

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ МАТРИКСОВ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

© А. П. Пацовский¹✉

¹ АО «ГосНИИХиманалит», *patsovskiy_ap@mail.ru*;
Санкт-Петербург, Российская Федерация

Ключевые слова: белки; молочные продукты; пищевые синтетические красители; фальсификация пищевых продуктов.

Аннотация: Исследовано влияние компонентов молочных продуктов на выделение и последующее определение содержания азокрасителей, триарилметановых и индигокармина, используемых для окраски отдельных видов пищевых продуктов в Российской Федерации. Детально изучены факторы влияния состава молочных продуктов на полноту и селективность выделения красителей. Приняты во внимание основные факторы: состав и морфология белковых матриц, стабильность растворов красителей; способы осаждения. Оценены основные сложности выделения. Полученные результаты предоставляют новые возможности специалистам, занимающимся методами оперативного контроля искусственных красителей в пищевых продуктах.

Введение

Начавшееся с конца девяностых годов повсеместное внедрение неиспользуемых в России ранее ненатуральных красителей в состав различных пищевых продуктов повлияло на скорейшую разработку современных оперативных методов контроля сырья и продовольственных товаров, как поступаемых из-за рубежа, так и производимых на местных предприятиях [1]. Синтетические красители в определенных концентрациях и дозах могут оказывать негативное влияние на здоровье человека, вызывая аллергические реакции и гиперактивность, особенно у детей [2]. Несмотря на регламентацию использования синтетических пищевых красителей в продуктах питания, производители порою превышают нормы их допустимого содержания. Поэтому необходимо оперативно контролировать содержание искусственных пищевых красителей в различных продуктах питания, что в основном связано с трудностью их извлечения из сложных пищевых матриц.

Основанные на современных методах анализа нормативные документы по установлению искусственных пищевых красителей в продуктах питания разрабатываются с 1992 г. в связи с большим наплывом импортных товаров на российский рынок. Очевидно, что настоящим прорывом в данном направлении следует считать период 1999 – 2002 гг., когда были разработаны методы, основанные на адсорбции пищевых красителей окисью алюминия с последующим хроматографическим разделением и денситометрированием многокомпонентных красителей [3 – 6]. Впоследствии появились и альтернативные подходы, в основном с использованием аналитических измерительных приборов [5, 7].

Данная работа посвящена разработанному в 2009 г. нормативному документу [7], который регламентирует метод измерения содержания красителей в молочных продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Следует привлечь внимание к данной методике, так как она имеет очевидные недостатки:

- неудовлетворительные метрологические характеристики результатов измерений – пределы относительной погрешности 45 – 57 %;
- объект измерения (красители) – это лишь пять веществ из гораздо большей группы синтетических ингредиентов, используемых в настоящее время для окрашивания пищевых продуктов;
- детектирование происходит на разных длинах волн, соответствующих максимуму поглощения каждого красителя, что усложняет и значительно замедляет анализ.

Теоретическая часть

Сейчас многие традиционные натуральные компоненты пищи как источники энергии заменены либо так называемыми «идентичными натуральным», либо синтетическими ингредиентами. Это относится к жирам и углеводам, в отличие от белков, имеющих сложный состав и обладающих свойством незаменимости функций аминокислотных соединений для жизнедеятельности человека.

Использование комплексных синтетических пищевых красителей для придания желаемой окраски некоторым молочным продуктам тесно связано с взаимодействием сульфоновых групп, которые входят в структуру всех синтетических красителей, разрешенных в настоящее время для использования в пищевой промышленности [1], с функциональными группами аминокислот.

Считается, что красители должны быть отделены от белковой матрицы либо в процессе пробоподготовки, либо без выделения, если условия для количественной экстракции не могут быть найдены непосредственно на колонке. Главное преимущество последнего подхода – существенное ускорение всего анализа; основные недостатки – частая замена предколонок и наличие большого количества неинформативных пиков на хроматограммах, что заметно усложняет обработку хроматографических данных. Однако, если установлено, что наличие таких пиков не будет мешать чтению хроматограмм, то, по-видимому, такой подход следует считать приемлемым.

Рассмотрим состав и морфологию белковых матриц, а также факторы, стабилизирующие и осаждающие их в растворе. Основой каждого белка является полипептидная цепь. Она не только вытянута в пространстве, но и организована в трехмерную структуру. Особенное взаимное месторасположение в пространстве складчатых, спиральных и неупорядоченных участков полипептидной цепи образует третичную структуру белка, в которую вовлечены дисульфиды и всевозможные типы слабых связей. Известны два общих типа третичной структуры: фибриллярная (имеет вытянутую форму и образует волокнистую структуру ткани) и сферическая, молекулы которой имеют форму, близкую к форме шара или эллипсоида.

Иррегулярные области присущи строению глобулярных белков, бета-складчатым структурам и альфа-спиралям. Известно также, что в глобулярных белках гидрофобные участки содержатся глубоко внутри молекулы [8]. Эта связь приводит к образованию гидрофобных кластеров (центров). Как правило, имеется несколько гидрофобных кластеров в глобулярной молекуле белка. Наличие гидрофобного кластера принуждает молекулу белка в растворе изгибаться сложным образом в пространстве. Это приводит к проявлению двойственности свойств молекулы белков: на внешней стороне макромолекулы в ее третичной структуре имеются гидрофильные группы и, следовательно, молекула в целом гидрофильна,

а гидрофобные радикалы находятся «в глубине» структуры молекулы. Взаимодействие белка с пищевыми ингредиентами часто приводит к поглощению этих веществ белковыми молекулами. Обратный процесс высвобождения чужеродных молекул из матрицы белка называется десорбцией. В среднем молоко содержит около 3,2 % белков. Основным белком в молоке является казеин, содержание которого варьируется в пределах 2,3 – 2,9 %.

Молочные белки относят к глобулярным белкам вследствие пространственного расположения полипептидных цепей. Детальный анализ его вторичной и третичной структур показал, что казеин практически не имеет альфа-спиралей и занимает промежуточное положение между компактной глобулярной структурой и структурой неупорядоченной сшивки, которая обычно наблюдается при денатурации белков глобулярного типа [9]. Помимо казеина, в молоке содержатся сывороточные белки: бета-лактоглобулин, альфа-лактальбумин, иммуноглобулин, сывороточный альбумин и некоторые другие белки, так называемые минорные белки. Бета-лактоглобулин распадается на мономеры уже при нагревании молока до 30 °С. В небольших количествах присутствует также сывороточный альбумин, но не имеет практического значения. К третьей группе относятся белки липидных глобул, которые составляют всего около одного процента от общего количества белков молока [9].

Белок в растворе стабилизирован рядом эффектов.

1. Наличие гидратной оболочки, представляющей собой слой молекул воды, определенным образом выстраиваемых на поверхности молекулы белка. Поверхность молекул белка отрицательно заряжена, и молекулы воды своими диполями к ней притягиваются атомами водорода, несущими парциальный положительный заряд. Вода в гидросфере не позволяет молекулам белка друг друга окружать, агрегироваться и выпадать в осадок (ζ -потенциал). В данном процессе участвует довольно большое количество воды – порядка 3,7 г на 1 г белка (порядка 200...400 моль на моль).

2. Наличие так называемых «свободных заряженных групп». Изoeлектрическая точка (ИЭТ) – значение pH среды, при котором поверхность не несет электрического заряда, существует для большинства белков в слабокислой среде. Для казеина она равна 4,6, а для бета-лактоглобулина – 5,1; то есть кислотных групп больше, чем основных.

Если стоит задача осадить белки из раствора, необходимо удалить оба стабилизирующих фактора: и заряд, и гидратную оболочку молекулы. Высаливание (осаждение белков нейтральными солями металлов первой и второй групп в высоких концентрациях) часто применяют для избавления от гидратной оболочки. Осаждение происходит в виду того, что такие соли очень гидрофильны и при высоких концентрациях проявляют свои водопоглощающие свойства. При добавлении в раствор с белком они сначала растворяются в осмотически свободной воде, а затем конкурируют с белками за гидратирующую воду оболочки [9]. Однако в средах кислых [pH < ИЭТ – 4] или, наоборот, основных [pH > ИЭТ + 4] белковые молекулы не способны выпасть в осадок, поскольку у них имеется еще один стабилизирующий фактор – заряд, который не позволяет белковым молекулам слишком близко приближаться друг к другу и, соответственно, агрегация полипептидных цепей не может происходить. Заряд на молекуле белка устраняется путем приближения значения pH среды возможно ближе к ИЭТ.

Если красители могут быть количественно переведены в избыточную жидкость, такой подход может быть оправдан. В противном случае коагуляция белковых матриц, содержащих большую долю красителей, является скорее нежелательным процессом, приводящим к неприемлемым потерям в выделении анализируемых компонентов.

Результаты предварительных испытаний

Воспроизведена методика определения содержания красителей, представленная в [7]. Установлено, что существенные потери красящих компонентов происходят на стадии фильтрования молочной пробы через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. То же самое наблюдалось и при центрифугировании анализируемых проб. Промывка фильтров и осадков после проведения центрифугирования и последующее объединение проб ситуацию не изменили. Использование для денатурации белков воздействия ультразвука с рабочей частотой 40 кГц, и нагрев до 60 °С, также не оказали положительного эффекта.

Применение воздействующих на белки химических реагентов и последующее фильтрование показали следующее: использование нейтральных солей (хлоридов натрия и кальция) и органических растворителей (метанола, ацетона) заметно влияет на степень извлечения красителя только при добавлении 10 % раствора NaOH_{aq} до $\text{pH} \approx (8,5 \dots 9,0)$. Степень извлечения некоторых красителей (E102, E110, E142) достигала приемлемых значений (более 85 %), но для отдельной группы красящих веществ (E122, E131, E132) оказалась менее 40 %. Закисление среды до $\text{pH} \approx 3,0$ приводило только к агломерации белков с явным визуальным обесцвечиванием исследуемого продукта.

На основании этих результатов было решено ограничить пробоподготовку только подщелачиванием анализируемых образцов.

Материалы и методы

Исследуемые образцы – биокефир, пастеризованное молоко и йогурт.

Введенные многокомпонентные композиции красителей: Тартразин E102, Желтый «Солнечный закат» E110, Кармуазин E122, Амарант E123, Понсо 4R E124, Красный очаровательный AC E129, Синий патентованный V E131, Индигокармин E132 и Зеленый S E142 – с содержанием каждого 10 млн^{-1} (ppm).

В работе использовано следующее оборудование:

– жидкостный хроматограф Shimadzu LC-20 состоит из следующих компонентов для высокоэффективных хроматографов: спектрофотометрический детектор SPD-20A, автодозатор SIL-20A, блок подачи растворителя LC-20AD, проточный дегазатор DGU-20A5R, блок управления системой CBM-20A, резервуарная камера LC-20AD, термостат колонки CTO-20AC, реализованный через пакет прикладных программ Shimadzu LC solution chromatographic instrument;

– ультразвуковая ванна Branson;

– виалы вместимостью 1 мл Macherey-Nagel GmbH Co. KG.

Реагенты: ацетонитрил, ос. ч., «Криохром», сорт 0; ацетат натрия, Sigma.

Хроматографические условия:

– колонка (250 · 4,6) см^3 , октадецилсиликагель 5 мкм, Inertsil C18 (2) 150A, Phenomenex с предколонкой KJO-4282;

– подвижная фаза – 0,02 М раствор ацетата натрия : ацетонитрил: от (95 : 5) – первые три мин до (60 : 40) двенадцать мин с градиентом состава подвижной фазы изменяемым программно;

– детектор – 280 нм и 370 нм;

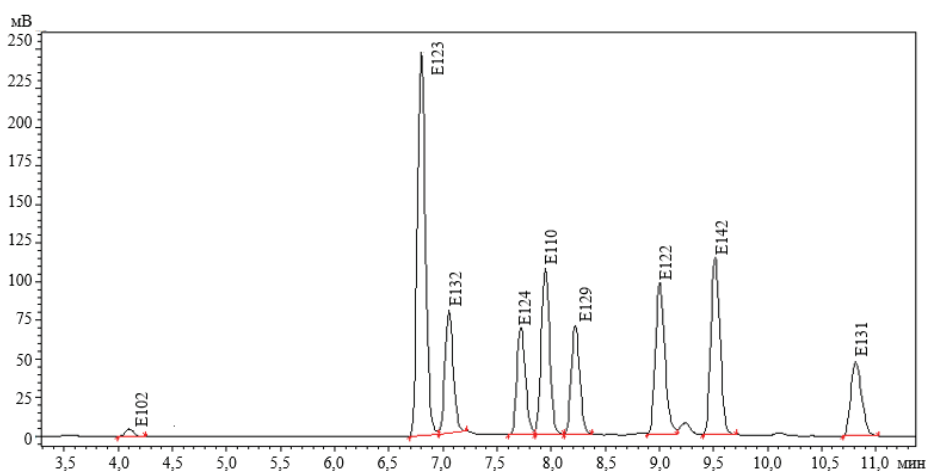
– температура колонки – 25 °С;

– скорость потока – 1,0 $\text{см}^3/\text{мин}$;

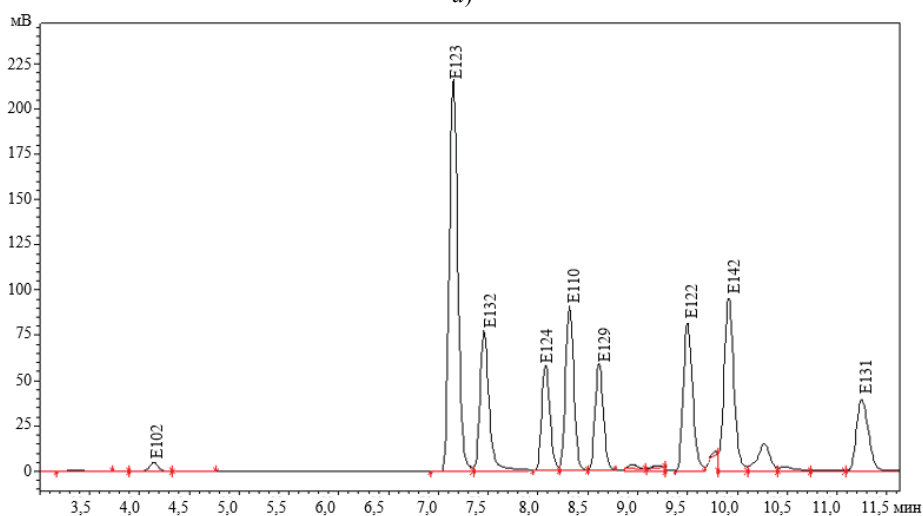
– время хроматографирования – 15 мин;

– объем пробы – 82 мкл;

– время удерживания хроматографических пиков (рис. 1).



а)



б)

Рис. 1. Хроматограммы раствора сравнения, включающего комплекс пищевых синтетических красителей в деионизированной воде (а); раствора того же комплекса красителей, в той же концентрации, в матрице биокефира (б)

Результаты анализа считаются достоверными, если соблюдены требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Для проверки пригодности хроматографическую систему уравнивали до стабилизации базовой линии.

Раствор хроматографировали для оценки чувствительности; 1 см^3 тартразина E102 и синего патентного V E131 растворяли в дистиллированной воде в колбе на 500 см^3 . Хроматографическая система считалась пригодной, если отношение сигнал/шум пиков красителей составляло не менее 10.

Для проверки пригодности хроматографической системы раствор последовательно хроматографировали не менее пяти раз. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная на основе хроматографических пиков, составляет не менее 5000 теоретических тарелок;
- коэффициент асимметрии хроматографических пиков составляет не более 2,0.
- относительное стандартное отклонение площадей и времени удерживания пиков красителей составляет не более 5,0 %.

Полученные результаты

На типичной хроматограмме (см. рис. 1) показан раствор сравнения, содержащий в деионизированной воде ряд синтетических красителей, и раствор того же комплекса красителей в той же концентрации в матрице образца молочных продуктов. Полноту извлечения из матрицы молочных продуктов, введенных синтетических пищевых красителей оценивали путем последовательной обработки хроматограмм раствора сравнения, содержащего комплекс синтетических пищевых красителей в деионизированной воде, и раствора того же комплекса красителей в той же концентрации, добавленного в матрикс молочного продукта (табл. 1).

Водные растворы синтетических пищевых красителей способны легко проходить сквозь инертный фильтр, размеры пор которого в несколько раз превышают размер частиц любого из образцов красителей, взятых для анализа в растворе. Для вымывания остаточного количества красителей с фильтра достаточно использовать подщелоченную воду, чтобы предотвратить ионизацию сульфонатных групп. Таким образом, потери при пробоподготовке можно объяснить только поглощением красителей матриксами белков в молочных продуктах. То же самое, по-видимому, происходит и при центрифугировании. Таким образом, установлено, что метод измерения, представленный в [7], является некорректным и требует скорейшей оптимизации.

Физико-химические пути, направленные на усиление поглощения красителей из белковых матриц, не нашли должного воздействия, поэтому было решено отказаться от многоступенчатой пробоподготовки, подщелачивая только анализируемые образцы.

Таблица 1

Показатели полноты извлечения пищевых синтетических красителей из матриксов молочной продукции

Краситель	Время удерживания	Полнота извлечения из продукта при 370 нм, %		
		молоко	йогурт	биокефир
E102	6,08 ± 0,05	91,3 ± 0,5	98,3 ± 0,5	90,3 ± 0,6
E123	8,85 ± 0,05	76,9 ± 0,8	72,1 ± 0,8	74,7 ± 0,8
E132	9,10 ± 0,05	90,7 ± 0,6	88,8 ± 0,6	86,5 ± 0,6
E124	9,77 ± 0,05	86,8 ± 0,6	85,3 ± 0,6	86,5 ± 0,6
E110	9,99 ± 0,06	90,7 ± 0,5	93,9 ± 0,5	97,6 ± 0,5
E129	10,26 ± 0,06	99,2 ± 0,5	91,1 ± 0,5	93,7 ± 0,5
E122	11,06 ± 0,07	91,1 ± 0,6	92,7 ± 0,5	92,3 ± 0,5
E142	11,66 ± 0,07	91,1 ± 0,6	86,2 ± 0,6	88,1 ± 0,6
E131	13,15 ± 0,09	98,1 ± 0,5	95,3 ± 0,5	92,1 ± 0,5

Заключение

Эффективность метода высокоэффективной жидкостной хроматографии продемонстрирована при определении содержания синтетических красителей азокрасителей, трифенилметановых и индигокармина в молочных продуктах, разрешенных для использования в пищевой промышленности. Степень извлечения красителей определялась по площадям пиков анализируемых и контрольных образцов 74,7 – 99,2 % для всех типов, взятых для исследования, молочных продуктов. Время удерживания красителей и площади пиков идентичны.

Список литературы

1. Пацовский, А. П. Научно-методические основы аналитического контроля пищевых красителей в алкогольных напитках : дис. ... канд. техн. наук : 05.11.13 / Пацовский Александр Петрович. – Санкт-Петербург, 2002. – 207 с.
2. Глава II. Раздел 22. Требования безопасности пищевых добавок и ароматизаторов [Электронный ресурс] // Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) : утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 года № 299. – URL : https://eec.eaeunion.org/comission/departament/depsanmer/regulation/P2_299.php (дата обращения: 12.02.2026).
3. Пацовский, А. П. Современные достижения в области тонкослойной хроматографии / А. П. Пацовский // Мир измерений. – 2013. – № 1. – С. 36–40.
4. ОСТ 10-298–2002. Алкогольные напитки. Методы идентификации и определения содержания синтетических красителей. – Санкт-Петербург : Минсельхоз России, 2002. – 26 с.
5. ГОСТ 32050–2013. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения массовой доли синтетических красителей в карамели. – Введ. 2014-01-01. – Москва : Стандартинформ, 2014. – 46 с.
6. ГОСТ 32780–2014. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения содержания массовой доли синтетических красителей в замороженных десертах. – Введ. 2016-01-01. – Москва : Стандартинформ, 2019. – 16 с.
7. ГОСТ Р 53752–2009. Молоко и молочная продукция. Определение содержания консервантов и красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. – Введ. 2011-01-01. – Москва : Стандартинформ, 2010. – 16 с.
8. 4.3. Третичная структура // Глава 4. Структура // Белок [Электронный ресурс]. – URL : http://belok-s.narod.ru/tb_4_3.htm (дата обращения: 12.02.2026).
9. Тепел, А. Химия и физика молока / А. Тепел : пер. с нем. Л. Ф. Теречек – Москва : Пищевая промышленность, 1979. – 623 с.

Isolation and Chromatographic Separation of Synthetic Dyes from Various Dairy Product Matrixes

© A. P. Patsovskiy ¹✉

¹ JSC GosNIIKhimanalit, patsovskiy_ap@mail.ru;
St. Petersburg, Russian Federation

Keywords: proteins; dairy products; synthetic food colors; food adulteration.

Abstract: The influence of dairy product components on the isolation and subsequent determination of azo dyes, triarylmethane dyes, and indigo carmine dyes used to color certain types of food products in the Russian Federation was studied. The influence of dairy product composition on the completeness and selectivity of dye extraction was examined in detail. The following key factors were taken into account: the composition and morphology of protein matrices, the stability of dye solutions, and precipitation methods. The main difficulties of extraction were assessed. The results obtained provide new opportunities for specialists working on methods of operational control of artificial colors in food products.

References

1. Patsovskiy A.P. *PhD of Candidate's thesis (Engineering)*, St. Petersburg, 2002, 207 p. (In Russ.)
2. Available at: https://eec.eaeunion.org/comission/department/depsanmer/regulation/P2_299.php (accessed 12 February 2026).
3. Patsovskiy A.P. [Modern advances in thin-layer chromatography], *Mir izmereniy* [The World of Measurements], 2013, no. 1, pp. 36-40. (In Russ., abstract in Eng.)
4. OST 10-298-2002. *Alkohol'nyye napitki. Metody identifikatsii i opredeleniya sodержaniya sinteticheskikh krasiteley* [Alcoholic beverages. Methods for identification and determination of synthetic colorants], St. Petersburg: Minsel'khos Rossii, 2002, 26 p. (In Russ.)
5. GOST 32050-2013. *Produkty pishchevyye. Metody identifikatsii i opredeleniya massovoy doli sinteticheskikh krasiteley v karameli* [Food products. Methods for identification and determination of mass fraction of synthetic colorants in caramel], Moscow: Standartinform, 2014, 46 p. (In Russ.)
6. GOST 32780-2014. *Produkty pishchevyye. Metody identifikatsii i opredeleniya sodержaniya massovoy doli sinteticheskikh krasiteley v zamorozhennykh desertakh* [Food products. Methods for identification and determination of mass fraction of synthetic colorants in frozen desserts], Moscow: Standartinform, 2019, 16 p. (In Russ.)
7. GOST R 53752-2009. *Moloko i molochnaya produktsiya. Opredeleniye sodержaniya konservantov i krasiteley metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii* [Milk and dairy products. Determination of preservatives and colorants by high-performance liquid chromatography], Moscow: Standartinform, 2010, 16 p. (In Russ.)
8. Available at: http://belok-s.narod.ru/tb_4_3.htm (accessed 12 February 2026).
9. Töpel A. *Chemie und Physik der Milch*, Leipzig, 1979, 623 p. (In Germ.)

Isolierung und chromatographische Trennung von synthetischen Farbstoffen aus verschiedenen Milchproduktmatrizen

Zusammenfassung: Es ist der Einfluss von Milchproduktbestandteilen auf die Isolierung und anschließende Bestimmung von Azofarbstoffen, Triarylmethanfarbstoffen und Indigokarminfarbstoffen untersucht, die in der Russischen Föderation zur Färbung bestimmter Lebensmittel verwendet werden. Der Einfluss der Milchproduktzusammensetzung auf die Vollständigkeit und Selektivität der Farbstoffextraktion sind detailliert analysiert. Wichtige Faktoren sind berücksichtigt: Zusammensetzung und Morphologie der Proteinmatrix, Stabilität der Farbstofflösungen

und Fällungsmethoden. Die größten Schwierigkeiten der Extraktion sind bewertet. Die Ergebnisse eröffnen neue Möglichkeiten für Fachleute, die sich mit Methoden der Betriebskontrolle künstlicher Farbstoffe in Lebensmitteln befassen.

Extraction et séparation chromatographique des colorants synthétiques provenant des différentes matrices des produits laitiers

Résumé: Sont étudiés les effets des composants des produits laitiers sur l'extraction et la détermination ultérieure des colorants azoïques, du triaryl-méthane et de l'indigocarmin utilisés pour colorer certains types de produits alimentaires dans la Fédération de Russie. Sont étudiés en détail les facteurs d'influence de la composition des produits laitiers sur la plénitude et la sélectivité de la sélection des colorants. Les principaux facteurs sont pris en compte: la composition et la morphologie des matrices de protéines, la stabilité des solutions de colorants; les méthodes de dépôt. Les principales difficultés d'allocation sont évaluées. Les résultats offrent de nouvelles possibilités aux spécialistes impliqués dans les méthodes de contrôle opérationnel des colorants artificiels dans les aliments.

Автор: *Пацовский Александр Петрович* – кандидат технических наук, доцент, начальник испытательной химико-аналитической лаборатории (ИХАЛ), АО «ГосНИИхиманалит», Санкт-Петербург, Российская Федерация.