

Опыт хроматографического разделения синтетических красителей в составе матриксов молочных продуктов



А.П. Пацовский

*к.т.н., доцент
Научно-исследовательского центра целевой доставки лекарств (НИЦЦДЛ),
ОАО «ГаленоФарм»;
Санкт-Петербург
e-mail:
patsovskiy_ap@mail.ru*

Аннотация. Изучено влияние матриксов молочных продуктов на хроматографическое разделение синтетических красителей азо-, трифенилметанового и индигоидного ряда, разрешенных в настоящее время к применению в пищевой промышленности РФ. Проанализированы факторы, оказывающие влияние на полноту и селективность сорбции красителей из молочных продуктов. Приведены научные данные о конфигурации и конформации белковых матриксов, факторах их стабилизации в растворе и способах их осаждения. Раскрыты основные трудности выделения красителей из сложных белковых матриксов. Полученные результаты открывают новые перспективы в области внедрения и использования методов оперативного контроля синтетических красителей в продуктах питания.

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

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 отнюдь не безвредны. В определенных концентрациях они могут оказывать негативное влияние на здоровье человека, в частности, вызвать различные аллергические реакции и гиперактивность у детей [2].

Несмотря на регламентирование применения синтетических пищевых красителей в пищевой продукции, в ряде случаев имеет место их бесконтрольное использование, это приводит к превышению их допустимого содержания и фальсификации продуктов. Необходим оперативный контроль содержания синтетических пищевых

красителей в различных продуктах питания, что является сложной задачей, связанной, прежде всего, с трудностью их извлечения из сложных пищевых матриксов.

Нормативные документы для определения синтетических пищевых красителей в пищевой продукции начали разрабатываться с 1992 г. в связи со значительным притоком импортных товаров на российский рынок. Настоящим прорывом в этом направлении следует, по-видимому, считать период 1999–2002 гг., когда был разработан способ, основанный на сорбции красителей из пищевых продуктов на окись алюминия с последующим хроматографическим разделением и денситометрическим измерением содержания красителей [3–6]. Позже стали прорабатываться и другие альтернативные подходы, связанные, главным образом, с привлечением высокоаналитических средств измерений [5, 7].

В данной работе я хотел бы отдельно остановиться на разработанном еще в 2009 г. нормативном документе [7], регламентирующем методику измерения содержания красителей в молочных продуктах при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии. И этому есть серьезные причины.

Уже при беглом взгляде на данный текст хорошо заметны его очевидные недостатки:

- неудовлетворительные метрологические характеристики результатов измерений: границы относительной погрешности от 45% до 57%;
- объектов измерений (красителей) выбрано всего пять из большого 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.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

На сегодняшний день многие натуральные источники энергии людей в значительной степени замещены идентичными натуральным или искусственными ингредиентами. Сказанное в полной мере относится к жирам и углеводам,



но не к белкам, что объясняется сложностью их состава и незаменимостью 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 в настоящее время для использования 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; основные недостатки: частая смена предколонок и наличие неинформативных пиков, затрудняющих обработку хроматографических данных. Впрочем, если бы удалось установить, что наличие таких пиков не будет препятствовать чтению хроматограмм, то подход, по-видимому, следовало бы признать приемлемым.

Имеющиеся научные данные о конфигурации и конформации белковых матриц, факторах их стабилизации в растворе и способах их осаждения в свете интересующей нас темы представлены ниже.

В основе каждого белка лежит полипептидная цепь. Она не просто вытянута в пространстве, а организована в трехмерную структуру. Особое взаимное расположение в пространстве спиралеобразных, складчатых и нерегулярных участков полипептидной цепи формирует третичную структуру белка, в которой участвуют дисульфидные и все слабые типы связей.

Выделяют два общих типа третичной структуры: фибриллярную (имеющую вытянутую форму и образующую волокнистую структуру тканей) и глобулярную, молекулы которых имеют форму шара или эллипса.

В глобулярных белках всегда есть нерегулярные участки, β -складчатые структуры и α -спирали. Также известно [8], что в глобулярных белках гидрофобные участки молекулы находятся в глубине молекулы. Соединяясь между собой, гидрофобные радикалы образуют кластеры (центры). Формирование гидрофобного кластера вынуждает молекулу соответствующим образом изгибаться в пространстве. Обычно в молекуле глобулярного белка бывает несколько гидрофобных кластеров в глубине молекулы. Это проявление двойственно-

сти 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. Обратный процесс освобождения инородных молекул из белковой матрицы называется десорбцией.

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%.

По пространственному расположению полипептидных цепей белки молока относятся к глобулярным белкам. Изучение их вторичной и третичной структур показало, что казеин почти не содержит α -спиралей и занимает, как считают, промежуточное положение между компактной структурой глобулы и структурой беспорядочного клубка, которая обычно наблюдается при денатурации глобулярных белков [9].

Помимо казеина в молоке присутствуют сывороточные белки: β -лактоглобулин, α -лактальбумин, иммуноглобулин и альбумин сыворотки крови и некоторые другие, так называемые минорные, белки. При нагревании молока до температуры 30 °С β -лактоглобулин распадается на мономеры. Альбумин сыворотки крови содержится в молоке в незначительном количестве и не имеет практического значения.

К третьей группе относят белки оболочек жировых шариков, составляющие всего около 1% всех белков молока [9].

К факторам стабилизации белка в растворе следует отнести:

- наличие гидратной оболочки – слоя молекул воды, определенным образом ориентированных на поверхности белковой молекулы. Поверхность белковых молекул заряжена отрицательно, и диполи молекул воды притягиваются к ней своими положительными полюсами. Вода гидратной оболочки обладает особым свойством: окружая молекулы белка, она не дает им сблизиться, соединиться и выпасть в осадок. Связанной оказывается значительное количество воды – около 3,7 г на 1 г белка;

- наличие свободных заряженных групп. Изоэлектрическая точка (ИЭТ), то есть кислотность среды, при которой поверхность не несет электрического заряда, большинства белков находится в слабокислой среде. Для казеина она составляет 4,6, для β -лактоглобулина 5,1. Это означает, что кислотных групп в них больше, чем 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, то есть 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 [9]. Тем не менее, в сильно кислой или в сильно щелочной средах молекулы белка в осадок не выпадают, потому что у них остается один из факторов стабилизации – заряд. Сохранение заряда не позволяет молекулам белка сблизиться друг с другом – агрегация полипептидных цепей не происходит. 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, – это процесс скорее нежелательный, ведущий к неприятным потерям при выделении анализируемых компонентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ

Воспроизведена методика определения содержания красителей, изложенная в [7]. Установлено, что на стадии фильтрации пробы молочных продуктов через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм имеет место значительная потеря красителей. То же самое наблюдалось при центрифугировании анализируемых проб. Промывка фильтра и осадка после центрифугирования с последующим объединением проб ситуации не изменяла. Использование физических факторов денатурации белков: ультразвукового воздействия рабочей частотой 40 кГц и нагревания до 60 °С также не принесли положительного эффекта.

При использовании химических факторов воздействия на белки с последующей фильтрацией было выявлено следующее: использование нейтральных солей (хлорида натрия и кальция) и органических растворителей (метанола, ацетона) не повлияло в значительной мере на степень извлечения красителей и лишь 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 же рН в кислую сторону до 3,0 привело лишь к агрегации белков при хорошо заметном визуальном обесцвечивании исследуемого продукта.

Учитывая полученные результаты, было принято решение отказаться от проведения многостадийной подготовки пробы, ограничившись лишь подщелачиванием анализируемых образцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые образцы: пастеризованное молоко, биокефир и йогурт, в состав которых вводился сложный 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 10 ppm каждый.

Для проведения эксперимента использовалось следующее оборудование:

- жидкостной хроматограф *Shimadzu LC-20 Prominence* с автосамплером (рис. 1), который представляет собой систему из следующих компонентов для высокоэффективных хроматографов: системного контроллера *CBM-20A*, поточного дегазатора *DGU-20A5R*, автосамплера *SIL-20A*, модуля подачи растворителя *LC-20AD*, отсека для сосудов *Reservoir tray*, колоночного термостата *CTO-20AC*, спектрометрического детектора *SPD-20A*. Обработка полученных результатов проводилась посредством пакета прикладных программ к хроматографическому оборудованию *Shimadzu LCsolution*;

- ультразвуковая ванна *Branson*;
- виалы с герметично закрывающимися крышками вместимостью 1 мл *Macherey-Nagel CmbH Co. KG*.

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

Для проверки пригодности уравновешивали хроматографическую систему до стабилизации базовой линии.

Хроматографировали раствор для оценки чувствительности, для приготовления которого по 1 мл красителей «тартразин» E102 и «патентованный синий» E131 растворяли дистиллированной водой в колбе ($V = 500$ мл). Хроматографическая система считалась пригодной, если

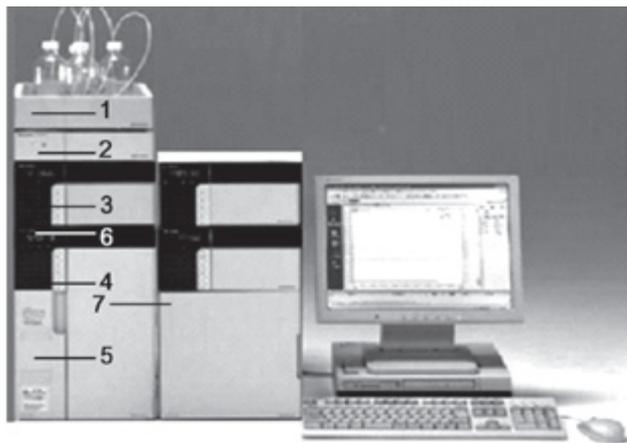


Рис. 1. Хроматограф LC-20 prominence с автосамплером

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

- 1 – отсек для сосудов Reservoir tray;
- 2 – системный контроллер CBM-20A;
- 3 – модуль подачи растворителя LC-20AD;
- 4 – поточный дегазатор DGU-20A5R;
- 5 – автосамплер SIL-20A;
- 6 – спектрометрический детектор SPD-20A;
- 7 – колоночный термостат CTO-20AC

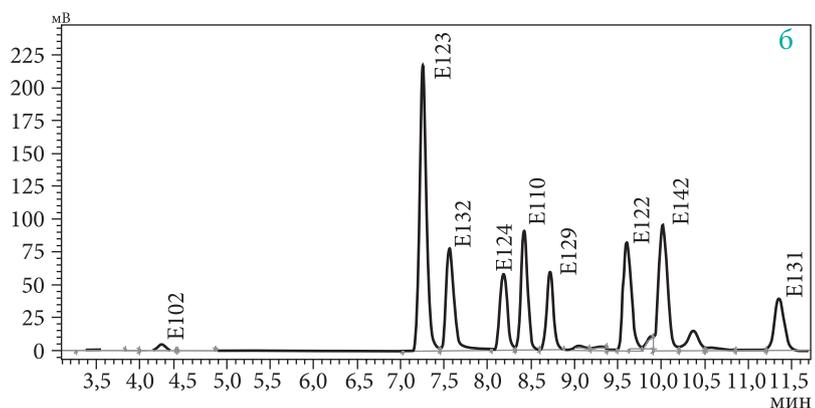
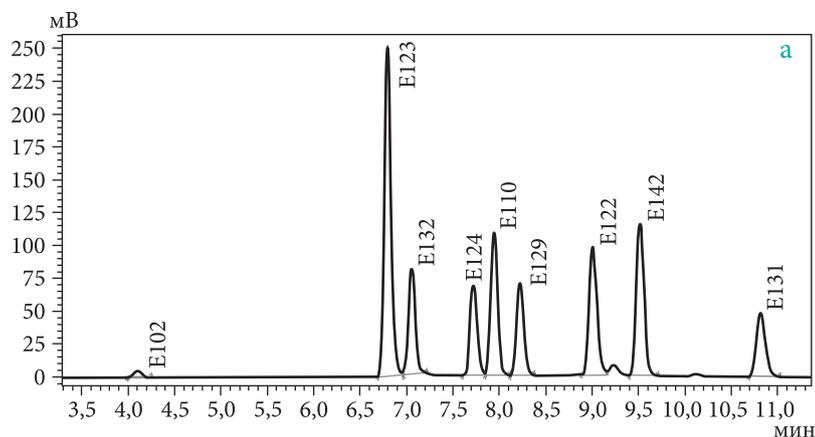
отношение «сигнал–шум» для пиков красителей было не менее 10.

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

Хроматографические условия:

Колонка	(250 × 4,6) мм, октадецилсиликагель, 5 мкм, Inertsil C18 (2) 150A, Phenomenex с предколоной 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 трех минут и далее двенадцать минут при соотношении (60 : 40)
Скорость потока	1,0 мл/мин
Температура колонки	25 °С
Детектор	280 нм и 370 нм
Объем пробы	82 мкл
Время хроматографирования	15 мин
Время удерживания	показаны на рис. 2

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



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 рис. 2.

Рис. 2. 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 матриксы 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 матриксе молочной продукции (табл. 1).

Таблица 1.

Полнота извлечения пищевых синтетических красителей из матриксов 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

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 красителей с фильтра обычно достаточно использовать слегка подщелоченную воду для предотвращения ионизации сульфатных групп. Следовательно, потери на этой стадии подготовки пробы могут быть объяснены только сорбционным удерживанием красителей матриксами белков молочных продуктов. То же самое, по-видимому, имеет место при центрифугировании. Таким образом, установлено, что методика измерения, изложенная в [7], является некорректной и требует скорейшей доработки.

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.

Показана 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 красителей, определяемая путем расчета площадей пиков анализируемых образцов и образцов сравнения, составила 74,7...99,2% для всех видов исследуемых молочных продуктов. При этом времена удерживания красителей и площади их пиков полностью совпали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Титова, Н.Д. Пищевые добавки как алиментарные аллергены / Н.Д. Титова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 2. – С. 41–46.
2. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) в ред. решений Комиссии Таможенного союза от 17.08.2010 № 341, от 18.11.2010 № 456, от 02.03.2011 № 571, от 07.04.2011 № 622; от 18.10.2011 № 829; от 09.12.2011 № 889. Глава II. Раздел 22 «Требования безопасности пищевых добавок и ароматизаторов». – М., 2011. – 331 с.
3. Пацовский, А.П. Электрофоретическое определение синтетических красителей в алкогольных напитках / А.П. Пацовский [и др.] // Журнал аналитической химии, 2004. – Т. 59. – № 2. – С. 170–175.
4. Алкогольные напитки. Методы идентификации и определения содержания синтетических красителей. ОСТ 10-298-2002. – СПб.: Минсельхоз России, 2002. – 26 с.
5. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения массовой доли синтетических красителей в карамели. ГОСТ 32050-2013. – М.: Стандартинформ, 2014. – 46 с.
6. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения содержания массовой доли синтетических красителей замороженных десертов. ГОСТ 32780-2014. – М.: Стандартинформ, 2015. – 16 с.
7. Молоко и молочная продукция. Определение содержания консервантов и красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. ГОСТ Р 53752-2009. – М.: Стандартинформ, 2010. – 16 с.
8. Третичная структура [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: http://belok-s.narod.ru/tb_4_3.htm, свободный (дата обращения: 30.05.2016).
9. Тепел, А. Химия и физика молока / А. Тепел. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 323 с.



Experience the chromatographic separation of synthetic dyes in the composition of matrices of dairy products

A.P. Patsovskiy, candidate of technical sciences, associate professor of Research Center of Target Delivery of Drugs (RCTDD), JSC Galenofarm; St. Petersburg
e-mail: patsovskiy_ap@mail.ru

Influence of matrices of dairy products, on chromatographic separation of synthetic dyes azo-, a trifenilmetanovy and indigoidny row, allowed now for use in the food industry of the Russian Federation is studied. The factors exerting impact on completeness and selectivity of sorption of dyes from dairy products are analysed. The available scientific data on a configuration and conformation of proteinaceous matrices, factors of their stabilization in solution and methods of their sedimentation are provided. The main difficulties of release of dyes from difficult proteinaceous matriks are disclosed. The received results open new prospects before the specialists who are engaged in implementation and use of methods of operating control of synthetic dyes in food.

Keywords: synthetic food dyes, dairy products, proteins, adulteration of food products.

Reference:

1. Titova N.D. Nutritional supplements as nutritional allergens. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2008. No. 2. Pp. 41–46.

2. Uniform sanitary and epidemiologic and hygienic requirements to the goods which are subject to sanitary and epidemiological supervision (control) in edition of decisions of the Commission of the Customs union of 17.08.2010 No. 341, of 18.11.2010 No. 456, of 02.03.2011 No. 571, of 07.04.2011 No. 622; of 18.10.2011 No. 829; of 09.12.2011 No. 889. Chapter II. Section 22 «Safety Requirements of Nutritional Supplements and Fragrances». Moscow. 2011. 331 p.

3. Patsovskiy A.P., Rudometova N.V., Kamentsev Ya.S. Electrophoretic definition of synthetic dyes in alcoholic beverages. *Magazine of analytical chemistry*. 2004. V. 59. No. 2. Pp. 170-175.

4. OST 10-298-2002 Alcoholic beverages. Methods of identification and determination of content of synthetic dyes. Saint Petersburg. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. 2002. 26 p.

5. GOST 32050-2013. Foodstuff. Methods of identification and determination of a mass fraction of synthetic dyes in caramel. Moscow. Standartinform, 2014. 46 p.

6. GOST 32780-2014. Foodstuff. Methods of identification and determination of content of a mass fraction of synthetic dyes the refrigerated desserts. Moscow. Standartinform. 2015. 16 p.

7. GOST P 53752-2009. Milk and dairy products. Determination of content of preservatives and dyes by method of a highly effective liquid chromatography. Moscow. Standartinform. 2010. 16 p.

8. Tertiary structure. Available at: http://belok-s.narod.ru/tb_4_3.htm.

9. Tepel A. *Chemistry and physics of milk*. Moscow. Food industry. 1979. 323 p.

