 1/15 M phosphate buffer solution, pH of 5.6

Известно, что одновременная идентификация и количественное определение красителей возможно в условиях ВЭЖХ анализа. Для выбора условий, при которых происходит разделение КК, АКК и Понсо 4R, проведена апробация различных вариантов метода, которые представлены в таблице 2. При использовании в качестве подвижной фазы элюентов на основе 0,1% раствора метановой (вар. 7) и 2% этановой кислот (вар. 12, 13) в смеси с ацетонитрилом, краситель Понсо 4R в течение более 40 мин не детектировался. При разделении красителей в подвижных фазах на основе 0,004 М фосфатного буферного раствора и ацетонитрила (таблица 2, вар. 8, 14) пики имеют сильно размытые передние или задние фронты с вариациями времен удерживания около 1 мин, что затрудняет идентификацию красителей. В градиентном режиме элюирования в подвижных фазах на основе 0,1 М раствора ацетата аммония (таблица 2, вар. 11) и 0,02 М раствора ацетата натрия в смеси с ацетонитрилом (таблица 2, вар. 9 и 15) пики красителей на хроматограммах несимметричны, имеют широкие основания, размытый передний или задний фронты и близкие времена удерживания с частичным перекрытием. Удовлетворительные параметры разделения КК, АКК и Понсо 4R получены на колонках Chromsep Microsorb 100 C18 и Polaris C8 A (таблица 2, вар. 10, 16) в условиях изократического режима элюирования в подвижной фазе на основе 0,02 М раствора ацетата натрия в смеси с ацетонитрилом. Однако на колонке Chromsep Microsorb 100 C18 КК время удерживания КК соответствует времени удерживания несорбируемых компонентов. Поэтому выбраны следующие условия, при которых индексы удерживания красителей составили: $(3,6 \pm 0,2)$, $(4,5 \pm 0,5)$ и $(7,3 \pm 0,2)$ минут для АКК, КК и Понсо 4R, соответственно:

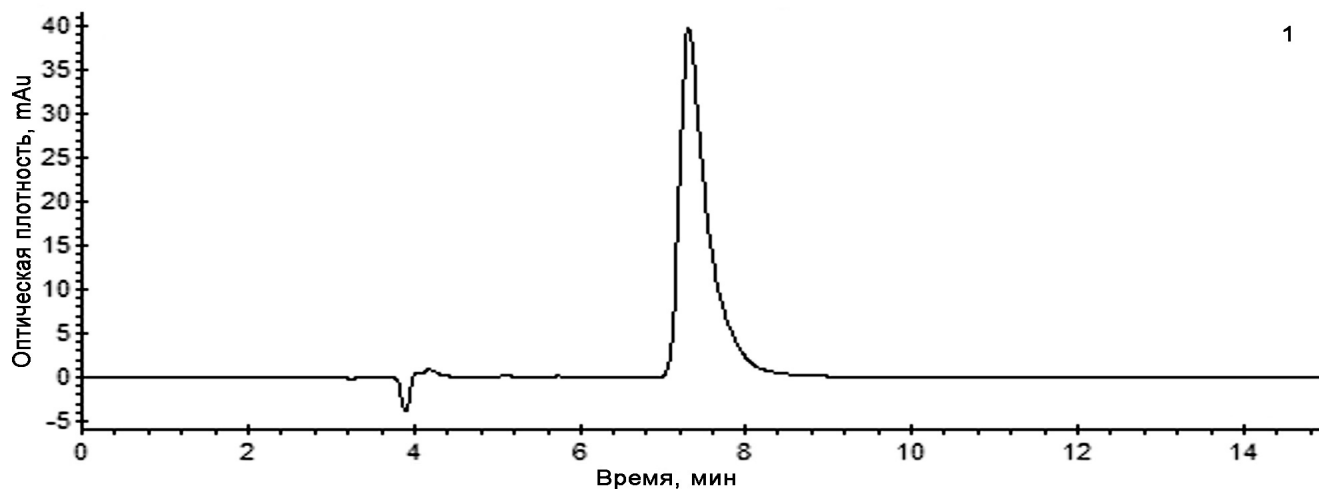
- колонка Polaris C8 A5 мкм, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм;
- температура колонки 28°C;
- скорость потока 0,8 и 0,6 см³/мин;
- элюент: смесь 0,02 М раствор ацетата натрия и ацетонитрила в объемном соотношении 90:10;

- объем пробы (10 ÷ 50) мм³;
- длина волны детектора 500 нм;
- время анализа 10 минут.

На рисунке 6 представлены хроматограммы ОС красителей Понсо 4R, КК и АКК, полученные в указанных условиях на колонке Polaris C8 A. Концентрацию красителей определяли методом абсолютной градуировки с использованием ОС красителей. Полученные градуировочные зависимости описываются уравнениями первого порядка с коэффициентами регрессии 0,9988 для Понсо 4R в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/см³, 0,9970 для АКК и 0,9979 для КК в диапазоне концентраций от 10 до 400 мкг/см³.

На хроматограммах двух коммерческих образцов, в составе которых методом ВЭТСХ был идентифицирован, не указанный в маркировке краситель Понсо 4R, кроме пика КК присутствуют пики, время удерживания которых соответствует времени удерживания ОС Понсо 4R (рисунок 7.1). Содержание Понсо 4R в образцах составляет 42,3 масс.% и 48,5 масс.%. На хроматограммах коммерческих образцов, в составе которых методами спектрофотометрии и ВЭТСХ была идентифицирована АКК, кроме пика, соответствующего КК, обнаружены пики с временами удерживания, соответствующие ОС АКК (рисунок 7.2). Содержание АКК в этих образцах составляет от 30 до 100 масс.%.

Результаты, полученные при анализе коммерческих образцов пищевых добавок методами СФ, ВЭТСХ и ВЭЖХ в составе которых был заявлен краситель Кармин Е120, приведены в таблице 5. СФ анализ пяти коммерческих образцов, указанных под номерами 11, 18, 23, 28, 37 выявил идентичность их спектров спектрам поглощения ОС АКК, так как при изменении рН их растворов положение максимума практически не изменилось. Спектры образцов под номерами 9, 12, 13 и 15 отличаются от спектров ОС КК и АКК, что может свидетельствовать о наличии в их составе нескольких красителей. Спектры остальных образцов идентичны спектрам ОС карминовой кислоты (таблица 5). В результате идентификации коммерческих образцов красителей методом ВЭТСХ выявлено десять образцов, указанных в таблице 5 под номерами 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 23, 28, 37 содержащих АКК и два образца (№ 1 и 2), в составе которых идентифицирован незаявленный краситель Понсо 4R. В остальных коммерческих образцах идентифицирована только КК.



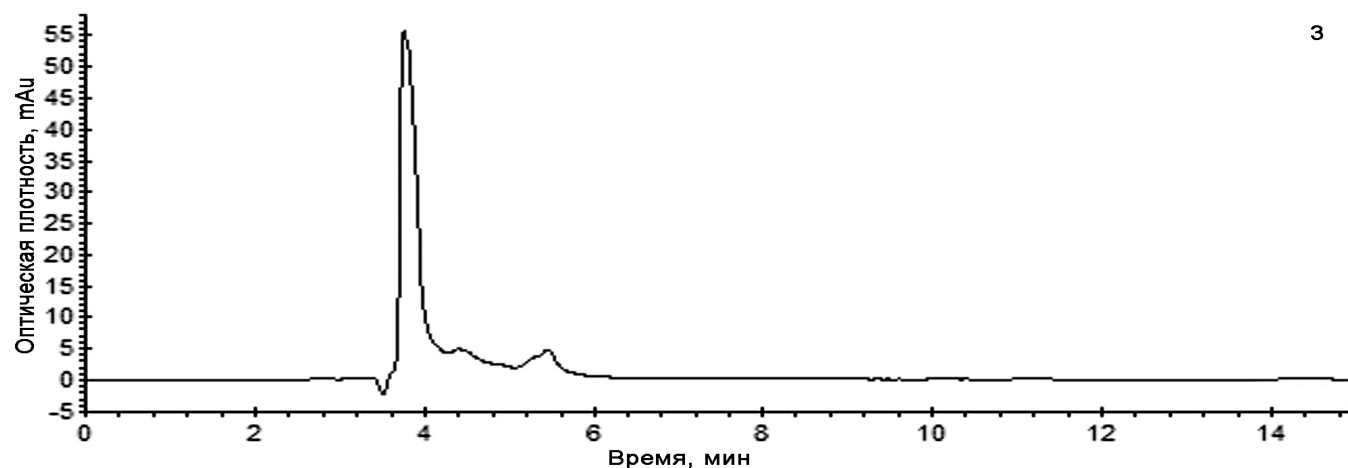
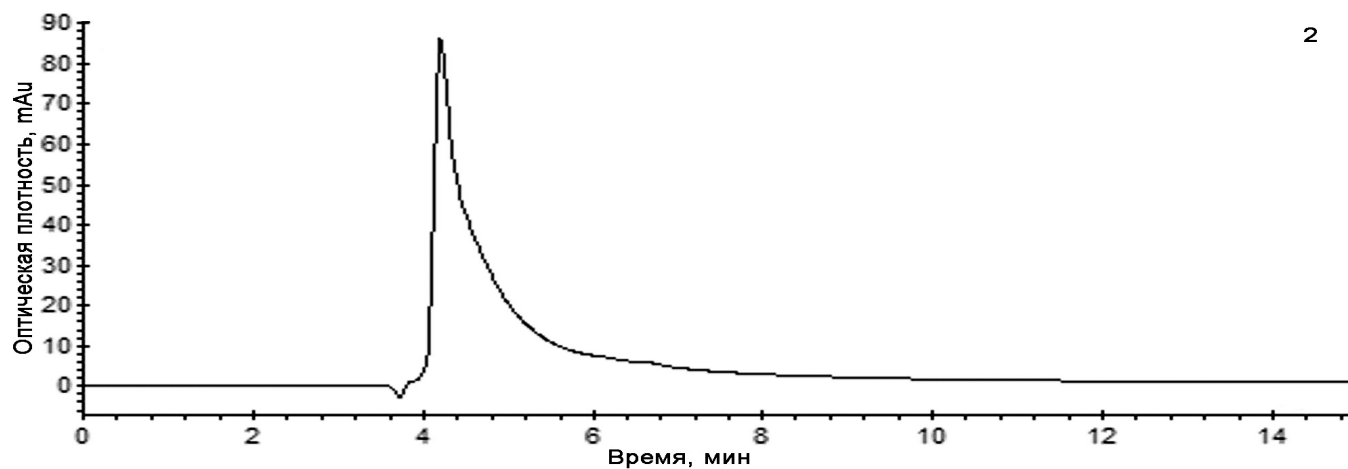
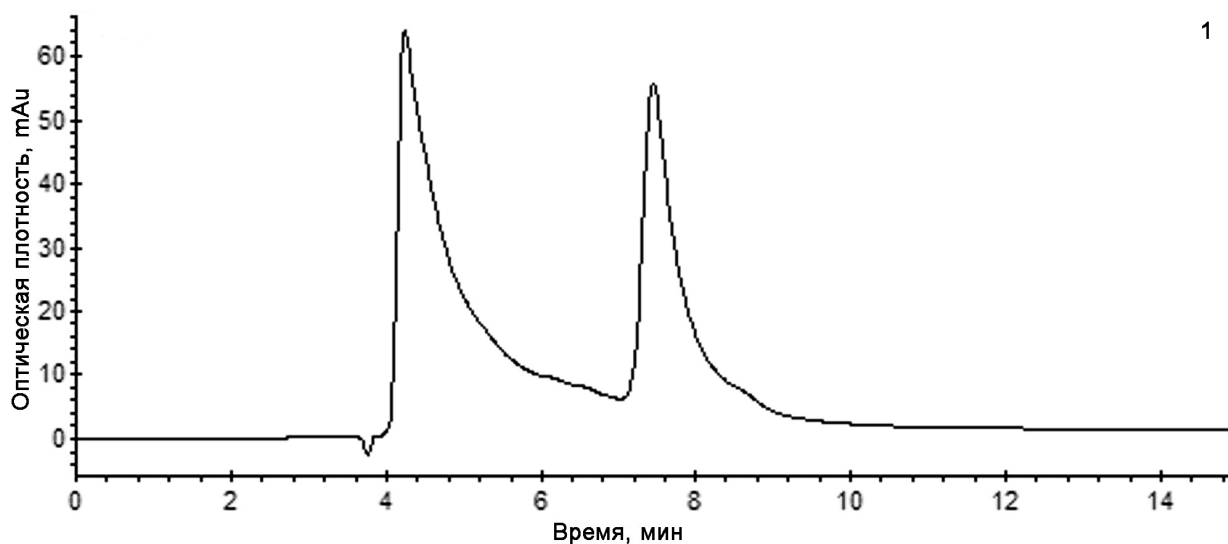


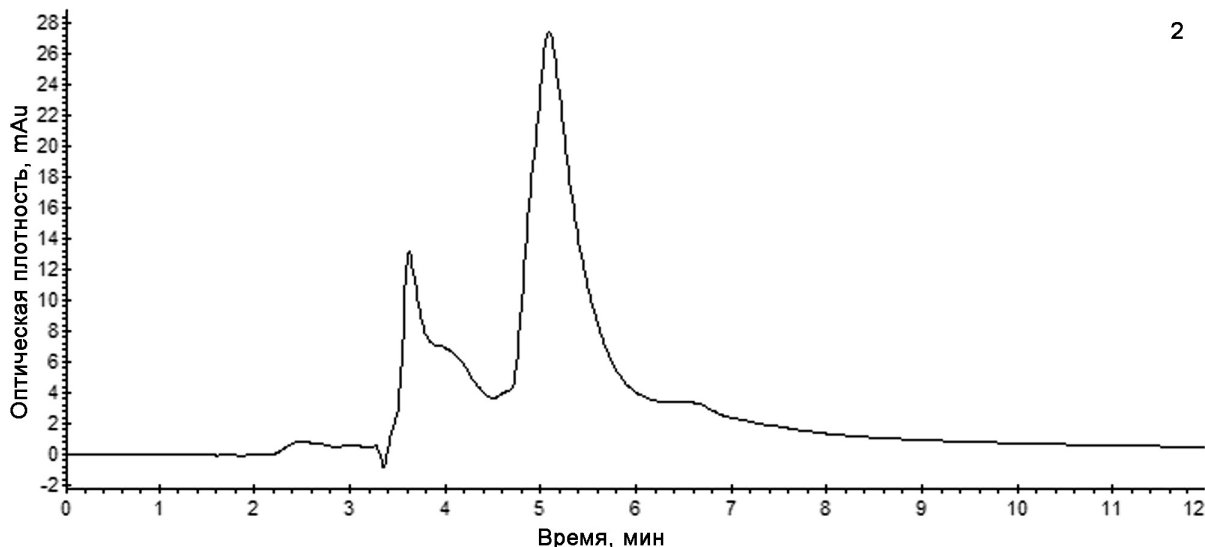
Рисунок 6 – Хроматограммы красителей:

1 – образец сравнения Понсо 4R; 2 – образец сравнения карминовой кислоты; 3 – образец сравнения 4-аминокарминовой кислоты. Колонка 150×4,6 мм Polaris C8 A, 5 мкм. Подвижная фаза: 90% об. 0,02 М ацетат натрия в воде и 10% об. ацетонитрила, 0,6 см³ · мин⁻¹. Детектирование при 500 нм

Figure 6. Chromatograms for the colours:

1 – comparison samples of Ponceau 4R; 2 – comparison samples of carminic acid; 3 – comparison samples of 4-aminocarminic acid. Column 150 × 4.6 Polaris C8 A, 5 μm. Mobile phase: 90 vol. % 0.02 M sodium acetate in water and 10 vol. % acetonitrile, 0.6 cm³ · min⁻¹. Detection at 500 nm





2

Рисунок 7 – Результаты ВЭЖХ разделения коммерческих образцов пищевых добавок, в составе которых кроме карминовой кислоты идентифицированы красители:

1 – Понсо 4R; 2 – 4-аминокарминовая кислота. Колонка 150×4,6 мм Polaris C8 A, 5 мкм. Подвижная фаза: 90% об. 0,02 М ацетат натрия в воде и 10% об. ацетонитрила, 0,6 см³ · мин⁻¹. Детектирование при 500 нм

Figure 7. HPLC separation results for commercial samples of food additives, where, apart from carminic acid, the following colours were identified:

1 – Ponceau 4R; 2 – 4-aminocarminic acid. Column 150×4.6 Polaris C8 A, 5 μm. Mobile phase: 90 vol.% 0.02 M sodium acetate in water and 10 vol.% acetonitrile, 0.6 cm³ · min⁻¹. Detection at 500 nm

Таблица 5 – Результаты комплексного анализа коммерческих образцов красителей с применением методов спектрофотометрии, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии

Table 5. The comprehensive analysis results of commercial dye samples using spectrophotometry, thin-layer, and high-performance liquid chromatography

Коммерческий образец	Максимум светопоглощения, нм		Значение R _f в элюенте		Идентифицированный краситель	Содержание ³ красящих веществ, %
	в 0,1N хлористо-водородной кислоте	в водном растворе аммиака (pH 9,5)	№ 1 ¹	№ 3 ²		
1	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	0,15 ± 0,05
			0,23 ± 0,03	–	Понсо 4R	0,010 ± 0,002
2	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	0,8 ± 0,1
			0,23 ± 0,03		Понсо 4R	0,020 ± 0,002
3	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	10,0 ± 0,2
4	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	2,1 ± 0,1
5	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	2,0 ± 0,1
6	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	48 ± 2
7	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	1,0 ± 0,1
8	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	20,0 ± 0,2
9	498 ± 1	528 ± 1	0,00 ÷ 0,06	0,95 ± 0,02	КК	3,6 ± 0,2
		567 ± 1		0,26 ± 0,02	АКК	0,8 ± 0,2
10	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	10,0 ± 0,1
11	528 ± 1	533 ± 1	0,20 ÷ 0,33	0,26 ± 0,02	АКК	15,8 ± 0,2
	565 ± 1	570 ± 1				
12	500 ± 1	533 ± 1	0,00 ÷ 0,18	0,95 ± 0,02	КК	15,0 ± 0,1
	565 ± 1	570 ± 1		0,26 ± 0,02	АКК	17,5 ± 0,2
13	500 ± 1	530 ± 1	0,00 ÷ 0,08	0,95 ± 0,02	КК	10,0 ± 0,1
	565 ± 1	565 ± 1		0,26 ± 0,02	АКК	20,5 ± 0,2

14	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	5,50 ± 0,08
15	500 ± 1	530 ± 1	0,00 ÷ 0,18	0,95 ± 0,02	КК	0,30 ± 0,03
	565 ± 1	568 ± 1		0,26 ± 0,02	АКК	0,20 ± 0,02
16	500 ± 1	530 ± 1	0,00 ÷ 0,09	0,95 ± 0,02	КК	2,3 ± 0,1
	565 ± 1	568 ± 1		0,26 ± 0,02	АКК	1,2 ± 0,2
17	493 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	1,7 ± 0,1
18	528 ± 1	530 ± 1	0,00 ÷ 0,06	0,26 ± 0,02	АКК	0,25 ± 0,02
	565 ± 1	569 ± 1				
19	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	0,7 ± 0,1
20	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	2,9 ± 0,1
21	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	51 ± 1
22	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	55 ± 1
23	528 ± 1	530 ± 1	0,00 ÷ 0,06	0,26 ± 0,02	АКК	0,17 ± 0,02
	565 ± 1	568 ± 1				
24	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	5,5 ± 0,1
25	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	2,0 ± 0,1
26	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	2,5 ± 0,1
27	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	2,8 ± 0,1
28	529 ± 1	532 ± 1	0,00 ÷ 0,06	0,26 ± 0,02	АКК	1,20 ± 0,05
	565 ± 1	566 ± 1				
29	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	5,0 ± 0,1
30	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	4,9 ± 0,1
31	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	49 ± 0,1
31	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	8,3 ± 0,1
33	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	2,9 ± 0,1
34	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	4,6 ± 0,1
35	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	10,8 ± 0,3
36	494 ± 1	518 ± 1	0,00	0,95 ± 0,02	КК	9,6 ± 0,2
37	528 ± 1	538 ± 1	0,00 ÷ 0,06	0,26 ± 0,02	АКК	1,3 ± 0,1
	565 ± 1	566 ± 1				

Примечания:

¹разделение красителей проведен в элюенте – пиридин : 3-метил-1-бутанол : 2-метил-пропанол-1 : этанол : аммиак 25% с объемным соотношением компонентов 3 : 3 : 3 : 4 : 4 на пластине Sorbfil ПТСХ-П-В

²разделение красителей проведен в элюенте – 1/15 М фосфатный буферный раствор с рН 5,6 на пластине Cellulose Merck

³количественный анализ проведен на колонке 150×4,6 мм Polaris C8 A, 5 мкм. Подвижная фаза: 90% об. 0,02 М ацетат натрия в воде и 10% об. ацетонитрила, 0,6 см³·мин⁻¹. Детектирование при 500 нм

Заключение

Таким образом, предложен комплексный подход для идентификации и количественного определения пищевого красителя Кармины Е120 в целях выявления его фальсификации 4-аминокарминовой кислотой и Понсо 4R Е124. Методы спектрофотометрического и ВЭТСХ анализа просты в исполнении, не требуют сложного дорогостоящего оборудования, поэтому могут быть рекомендованы для идентификации красителей при входном контроле сырья практически в любой лаборатории.

Предложен ВЭЖХ метод для идентификации и количественного определения Кармина Е120, 4-аминокарминовой кислотой и Понсо 4R Е124 при их совместном присутствии в пищевых добавках. В результате мониторинга пищевых добавок установлены факты фальсификации карминовой кислоты в коммерческих образцах красителя Кармины Е120 и в комплексных пищевых добавках, его содержащих.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости контроля пищевых красителей и комплексных пищевых добавок, содержащих Кармины Е120, на наличие в них не заявленных красителей для предотвращения фальсификации и обеспечения требований технических регламентов Таможенного союза по безопасности пищевой продукции.

References

1. Rudometova N.V. Food additives and dyes: methodological support for products safety. *Production Quality Control*. 2014, no. 8, pp. 13–19 (In Russian).
2. Rudometova N.V. Synthetic dyes in frozen desserts and food ices. *Dairy Industry*. 2013, no. 7, pp. 44–45 (In Russian).

3. Bessonov V.V., Perederyaev O.I., Vedishcheva Yu.V., Bogachuk M.N. The new method for simultaneous determination of natural and synthetic food dyes by high performance liquid chromatography. *Problems of Nutrition*. 2010, V. 79, no. 3, pp. 73–77 (*In Russian*).
4. Commission Regulation (EU) № 231/2012 of 9 March 2012 laying down specification for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) № 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union* L 83/1. 2012, V. 55, pp. 1–295.
5. Seyhan S.A., Demirbağ C., Dölen E. Identification of the main dyestuffs obtained from Kermes (*Kermes vermilio*) in the Northwest of Turkey. *Ovidius University Annals of Chemistry*. 2019, V. 30, no. 1, pp. 1–4.
6. Rasmussen S.A., Kongstad K.T., Khorsand-Jamal P., Kannangara R.M., Nafisi M., Van Dam A., Bennedsen M., Madsen B., Okkels F., Gotfredsen C.H., Staerk D., Thrane U., Mortensen U.H., Larsen T.O., Frandsen R.J.N. On the biosynthetic origin of carminic acid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2018, no. 96, pp. 51–61.
7. Commission Regulation (EU) № 2018/1472 of 28 September 2018 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council and the Annex to Commission Regulation (EU) No 231/2012 as regards Cochineal, Carminic acid, Carmine (E 120). *Official Journal of the European Union* L 247/1. 2018, V. 61, pp. 1–4.
8. Zaima K., Fukamachi A., Yagi R., Ito Y., Sugimoto N., Akiyama H., Shinomiya K., Harikai N. Kinetic study of the equilibration between carminic acid and its two isomers isolated from cochineal dye. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*. 2017, V. 65, no. 3, pp. 306–310.
9. Lech K., Witkoś K., Wileńska B., Jarosz M. Identification of unknown colorants in pre-Columbian textiles dyed with American cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, V. 407, no 3, pp. 855–867.
10. Nishizaki Y., Sato-Masumoto N., Yokota A., Mikawa T., Nakashima K., Yamazaki T., Kuroe M., Numata M., Ihara T., Ito Y., Sugimoto N., Sato K. HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 2018, V. 35, no. 5, pp. 838–847.
11. Atwa M.A. Quantitative determination of cochineal extract (*Dactylopius coccus*), carmine, carminic acid and 4-aminocarminic acid (E120) in some food-stuffs. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology, Mansoura University*. 2015, V. 6, no. 6, pp. 177–190.
12. Serrano A., Sousa M.M., Hallett J., Lopes J.A., Oliveira M.C. Analysis of natural red dyes (cochineal) in textiles of historical importance using HPLC and multivariate data analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, V. 401, no. 2, pp. 735–743.
13. Peggie D.A., Hulme A.N., McNab H., Quye A. Towards the identification of characteristic minor components from textiles dyed with weld (*Reseda luteola* L.) and those dyed with Mexican cochineal (*Dactylopius coccus* Costa). *Microchimica Acta*. 2008, V. 162, pp. 371–380.
14. Miller A., Lassek E., Pfister J., Klinger R., Hoebel W., Knapp H., Gaßmann F., Wollein U., Schramek N. Detection of 4-aminocarminic acid in beverages and cake glaze from the German market: a food additive not approved in the EU. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2016, V. 11, no. 2, pp. 127–135.
15. Yilmaz U.T., Ergun F., Yilmaz H. Determination of the food dye carmine in milk and candy products by differential pulse polarography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014, V. 22, no. 3, pp. 329–335.
16. Patsovskii A.P., Rudometova N.V., Kamentsev Ya.S. Electrophoretic determination of synthetic dyes in alcoholic beverages. *Journal of Analytical Chemistry*. 2004, V. 59, no. 2, pp. 150–154.
17. Rudometova N.V., Krasnikova E.V. Synthetic dyes in spices. *Storage and Processing of Agricultural Raw Materials*. 2009, no. 8, pp. 298–305 (*In Russian*).
18. Combined Compendium of Food Additive Specifications FAO JECFA. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-052.pdf (Accessed 25.03.2020).
19. Kirchner J.G. Thin-Layer Chromatography. 2th ed. New York, Wiley-Interscience, 1978. 1137 p.
20. Combined compendium of food additive specifications. Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications. FAO Rome, 2006. V. 4. 296 p.
21. Troiano R., Piatti L., Denoye E. Increased Throughput for the Determination of Synthetic Dyes in Beverages Using HRes Fast-LC Technology. *Application note of PerkinElmer Incorporation*. URL: https://www.s4science.at/wordpress/wp-content/uploads/2019/03/008265_01-Dyes-in-Beverages-by-HRes-PDA-LC-App-Note.pdf (Accessed 20.03.2020).
22. Combined Compendium of Food Additive Specifications FAO JECFA. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph11/additive-329-m11.pdf (Accessed 25.03.2020).