

УДК 543.545.4

РАЗДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИЩЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ E 110 И E 122 МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

О. Ю. Коновалова, В. В. Тимченко, Н. А. Никитина

Показана возможность электрофоретического разделения пищевых красителей в агарозном и полиакриламидном гелях. Оптимизированы условия проведения гель-электрофореза и определения красителей E 110 и E 122. Показана возможность использования приемов полуколичественного анализа и аппарата оценивания метрологических характеристик методик, применяемых в визуально-тестовом анализе, для обработки результатов гель-электрофореза. Разработанные методики электрофоретического разделения и фотометрического/визуального определения красителей испытаны при анализе пищевых продуктов.

Ключевые слова: гель-электрофорез, агароза, полиакриламид, E 110, E 122, метрология.

Введение

Электрофоретический метод используется в настоящее время в основном для анализа и очистки белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов [1-5]. Наибольшее распространение получил зональный электрофорез в инертных поддерживающих средах, таких как бумага [6,7], ацетатцеллюлозные пленки [8], гели [9-18] и др. [2, 19]. Как поддерживающие среды в методе гель-электрофореза часто используют агарозный и полиакриламидный гели. Они достаточно просты в приготовлении, обеспечивают удовлетворительное качество разделения и воспроизводимость, для анализа требуются малые количества пробы. В основном электрофорез в агарозном и полиакриламидном гелях используют при анализе крупных биологических молекул [11,12,14,16-18]. Однако, вследствие простоты и дешевизны гель-электрофорез позволяет приспособить некоторые его варианты для массовых анализов, в том числе и пищевых продуктов. Красители в продуктах питания определяют в основном хроматографическими методами [20-24], в которых в качестве подвижных фаз используют смеси токсичных и летучих органических растворителей, а в случае метода высокоэффективной жидкостной хроматографии требуется дорогостоящее оборудование [23, 24]. Для совместного определения красителей E 104 и E 110 предложен метод производной спектрофотометрии [25], а в работе [26] разделяли и определяли синтетические красители в напитках методом капиллярного электрофореза с применением специального оборудования. Планарный гель-электрофорез не связан с использованием токсичных растворителей или сложных и дорогостоящих приборов, прост в выполнении, поэтому разработка методик электрофоретического разделения и последующего определения пищевых красителей в продуктах питания является актуальной задачей. В работе [10] использовали электрофорез в агарозном геле для определения синтетических красителей, добавляемых для корректировки и фальсификации цвета вина и коньяка. Однако, в целом, возможности гель-электрофореза при анализе пищевых продуктов использованы недостаточно.

Количественный состав пробы оценивают, обрабатывая электрофореграммы. Оценивают интенсивность окраски зон разделенных компонентов смеси непосредственно на пластине геля либо на ее фотографии, на отпечатках гелиевых электрофореграмм на специальной бумаге; анализируют растворы, полученные элюированием компонентов из геля с его сохранением либо разрушением специальными химическими реагентами [2]. Пластины геля после электрофореза, ее фотографию или копию на специальной бумаге сканируют при помощи денситометра [2]. Для обработки фотографических изображений предлагаются также специальные программные обеспечения [6, 18]. Кроме того, для получения самих изображений используется специальная гель-документирующая система, оснащенная «темной комнатой» и блоком оптики [18]. Количественный анализ ведут по собственному поглощению УФ-света аналитами, по флуоресценции собственной или в соединении со специальными реагентами, по поглощению окрашенных производных или, измеряя радиоактивность меченных радиоактивными маркерами аналитов [2].

Для упрощения, ускорения и удешевления обработки результатов гель-электрофореза в работе изучали возможность применения приемов полуколичественного анализа и аппарата оценивания метрологических характеристик методик, широко используемых в методах визуально-тестового анализа [27-32].

Экспериментальная часть

Используемые реагенты. Азорубин (E 122), оранжевый желтый S (E 110), тартразин (E 102), бриллиантовый синий (E 133), индигокармин (E 132) (х.ч.); агароза (х.ч.); акриламид, N, N'-метилен-бис-акриламид, N,N,N'N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (для электрофореза, 99%); персульфат калия (ч.д.а.). Для регулирования кислотности использованы: дигидрофосфат калия, гидрофосфат натрия, трис-(гидроксиметил)-аминометан (ч.д.а.), глицерин, хлороводородная кислота, уксусная кислота (х.ч.), метиловый спирт (х.ч., объемная доля 99 %).

Фосфатный буфер и трис-буфер готовили по методикам, описанным в [33, 34].

Исходные растворы красителей с концентрацией 0.01 моль/л готовили растворением точных навесок в дистиллированной воде. Рабочие растворы красителей получали, разбавляя исходные в дистиллированной воде. Для увеличения плотности растворов индикаторов полученные растворы смешивали с 50 % раствором глицерина в соотношении 1 : 1.

Приготовление гелиевых пластин.

Полиакриламидный гель. Для приготовления полиакриламидного геля готовили растворы А, В, С и D [34]. Для приготовления раствора А в мерную колбу вместимостью 25 мл вносили 4.5 г трис-(гидроксиметил)-аминометана, добавляли 2 мл дистиллированной воды, 6 мл раствора 1 моль/л HCl, 0.05 мл ТЕМЕД и доводили до метки дистиллированной водой. Для приготовления раствора В в мерную колбу вместимостью 25 мл вносили 0.2 г N, N'-метилен-бис-акриламида, добавляли небольшое количество воды и перемешивали до полного растворения. Затем в колбу вносили 7 г акриламида и доводили до метки дистиллированной водой. Раствор фильтровали. Для приготовления раствора С в мерную колбу вместимостью 50 мл вносили 0.15 г персульфата калия и доводили до метки дистиллированной водой. Раствор С готовили непосредственно перед исследованиями, чтобы предотвратить разложение основного компонента. Для приготовления рабочего раствора D смешивали растворы А, В и С в соотношении 1 : 1 : 2.

Агарозный гель. Для приготовления агарозного геля навеску агарозы растворяли в 150 мл фосфатного буфера и после перемешивания полученный раствор ставили на водяную баню. Раствор агарозы нагревали при перемешивании, не допуская кипения, до прозрачного состояния. Затем расплав охлаждали при комнатной температуре до 55-60 °С.

Заливка геля. Не допуская образования пузырьков воздуха, полученный гель заливали в гелиевую рамку, установленную в выровненный столик для заливки гелей. Устанавливали гребенки, не касаясь дна формы. После полного застывания геля плавным движением вверх гребенки осторожно извлекали, стараясь не повредить образовавшиеся лунки.

Оборудование. Спектры поглощения в видимой области регистрировали на фотометре КФК-3. Растворы фотометрировали против холостого раствора, содержащего все реагенты, кроме анализа.

Значения рН определяли потенциометрически по компенсационной схеме (потенциометр Р 307, рН-метр милливольтметр рН-121 как нуль инструмент, стеклянный электрод ЭСЛ-63-07 и электрод сравнения ЭВЛ-1М3.1). Для градуировки использовали стандартные буферные растворы.

Для проведения электрофореза использовали камеру для горизонтального электрофореза «SE-2» и источник питания «Эльф-4». Гели готовили, используя столик для заливки, гелиевую рамку и гребенки.

Результаты и обсуждение

Оценка возможности разделения красителей методом гель-электрофореза. Возможность разделения пищевых красителей методом горизонтального гель-электрофореза оценивали, используя агарозный и полиакриламидный гели. Электрофорез в агарозном геле проводили в фосфатном буферном растворе (рН 6.28), а в полиакриламидном геле — в растворе трис-

буфера (рН 8.61). При электрофорезе в гелиевых средах все исследуемые пищевые красители Е 102, Е 110, Е 122, Е 132 и Е 133 мигрировали к аноду. Следовательно, в условиях эксперимента молекулы красителей имели отрицательный заряд.

В работе анализировали продажные индивидуальные пищевые красители «Желтый» и «Синий» ТМ «Просто чудо» и их смеси «Зеленый» ТМ «Просто чудо», «Зеленый» ТМ «Украза», «Зеленый» ТМ «Евробленд». В результате электрофореза краситель «Зеленый» ТМ «Просто чудо» разделился на желтый Е 102 и синий Е 133; краситель «Зеленый» ТМ «Украза» разделился на желтый Е 102 и синий Е 132; краситель «Зеленый» ТМ «Евробленд» разделился на желтый Е 102 и синий Е 133, что не соответствовало составу, заявленному производителем.

Скорость электрофоретического разделения в полиакриламидном геле существенно увеличивалась при полном покрывании геля раствором буфера, а краситель, внесенный в лунки под буфер, в этом случае опускался на дно значительно быстрее.

Подвижность молекул красителей в полиакриламидном геле при прочих равных условиях оказалась выше, а пятна красителей размывались меньше, чем в агарозном геле. Однако, вследствие нестабильности свойств получаемого полиакриламидного геля, трудоемкости методики его приготовления и дороговизны исходных реагентов, в дальнейшем предпочтительнее использовать агарозу в качестве носителя для гель-электрофореза.

Оптимизация условий разделения красителей методом гель-электрофореза. Известно, что средний радиус пор готового агарозного геля зависит от его концентрации. Поры в агарозном геле достаточно велики и при концентрациях агарозы ниже 2 % эффект молекулярного сита обычно ничтожен [4]. Поскольку поры геля должны лишь тормозить миграцию молекул аналита в электрическом поле за счет трения, влияние плотности агарозного геля на электрофоретическое разделение красителей оценивали, изучая разделение в гелях, полученных из 1, 1.25 и 1.5 % растворов агарозы. Повышение концентрации агарозы приводило к уменьшению размера пор получаемого геля и понижению электрофоретической подвижности молекул красителей в геле (таблица 1). Гели с оптимальной для анализа плотностью получили из 1 % раствора агарозы.

Таблица 1. Зависимость расстояния, пройденного красителями при электрофорезе, от концентрации агарозы в растворе для приготовления геля

Время электрофореза, мин	Краситель	Расстояние, пройденное красителем, см		
		1 % агарозы	1.25 % агарозы	1.5 % агарозы
60	Е 102	0.9	0.8	0.75
	Е 133	0.35	0.3	0.3
120	Е 102	1.8	1.7	1.4
	Е 133	0.8	0.65	0.5
180	Е 102	2.55	2.45	2.3
	Е 133	1.0	0.9	0.8

Оранжевый желтый S (Е 110) желто-оранжевого цвета и азорубин (Е 122) розового цвета часто используют при подкрашивании продуктов питания. Поэтому дальнейшие исследования посвящены разработке методик электрофоретического выделения и последующего определения этих красителей в пищевых продуктах.

Спектры поглощения красителей Е 110 и Е 122 в растворе и агарозном геле после электрофоретического разделения представлены на рис. 1. Для спектрофотометрических оценок слой геля с пятном красителя после электрофореза вырезали по трафарету так, чтобы при помещении объекта в кювету на 0.5 см луч фотометра проходил через центр пятна аналита. Фотометрирование проводили против образца геля, обработанного в таких же условиях, что и гель с аналитом. Максимумы светопоглощения красителей в агарозном геле после разделения наблюдались при той же длине волны, что и в водном растворе – для красителя Е 110 λ_{\max} 485 нм, а

для красителя Е 122 λ_{\max} 516 нм (рис. 1). Это указывает на отсутствие химических взаимодействий между красителями и материалом разделяющей среды.

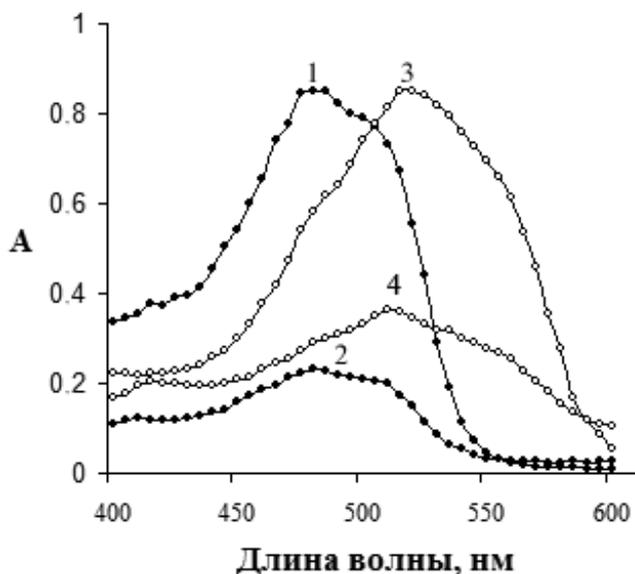


Рисунок 1. Спектры поглощения пищевых красителей в растворе и в агарозном геле после разделения:
 1, 3 □ раствор $3.4 \cdot 10^{-5}$ моль/л красителя Е 110 и Е 122 соответственно; кювета 1 см;
 2, 4 □ агарозный гель после контакта с раствором $1.2 \cdot 10^{-3}$ моль/л красителя Е 110 и Е 122 соответственно.

В работе оценивали зависимость формы, диаметра пятен и расстояния, пройденного красителями при электрофорезе, от времени (таблица 2). Гель-электрофорез проводили при силе тока 400 мА и напряжении 100 В, как было предложено в работе [4].

Таблица 2. Зависимость расстояния, пройденного красителями при электрофорезе, формы и диаметра пятен от времени

Время электрофореза, мин	Форма пятна	Диаметр пятна красителя, см		Расстояние, пройденное красителем, см	
		Е 110	Е 122	Е 110	Е 122
30		0.4	0.4	0.6	0.4
60		0.6	0.6	1.3	0.9
90		0.8	0.9	1.8	1.2

Через 60 мин гель-электрофореза красители Е 110 и Е 122 разделились полностью, а путь, пройденный пятнами красителей, увеличился в два раза по сравнению с результатом полученным для 30 мин разделения. В то время как при дальнейшем увеличении времени разделения до 90 минут наблюдалось существенное размывание пятен красителей при увеличении пройденного аналитами пути на 26 %. Поэтому электрофоретическое разделение красителей в дальнейшем проводили в течение 60 мин.

Время наблюдения аналитического эффекта оценивали спектрофотометрически. В течение одного часа после электрофоретического разделения светопоглощение красителей в геле менялось незначительно, хотя пятна красителей со временем размывались. Это связано с тем, что за время измерения размывающиеся пятна полностью «охватывались» неточечным лучом спектрофотометра. Аналитический сигнал в дальнейшем фиксировали в интервале 30 мин – 60 мин после разделения. Такой интервал наблюдения был удобен и для оценки метрологических характеристик методик электрофоретического разделения и полуколичественного определения красителей.

Количественный анализ после гель-электрофореза. Количественный анализ проводили непосредственно на гелиевой пластине после разделения. Метрологические характеристики методик оценивали спектрофотометрически, а также, применяя приемы полуколичественного анализа и аппарат оценивания, используемые в методах визуально-тестового анализа [27-32].

Важнейшими метрологическими характеристиками методики являются предел обнаружения (c_{\min}) и предел определения (c_{\lim}) [35]. Определение величины c_{\min} в тест-анализе базируется на исследованиях в интервале ненадежности, где вероятность обнаружения аналита изменяется от 0 до 1. Для сравнения систем с разным диапазоном концентраций удобно использовать величину относительной ширины интервала ненадежности. Она равна отношению разности концентраций на верхней и нижней границе интервала ненадежности к значению концентрации на нижней границе [36]. Для оценки предела обнаружения находили частоты обнаружения в интервале ненадежности и расчетным методом определяли вид функции распределения частот.

В нашей работе использован алгоритм определения c_{\min} , описанный в [29]. Группой из 15-20 независимых наблюдателей выявляли интервал ненадежности как область концентраций, в которой были положительные и отрицательные результаты обнаружения аналита. В этом интервале выбирали 7-12 равноудаленных значений концентрации, которые отличались друг от друга не менее чем на утроенное значение абсолютной погрешности приготовления растворов. Для каждой концентрации красителя повторяли испытание 3 раза, результаты каждого испытания визуальное оценивало 15 человек. Частоту обнаружения для отдельного испытания рассчитывали как отношение числа положительных ответов о наличии окраски к общему числу наблюдений. По значениям частот обнаружения, полученных в параллельных испытаниях, находили среднее значение и дисперсию частоты обнаружения аналита для каждой концентрации. Экспериментальную зависимость частоты обнаружения от концентрации аналита описывали известными функциями распределения вероятностей. Качество описания экспериментальных данных оценивали с помощью критериев χ^2 и Колмогорова-Смирнова (λ) [37]. Если расчетные значения параметров не превышали значений 5%-ных точек, то принимали гипотезу о соответствии экспериментального распределения соответствующей теоретической функции распределения (таблица 3). Если эти условия выполнялись для нескольких видов распределения, выбирали то, для которого значения вычисленных критериев χ^2 и λ были наименьшими. Для выбранного распределения вычисляли c_{\min} .

Распределение экспериментальных частот обнаружения красителей Е 110 и Е 122 в интервале ненадежности хорошо описывалось всеми рассмотренными теоретическими функциями. Наименьшие значения χ^2 и λ наблюдались для распределений Вейбулла и логнормального, однако в первом случае значения рассчитанных параметров были несколько ниже. Оценки c_{\min} , полученные при использовании этих функций, не отличались друг от друга.

Визуальные количественные определения базируются на сравнении окраски пятна красителя, полученной после электрофоретического разделения, со шкалой сравнения. Для построения цветовых шкал в лунки на гелиевой пластинке вносили растворы красителя с разной концентрацией. Концентрация раствора красителя изменялась от раствора к раствору в геометрической прогрессии с множителем 2 [38]. За предел определения принимали то минимальное содержание, которое можно определить данным методом с относительным стандартным отклонением 33 %, отсюда $c_{\lim} = 3 \cdot s_c$, где s_c – стандартное отклонение определения концентрации [39]. Величину стандартного отклонения s_c оценивали экспериментально по методике, описанной в [29].

В таблице 4 сведены метрологические характеристики методик разделения и полуколичественного определения пищевых красителей методом гель-электрофореза.

Таблица 3. Результаты описания экспериментальной зависимости частоты обнаружения от концентрации различными функциями распределения

Вид и параметры распределения		Краситель	
		Е 110 (f=4)	Е 122 (f=5)
Нормальное распределение	$\chi^2_{\text{экс.}}$	8.0	3.2
	$\lambda_{\text{экс.}}$	0.3	0.2
	c_{\min} , ммоль/л	0.11	0.08
Распределение Вейбулла	$\chi^2_{\text{экс.}}$	0.9	0.9
	$\lambda_{\text{экс.}}$	0.1	0.1
	c_{\min} , ммоль/л	0.12	0.08
Экспоненциальное распределение	$\chi^2_{\text{экс.}}$	7.5	6.1
	$\lambda_{\text{экс.}}$	0.3	0.3
	c_{\min} , ммоль/л	0.15	0.09
Логнормальное распределение	$\chi^2_{\text{экс.}}$	1.2	1.2
	$\lambda_{\text{экс.}}$	0.2	0.1
	c_{\min} , ммоль/л	0.12	0.08

f – число степеней свободы. При $\alpha=5\%$ и f=4: $\chi^2=9.49$; $\lambda=0.62$; при $\alpha=5\%$ и f=5: $\chi^2=11.07$; $\lambda=0.56$ [37].

Таблица 4. Метрологические характеристики методик электрофоретического разделения и полуколичественного определения красителей в агарозном геле

Метрологическая характеристика	Краситель	
	Е 110	Е 122
Интервал ненадежности, ммоль/л	0.03 – 0.14	0.03 – 0.08
Относительная ширина интервала ненадежности	3.7	1.7
Предел обнаружения c_{\min} , ммоль/л	0.12	0.08
Стандартное отклонение s_c , ммоль/л	0.05	0.03
Предел определения c_{\lim} , ммоль/л	0.15	0.09

Спектрофотометрически находили область линейной зависимости светопоглощения геля с красителем от концентрации красителя в растворе (таблица 5). В диапазонах линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации красителей получали параметры градуировочных графиков и их стандартные отклонения. Эти характеристики использовали для расчета пределов фотометрического определения Е 110 и Е 122 в соответствии с рекомендациями ИЮПАК [35] (таблица 5).

Таблица 5. Характеристики спектрофотометрического определения красителей в агарозном геле после электрофоретического разделения

Краситель	Параметры градуировочного графика $A = a + b \cdot c$		Коэффициент корреляции, R	Диапазон линейности, ммоль/л	Предел определения, c_{\lim} , ммоль/л
	a	b			
Е 110	0.018±0.015	0.22±0.02	0.988	0.22 – 1.2	0.22
Е 122	0	0.30±0.03	0.985	0.13 – 0.7	0.13

Для красителя Е 110 значения оцененных метрологических характеристик методик оказались почти в два раза выше, чем для красителя Е 122 (таблицы 4 и 5). Это связано с большей контрастностью красного пятна красителя Е 122 в слое геля, по сравнению с оранжево-желтым пятном красителя Е 110.

Определение содержания красителей Е 110 и Е 122 в продуктах питания. Разработанные методики использовали для определения содержания красителей Е 110 и Е 122 в продуктах питания. Пробоподготовку объектов проводили следующим образом.

Для определения Е 110 и Е 122 в красителях для окрашивания яиц «Оранжевый» (ТМ «Квітень», Украина) и «Красный» (ТМ «Просто чудо», Украина) навеску порошка красителя (0.05 г) растворяли в 25 мл дистиллированной воды. Полученный раствор смешивали с раствором глицерина в соотношении 1 : 1.

Для определения Е 122 в напитках «PitBull energy» и «Роджерс «Ром тропик» (ООО «Напої Плюс», Украина) аликвоту напитка 100 мл упаривали в 5 раз и полученный раствор смешивали с раствором глицерина в соотношении 1 : 1.

С помощью микрошприца 10 мкл полученных растворов вносили в лунки геля и подвергали электрофорезу в течение 60 мин при силе тока 200 мА и напряжении 100 В. Через 30 мин после разделения образец геля с красителем оценивали визуально или спектрофотометрически. Визуальное определение проводили по цветовой шкале, полученной одновременно с анализируемым образцом. Спектрофотометрическое определение проводили, измеряя поглощение образца геля с красителем при 485 нм (Е 110) или 516 нм (Е 122) против образца геля, обработанного в тех же условиях, что и анализируемый образец. Содержание Е 110 или Е 122 определяли по заранее построенному градуировочному графику.

Результаты анализа по предлагаемой методике сопоставляли с результатами, полученными по спектрофотометрической методике в растворе [40] (таблица 6). Правильность предложенной методики проверена также методом «введено – найдено», путем введения известного количества аналита в приготовленный раствор пищевого продукта (таблица 7). В соответствии с рекомендациями авторов работы [30] результаты визуального определения представляли в виде среднего значения и диапазона разброса результатов определения.

Из таблиц 6 и 7 видно, что фотометрирование красителей или их визуальное определение в агарозном геле после разделения обеспечивают удовлетворительную правильность и сходимость результатов определения Е 110 и Е 122 в продуктах питания.

Таблица 6. Результаты определения красителей Е 110 и Е 122 в продуктах питания (P=95 %, n=3)

Аналит	Объект	Определение в растворе	Определение в среде геля		
		СФ, с, ммоль/л	ВО, с, ммоль/л		СФ, с, ммоль/л
			Средний результат	Диапазон разброса результатов	
Е 110	Краситель для яиц «Оранжевый»	0.515±0.006	0.55	0.45 – 0.60	0.52±0.08
Е 122	Краситель для яиц «Красный»	0.300±0.005	0.3	0.25 – 0.33	0.26±0.04
	Напиток «Pit-Bull energy»	0.1507±0.0011	0.15	0.12 – 0.16	0.15±0.03
	Напиток «Роджерс «Ром тропик»	0.155±0.005	0.15	0.12 – 0.16	0.17±0.04

Таблица 7. Результаты определения красителей E 110 и E 122 в агарозном геле методом «введено – найдено» (P=95 %, n=3)

Аналит	Объект	Введено, с, ммоль/л	Найдено, с, ммоль/л		
			ВО		СФ
			Средний ре- зультат	Диапазон разброса ре- зультатов	
E 110	Краситель для яиц «Оранжевый»	0.25	0.24	0.17 – 0.31	0.24±0.03
E 122	Краситель для яиц «Красный»	0.12	0.13	0.09 – 0.17	0.12±0.02
	Напиток «PitBull energy»		0.11	0.09 – 0.13	0.13±0.02
	Напиток «Роджерс «Ром тропик»		0.12	0.09 – 0.15	0.13±0.03

Выводы

Среды агарозного и полиакриламидного гелей пригодны для электрофоретического разделения пищевых красителей E 102, E 110, E 122, E 132 и E 133. Лучшими характеристиками обладает агарозный гель. Оптимальные результаты получили при электрофорезе в течение 60 мин при силе тока 400 мА и напряжении 100 В в геле, приготовленном из 1 % раствора агарозы. Аналитический сигнал наблюдали через 30 мин – 60 мин после разделения. Применяя для обработки результатов электрофореза аппарат оценивания метрологических характеристик методик, используемый в визуально-тестовых методах, оценили интервал ненадежности, c_{\min} , s_c , c_{\lim} . Для фотометрических измерений оценены диапазон линейности и c_{\lim} . Значения c_{\lim} составили для красителя E 110 – 0.15 ммоль/л и 0.22 ммоль/л, а для красителя E 122 – 0.09 ммоль/л и 0.13 ммоль/л при визуальном и фотометрическом детектировании соответственно. Разработанные электрофоретические методики разделения и визуального или фотометрического определения E 110 и E 122 в геле могут быть рекомендованы для контроля качества продуктов питания.

Литература

1. Бёккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Бёккер. – М.: Техносфера, 2009. – 473с.
2. Галь Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеша, Л. Верецкеи. – М.: Мир, 1982. – 448 с.
3. Поляничко А.М. Электрофорез в агарозном геле / А.М. Поляничко. – СПб.: С. – Петербургский государственный университет, 2007. – 42 с.
4. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
5. Magdeldin S. Gel Electrophoresis – Principles and Basics / S. Magdeldin. – Croatia: InTech, 2012. – 346 p.
6. Селифонова Е.И., Косырева И.В., Чернова Р.К. Цветометрическое определение лизина после его электрофоретического отделения от смеси α -аминокислот // Известия Саратовского университета. – 2011. – Т. 11, вып. 1. – С. 33 – 38.
7. Фомин А.Н., Смирнова А.В., Семенов М.Б., Крючков В.Б., Мерзлякова Ю.А. Изучение условий скринингового обнаружения ряда азотсодержащих соединений основного характера методом электрофореза на бумаге // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. – 2011. – № 11. – С. 32 – 39.

8. Deshmakh A.R., Donker J.D., Addis P.B., Jenness R. Cellulose acetate and polyacrylamide gel electrophoresis for quantification of milk protein fractions // *J. Dairy Science*. – 1989. – Vol. 72, № 1. – P. 12 – 17.
9. Zlotnick J.A., Smith F.P. Chromatographic and electrophoretic approaches in ink analysis // *J. Chromatogr. A*. – 1999. – № 733. – P. 265-272.
10. Пацовский А.П., Рудометова Н.В., Каменцев Я.С. Электрофоретическое определение синтетических красителей в алкогольных напитках // *Журн. аналит. хим.* – 2004. – Т. 59, № 2. – С. 170 - 175.
11. Giot J.-F. Agarose gel electrophoresis – applications in clinical chemistry // *JMB*. – 2010. – № 29. – P. 9-14.
12. Smith H.R., Anderson E.S. Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of plasmid DNA in drug-resistant enterobacteria // *J. General Microbiol.* – 1979. – № 114. – P. 15-25.
13. Gianazza E., Arnaud Ph. Applications of gel electrophoresis in the determination of protein-low Mr substances and protein-protein interactions // *Anal. Chim. Acta*. – 1998. – № 372. – P. 67-89.
14. Tulp A., Verwoerd D., Neefjes J. Electromigration for separations of protein complexes // *J. Chromatogr. A*. – 1999. – № 722. – P. 141-151.
15. Syrový I., Hodný Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. – 1991. – № 569. – P. 175-196.
16. Jones A.J.S. Analysis of polypeptides and proteins // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1993. – № 10. – P. 29-90.
17. Сергеева Н.А. Электрофорез в современном диагностическом процессе // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 1999. – № 2. – С. 25-32.
18. Стручкова И.В. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле / И.В. Стручкова, Е.А. Кальясова. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 60 с.
19. Крусь Г.Н. Методы исследования молока и молочных продуктов / Г.Н. Крусь, А.М. Шалыгина, З.В. Волокитина. – М.: Колос, 2000. – 368 с.
20. Смирнов Е.В. Пищевые красители. Справочник / Е.В. Смирнов. – СПб.: Профессия, 2009. – 352 с.
21. Хальзова С.А., Зяблов А.Н., Селеменев В.Ф. Определение синтетических красителей методом ТСХ // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2014. – Т. 14, вып. 3. – С. 544-547.
22. Коренман Я.И., Суханов П.Т., Губин А.С. Экстракционно-хроматографическое определение пищевых красителей и их полупродуктов в пищевых объектах // *Аналитика и контроль*. – 2004. – Т. 8, № 4. – С. 355-360.
23. Шуляковская О.В. Методика определения синтетических красителей в кондитерских и хлебобулочных изделиях, молочных продуктах, соках, биологически активных и пищевых добавках с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии / Шуляковская О.В., Бельшева Л.Л., Резникова Л.Г. – Минск: Республиканский научно-практический центр гигиены, 2007. – 11 с.
24. Чмиленко Ф.О., Мінаєва Н.П., Сандомирський О.В., Сидорова Л.П. Ідентифікація барвників в напоях методом вискоєфективної рідинної хроматографії // *Харчова промисловість*. – 2008. – №7. – С. 17-19.
25. Mahmure Üstun Özgür, İkbar Koyuncu. The simultaneous determination of quinoline yellow (E-104) and sunset yellow (E-110) in syrups and tablets by second derivative spectrophotometry // *Turk J Chem*. – 2002. – Vol. 26. – P. 501-508.
26. www.lumex.ru
27. Решетняк Е.А. Хроматографические и тестовые методы анализа: учебное пособие: в 2 ч. Ч. 1. Тестовые методы анализа / Е.А. Решетняк, Н.А. Никитина. – Х.: ХНУ имени В.Н. Каразина, 2011. – 88 с.
28. Метрологические характеристики методик обнаружения с бинарным откликом: монография / [Холин Ю.В., Никитина Н.А., Пантелеймонов А.В., Решетняк Е.А., Бугаевский А.А., Логинова Л.П.]. – Х.: Тимченко, 2008. – 128 с.
29. Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Холин Ю.В., Светлова Н.В., Островская В.М. О достоверной оценке метрологических характеристик тестового анализа // *Вестник Харьков. нац. ун-та*. – 2003. – № 596, вып. 10(33). – С. 90-98.

30. Решетняк Е.А. Подходы к построению цветовых шкал. Представление результатов визуального тестирования // Аналитика России: III Всероссийская конференция, 27 сентября – 3 октября 2009.: тезисы докл. – Краснодар, 2009. – С. 75.
31. Пантелеймонов А.В., Никитина Н.А., Решетняк Е.А., Логинова Л.П., Бугаевский А.А., Холин Ю.В. Методики качественного анализа с бинарным откликом: метрологические характеристики и вычислительные аспекты // Методы и объекты химического анализа. – 2008. – Т. 3, № 2. – С. 128 – 146.
32. Loginova Lidia P., Konovalova Olga Yu. Test-films for test-determinations on the base of reagents, immobilized in gelatinous gel // Talanta. – 2008. – Vol. 77, № 2. – P. 915 – 923.
33. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. – М.: Химия, 1971. – 456 с.
34. Буланкіна Н.І. Фізико-хімічні методи в біології: Методичні вказівки до лабораторних робіт / Буланкіна Н.І., Охріменко С.М., Пономаренко О.М. – Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2011. – 39 с.
35. Currie L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities // Pure and Appl. Chem. –1995. –Vol. 67, № 10. –P. 1699 – 1723.
36. Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Логинова Л.П., Островская В.М. Предел обнаружения в тест-методах анализа с визуальной индикацией. Влияющие факторы // Журн. аналит. хим. – 2005. – Т. 60, № 10. – С. 1102 – 1109.
37. Большев Л.Н. Таблицы математической статистики / Л.Н. Большев, Н.В. Смирнов. – М.: Наука, 1983. – 136 с.
38. Кравченко М.С. Унифицированные методы исследования качества вод. Тестовые методы анализа вод / М.С. Кравченко, В.Ф. Осыка. – М.: Постоянная комиссия СЭВ по сотрудничеству в области охраны окружающей среды, 1990. – 120 с.
39. Малютина Т.М. Аналитический контроль в металлургии цветных и редких металлов / Т.М. Малютина, О.В. Конькова. – М.: Металлургия, 1988. – 240 с.
40. Красители органические. Метод спектрофотометрического испытания: ГОСТ 6965 - 75. –[Введен 1975-11-10]. – М.: Издательство стандартов, 1975. – 5 с. – (Государственный стандарт Союза ССР).

References

1. Böcker J. Chromatographic. Instrumentelle analytik mit chromatographic und kapillarelektrophorese / J. Böcker. - Wurzburg: Vogel Industrie Medien GmbH & CoKG, 1997. – 472 p.
2. Gaal Ö. Electrophoresis in the separation of biological macromolecules / Ö. Gaal, G.A. Medgyesi, L. Vereczkey. – Chichester – New York – Brisbane – Toronto: A Wiley – Interscience Publication, John Wiley&Sons, 1980. – 420 p.
3. Polyanichko A.M. E`lektroforez v agaroznom gele / A.M. Polyanichko. - SPb.: S. - Peterburgskiy gosudarstvenny'y universitet, 2007. - 42 s. [in Russian].
4. Osterman L.A. Metody' issledovaniya belkov i nukleinov'y'h kislot. E`lektroforez i ul'tracentrifugirovanie / L.A. Osterman.- M.: Nauka, 1981. - 288 s. [in Russian].
5. Magdeldin S. Gel Electrophoresis - Principles and Basics / S. Magdeldin. - Croatia: InTech, 2012. -346 r.
6. Selifonova E.I., Kosyreva I.V., Chernova R.K. // Izvestiya Saratovskogo universiteta. - 2011. - T. 11, vy'p. 1. - S. 33 - 38. [in Russian].
7. Fomin A.N., Smirnova A.V., Semenov M.B., Kryuchkov V.B., Merzlyakova Yu.A. // Voprosy' biol., med. i farm. himii. - 2011. - № 11. - S. 32 - 39. [in Russian].
8. Deshmakh A.R., Donker J.D., Addis P.B., Jenness R. Cellulose acetate and polyacrylamide gel electrophoresis for quantification of milk protein fractions // J. Dairy Science. - 1989. - Vol. 72, № 1. - P. 12 - 17.
9. Zlotnick J.A., Smith F.P. Chromatographic and electrophoretic approaches in ink analysis // J. Chromatogr. A. - 1999. - № 733. - P. 265-272.
10. Patsovskii A.P., Rudometova N.V., Kamentsev Ya.S. Electrophoretic determination of synthetic dyes in alcoholic beverages // J. Anal. Chem. - 2004. - Vol. 59, № 2. - P. 150 - 154.
11. GiotJ.-F. Agarose gel electrophoresis - applications in clinical chemistry // JMB. - 2010. - № 29. - P. 9-14.

12. Smith H.R., Anderson E.S. Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of plasmid DNA in drug-resistant enterobacteria // *J. General Microbiol.* - 1979. - № 114. - P. 15-25.
13. Gianazza E., Arnaud Ph. Applications of gel electrophoresis in the determination of protein-low Mr substances and protein-protein interactions // *Anal. Chim. Acta.* - 1998. - № 372. - P. 67-89.
14. Tulp A., Verwoerd D., Neefjes J. Electromigration for separations of protein complexes // *J. Chromatogr. A.* - 1999. - № 722. - P. 141-151.
15. Syrový I., Hodný Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* - 1991. - № 569. - P. 175-196.
16. Jones A.J.S. Analysis of polypeptides and proteins // *Advanced Drug Delivery Reviews.* - 1993. - № 10. - P. 29-90.
17. Sergeeva N.A. // *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* - 1999. - № 2. - S. 25-32. [in Russian].
18. Struchkova I.V. Teoreticheskie i prakticheskie osnovy' provedeniya e'lektroforeza belkov v poliakrilamidnom gele / I.V. Struchkova, E.A. Kalyasova. - Nizhny Novgorod: Nijegorodskiy gosuniversitet, 2012. - 60 s. [in Russian].
19. Krus G.N. Metody' issledovaniya moloka i molochny'h produktov / G.N. Krus, A.M. Shalygina, Z.V. Volokitina. - M.: Kolos, 2000. - 368 s. [in Russian].
20. Smirnov E.V. Pisch'evy'e krasiteli. Spravochnik / E.V. Smirnov. - SPb.: Professiya, 2009. - 352 s. [in Russian].
21. Halzova S.A., Zyablov A.N., Selemenev V.F. // *Sorbcionny'e i hromatograficheskie processy'.* - 2014. - T. 14, issue 3. - S. 544-547. [in Russian].
22. Korenman Ya.I., Suhanov P.T., Gubin A.S. // *Analitika i kontrol'.* - 2004. - T. 8, № 4. - S. 355-360. [in Russian].
23. Shulyakovskaya O.V. Metodika opredeleniya sinteticheskikh krasiteley v konditerskikh i hlebo-bulochny'h izdeliyah, molochny'h produktah, sokah, biologicheskii aktivny'h i pisch'evy'h do-bavkah s pomosh'yu vy'sokoe'ffektivnoy jidkostnoy hromatografii / Shulyakovskaya O.V., Belysheva L.L., Reznikova L.G. - Minsk: Respublikanskiy nauchno-prakticheskiy centr gigeny', 2007. - 11 s. [in Russian].
24. Chmilenko F.O., Minaeva N.P., Sandomirskiy O.V., Sidorova L.P. // *Harchova promislovi'st'.* - 2008. - № 7. - S. 17-19. [in Ukrainian].
25. Mahmure Üstün Özgür, İkbar Koyuncu. The simultaneous determination of quinoline yellow (E-104) and sunset yellow (E-110) in syrups and tablets by second derivative spectrophotometry // *Turk J Chem.* - 2002. - Vol. 26. - P. 501-508.
26. www.lumex.ru
27. Reshetnyak E.A. Hromatograficheskie i testovy'e metody' analiza: uchebnoe posobie: v 2 ch. CH. 1. Testovy'e metody' analiza / E.A. Reshetnyak, N.A. Nikitina. - H.: HNU imeni V.N. Karazina, 2011. - 88 s. [in Russian].
28. Metrologicheskie harakteristiki metodik obnaruzheniya s binarnym otklikom: monografiya / [Holin YU.V., Nikitina N.A., Panteleymonov A.V., Reshetnyak E.A., Bugaevskiy A.A., Loginova L.P.]. - H.: Timchenko, 2008. - 128 s. [in Russian].
29. Reshetnyak E.A., Nikitina N.A., Kholin Yu.V., Svetlova N.V., Ostrovskaya V.M. // *Visn. Hark. nac. univ.,* 2003, № 596, Ser. Him., issue 10(33), P. 90-98. [ISSN 0453 – 8048 (print), ISSN 2220 – 6396 (online), <http://chembull.univer.kharkov.ua/archiv/2003/17.pdf>] [in Russian].
30. Reshetnyak E.A. Podhody' k postroeniyu cvetovy'h shkal. Predstavlenie rezul'tatov vizual'nogo testirovaniya // *Analitika Rossii: III Vserossiyskaya konferenciya, 27 sentyabrya - 3 oktyabrya 2009.: tezisy' dokl.* - Krasnodar, 2009. - S. 75. [in Russian].
31. Panteleymonov A.V., Nikitina N.A., Reshetnyak E.A., Loginova L.P., Bugaevskiy A.A., Kholin Yu.V. // *Metody' i ob'ekty' himicheskogo analiza.* - 2008. - T. 3, № 2. - S. 128 - 146. [in Russian].
32. Loginova Lidia P., Konovalova Olga Yu. Test-films for test-determinations on the base of reagents, immobilized in gelatinous gel // *Talanta.* - 2008. - Vol. 77, № 2. - P. 915 - 923.
33. Lur'e Yu.Yu. Spravochnik po analiticheskoy himii / Yu.Yu. Lur'e. - M.: Himiya, 1971. - 456 s. [in Russian].

34. Bulankina N.I. Fi'ziko-hi'mi'chni' metodi v bi'ologii'i': Metodichni' vkazi'vki do laboratornih rob'i't / Bulankina N.I., Ohrimenko S.M., Ponomarenko O.M. - H.: HNU imeni V.N. Karazi'na, 2011. - 39 s. [in Russian].
35. Currie L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities // Pure and Appl. Chem. -1995. -Vol. 67, № 10. -P. 1699 - 1723.
36. Reshetnyak E.A., Nikitina N.A., Loginova L.P., Ostrovskaya V.M. Limit of detection in test methods of analysis with visual indication: affecting factors // J. Anal. Chem. - 2005. - Vol. 60, № 10. - P. 982 - 989. [in Russian].
37. Bolshev L.N. Tablicy' matematicheskoy statistiki / L.N. Bolshev, N.V. Smirnov. - M.: Nauka, 1983. - 136 s. [in Russian].
38. Kravchenko M.S. Unificirovanny'e metody' issledovaniya kachestva vod. Testovy'e metody' analiza vod / M.S. Kravchenko, V.F. Osyka. - M.: Postoyannaya komissiya SE'V po sotrudnichestvu v oblasti ohrany' okrujayusch'ey sredy', 1990. - 120 s. [in Russian].
39. Malyutina T.M. Analiticheskiy kontrol' v metallurgii cvetny'h i redkih metallov / T.M. Malyutina, O.V. Konkova. - M.: Metallurgiya, 1988. - 240 s. [in Russian].
40. Krasiteli organicheskie. Metod spektrofotometricheskogo ispy'taniya: GOST 6965 - 75. - [Vveden 1975-11-10]. - M.: Izdatel'stvo standartov, 1975. - 5 s. - (Gosudarstvenny'y standart Soyuz SSR). [in Russian].

Поступила в редакцию 11 июня 2014 г.

О. Ю. Коновалова, В. В. Тимченко, Н. О. Нікітіна. Розділення та визначення харчових барвників E 110 та E 122 за методом гель-електрофорезу.

Показана можливість електрофоретичного розділення харчових барвників у агарозном та поліакриламідному гелях. Оптимізовано умови проведення гель-електрофорезу та визначення барвників E 110 та E 122. Показано можливість використання прийомів напівкількісного аналізу та апарату оцінювання метрологічних характеристик методик, що застосовують у візуально-тестовому аналізі, для обробки результатів гель-електрофорезу. Розроблені методики електрофоретичного розділення та фотометричного / візуального визначення барвників випробувано в аналізі харчових продуктів.

Ключові слова: гель-електрофорез, агароза, поліакриламід, E 110, E 122, метрологія.

O. Yu. Konovalova, V. V. Timchenko, N. A. Nikitina. Separation and determination of food dyes E 110 and E 122 by gel electrophoresis.

The possibility of using of agarose and polyacrylamide gel electrophoresis for separation of food dyes was shown. The conditions of gel electrophoresis and determination of dyes E 110 and E 122 were optimized. The possibility of using semi-quantitative analysis methods and apparatus of estimating the metrological characteristics of the techniques used in the visual-test analysis, to process the results of gel electrophoresis was shown. The methods developed for electrophoretic separation and photometric / visual determination of dyes were tested in the analysis of food products.

Key words: gel electrophoresis, agarose, polyacrylamide, E 110, E 122, metrology.

Kharkov University Bulletin. 2014. № 1123. Chemical Series. Issue 23 (46).