

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра,
Главный государственный
санитарный врач

_____ М.И. Римжа
5 января 2007 г.
Регистрационный № 108-1006

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ
В КОНДИТЕРСКИХ И ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЯХ,
МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ, СОКАХ, БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ И ПИЩЕВЫХ ДОБАВКАХ С ПОМОЩЬЮ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканский научно-практический
центр гигиены

АВТОРЫ: канд. хим. наук О.В. Шуляковская, Л.Л. Бельшева,
Л.Г. Резникова

Минск 2007

Настоящая инструкция устанавливает методику идентификации и выполнения измерений массовых концентраций (далее — концентрации) синтетических красителей, разрешенных для использования в пищевых продуктах — индигокармина, желтого «Солнечный закат», тартразина, понсо 4R, азорубина в кондитерских и хлебобулочных изделиях, молочных продуктах, соках, биологически активных и пищевых добавках с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием диодно-матричного детектора.

Настоящая инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, для научно-исследовательских учреждений и других заинтересованных организаций.

Краткая характеристика исследуемых веществ

Индигокармин или E132 $C_{16}H_8N_2O_2(SO_3Na)_2$. Молекулярная масса — 466,37. Синие кристаллы с металлическим блеском. Растворимость в воде: 1,5 г на 100 г воды при 25 °С. Стабилен при pH = 3–7.

Желтый «Солнечный закат» или E110 $C_{16}H_{10}N_2O(SO_3Na)_2$. Молекулярная масса — 452,1. Оранжево-красный порошок или гранулят. Растворимость в воде: 12 г на 100 г воды при 25 °С. Стабилен при pH = 3–8.

Тартразин или E102 $C_{16}H_{13}N_4O_3Na(SO_3Na)_2$. Молекулярная масса — 538,11. Желтый порошок или гранулят. Растворимость в воде: 14 г на 100 г воды при 25 °С. Стабилен при pH = 3–8.

Понсо 4R или E124 $C_{20}H_{11}N_2O(SO_3Na)_3$. Молекулярная масса — 604,18. Красный порошок или гранулят. Растворимость в воде: 14 г на 100 г воды при 25 °С. Стабилен при pH = 3–8.

Азорубин E122 — динатрий 4-гидрокси-3-(4-сульфонато-1-нафтилазо)-1-нафталинсульфонат. Эмпирическая формула $C_{20}H_{12}N_2O_7S_2Na_2$. Молекулярная масса — 502,43. Темно-красный порошок или гранулы; в воде образует красный раствор. Светостойкость, термостойкость (до 150 °С) и кислотостойкость азорубина хорошие (в т.ч. по отношению к фруктовым кислотам). Устойчивость к щелочам умеренная. Цвет азорубина зависит от качества воды и колеблется между голубовато-красным и желтовато-красным.

В соответствии с «Гигиеническими требованиями к качеству и безопасности пищевых добавок и их применению» (Санитарные правила и нормы 13-10 РБ 2002, утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 28.11.02 г. № 94), максимально допустимый уровень (далее — МДУ) красителей в кондитерских и хлебобулочных изделиях — 200 мг/кг, джемах, желе, мармеладах — 100 мг/кг; в молочных продуктах: мороженое — 150 мг/кг, плавленый сыр — 100 мг/кг, молочные десерты — 150 мг/кг; добавки к пище — 100 мг/кг.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим или диодно-матричным детектором, обеспечивающий выполнение измерений в диапазоне 200–550 нм.

Кран-дозатор с петлей на 0,02 см.

Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г (ГОСТ 24104-2001).

Колбы мерные 2-100-2

2-1000-2 (ГОСТ 1770-74Е).

Колба круглодонная К-1-2000-29/32 (ГОСТ 25336-82).

Стакан химический 1-250 (ГОСТ 1770-74).

Пипетки градуированные 1-2-2-1

1-2-2-10 (ГОСТ 29227-91).

Цилиндры мерные 2-50

2-100 (ГОСТ 1770-74Е).

Колонка хроматографическая размером 125×4 мм Hypersil BDS (C₁₈).

Плитка электрическая (ГОСТ 14919-83Е).

Фильтр «синяя лента» 12,5 мм (ГОСТ 12026-76).

Барометр (ТУ 2504-1797-75).

Вода дистиллированная, х.ч. (ГОСТ 6709-72).

Перманганат калия KMnO₄, х.ч. (ГОСТ 20490-75).

Ацетонитрил для ВЭЖХ.

Дигидрофосфат натрия NaH₂PO₄, х.ч.

Гексадецил-3-метиламмония бромид C₁₉H₄₂NBr₂, х.ч.

Набор красителей:

- индигокармин с содержанием основного вещества не менее 95,0%;
- желтый «Солнечный закат» с содержанием основного вещества не менее 90%;
- тартразин с содержанием основного вещества не менее 94,6%;
- понсо 4R с содержанием основного вещества не менее 75%;
- азорубин, х.ч. с содержанием основного вещества не менее 50%.

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства, по точности не уступающие рекомендуемым, а также реактивы не ниже указанной чистоты.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Методика основана на анализе красителей после экстракции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием обращенно-фазовой колонки Hypersil BDS (C₁₈) размером 125×4 мм и диодно-матричного детектора при длинах волн 350 нм (определение индигокармина), 450 нм (определение тартразина), 500 нм (определение желтого «Солнечный закат», понсо 4R, азорубина). В качестве подвижной фазы используется буферный раствор ион-парного реагента. Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение — методом абсолютной калибровки.

Интервал определяемых концентраций 10–200 мг/дм³. Линейный диапазон градуировочных графиков 1,0–10,0 мкг/см³.

Нижний предел измерения составляет 0,02 мкг каждого красителя в анализируемом объеме пробы (0,02 см³).

Метрологические значения методики характеризуются в соответствии с приложением 1.

Требования безопасности

Анализ по данной методике должен выполняться согласно инструкциям «Основные правила безопасности работы в химических лабораториях» (М., 1979), «Общие правила пожарной безопасности Республики Беларусь для общественных зданий и сооружений» (ППБ 1.04-2002), а также по эксплуатации жидкостного хроматографа.

Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, изучившие настоящую методику и прошедшие подготовку для работы в качестве оператора жидкостного хроматографа.

Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха при приготовлении растворов, в т.ч. градуировочных 20 ± 2 °С;
- температура воздуха при выполнении измерений 20 ± 5 °С;
- атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха не более 80% при температуре 25 °С;
- напряжение питающей сети 220 ± 22 В;
- частота переменного тока 50 ± 1 Гц.

Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление буферного и градуировочных растворов, построение градуировочного графика, отбор и подготовка проб к анализу.

Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для блока насосов и детектора. Проводят стабилизацию работы хроматографа на рабочих режимах в течение 30–40 мин.

Приготовление растворов и реактивов

Получение бидистиллированной воды

Собирают установку для дистилляции воды, состоящую из круглодонной колбы (объем — 2 дм³), прямого холодильника и приемной колбы. В круглодонную колбу наливают 1,5 дм³ дистиллированной воды, добавляют 10 г КМnO₄ и центры кипения. Нагревание воды проводят на

электрической плитке с закрытой спиралью. Полученную бидистиллированную воду хранят не более 1 мес.

Приготовление буферного раствора А

Взвешивают $1,3 \pm 0,001$ г дигидрофосфата натрия и $1,0 \pm 0,001$ г гексадецил-3-метиламмонийбромида, растворяют в $200\text{--}300$ см³ бидистиллированной воды в мерной колбе на 1000 см³, доводят объем бидистиллированной водой до метки, перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в плотно закрытой стеклянной таре. Годен в течение 1 мес.

Приготовление стандартных растворов смеси пяти красителей

Приготовление основного стандартного раствора смеси пяти красителей массовой концентрацией 100 мкг/см³

Навеска красителя для приготовления основного стандартного раствора рассчитывается с учетом содержания основного действующего вещества согласно сертификату фирмы таким образом, чтобы конечное содержание каждого красителя в смеси основного стандартного раствора составляло 100 мкг/см³. Например:

индигокармин — содержание основного действующего вещества 95% , следовательно, масса навески $0,105 \pm 0,001$ г;

желтый «Солнечный закат» — содержание основного действующего вещества 90% , следовательно, масса навески $0,110 \pm 0,001$ г;

тартразин — содержание основного действующего вещества $94,6\%$, следовательно, масса навески $0,106 \pm 0,001$ г;

понсо 4R — содержание основного действующего вещества $75,0\%$, следовательно, масса навески $0,130 \pm 0,001$ г;

азорубин — содержание основного действующего вещества не менее 50% , взвешивают $0,2 \pm 0,001$ г красителя.

Навески красителей помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, добавляют $200\text{--}300$ см³ бидистиллированной воды, перемешивают и после растворения доводят объем бидистиллированной водой до метки и перемешивают. Годен в течение 7 сут.

Приготовление рабочего стандартного раствора смеси пяти красителей массовой концентрацией 10 мкг/см³

10 см³ основного раствора переносят в мерную колбу на 100 см³ и доводят бидистиллированной водой до метки.

Приготовление градуировочных растворов смеси пяти синтетических красителей

Градуировочные растворы смеси пяти синтетических красителей готовят по схеме, представленной в таблице 1.

Аликвотные части рабочего стандартного раствора пяти синтетических красителей массовой концентрацией 10 мкг/см³ переносят в мерные колбы объемом 100 см³ и доводят до метки бидистиллированной водой.

Каждый градуировочный раствор готовится и хроматографируется не менее трех раз с интервалом 1 день.

Таблица 1

Схема приготовления градуировочных растворов

№ градуировочного раствора	Концентрация каждого синтетического красителя в градуировочном растворе, мкг/см ³	Аликвотная часть рабочего стандартного раствора смеси пяти синтетических красителей, см ³
1	1,0	10
2	2,0	20
3	5,0	50
4	10,0	—

Установление градуировочной характеристики

Каждый градуировочный раствор хроматографируют по два раза, начиная с самой низкой концентрации, принимая за результат измерения среднее арифметическое двух параллельных измерений. Условия хроматографирования при анализе синтетических красителей:

- объем вводимой пробы 0,02 см³;
- состав подвижной фазы: А — буферный раствор; В — ацетонитрил;
- скорость потока элюента 0,7 мл/мин.

Условия градиентного элюирования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Условия градиентного элюирования

Время анализа, мин	Состав подвижной фазы, %	
	А — буферный раствор	В — ацетонитрил
0	85	15
1	85	15
12	30	70
15	10	90
22	85	15

Время выхода красителей устанавливают при проведении градуировочных работ. Для этого наилучшей концентрацией является 5,0 мкг/см³.

Хроматограмма, на которой виден порядок выхода красителей, приводится в приложении 2.

В таблице 3 указано относительное время выхода красителей.

Таблица 3

Относительное время выхода красителей

Наименование красителя	Длина волны поглощения, нм	Время выхода, мин
Индигокармин	350	13,5 ± 0,15
Желтый «Солнечный закат»	500	13,8 ± 0,15
Азорубин	500	14,6 ± 0,15
Тартразин	450	15,0 ± 0,15
Понсо 4R	500	15,6 ± 0,15

Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика измеряют площади пиков, соответствующие концентрациям красителей в градуировочных растворах. По полученным данным рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = aX + b$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения:

$$Y = aX + b, \quad (1)$$

где Y — площадь пика синтетических красителей;

X — концентрация синтетических красителей в градуировочном растворе;

a и b — коэффициенты регрессии.

Возможен компьютерный вариант построения калибровочных графиков.

Контроль градуировочного графика осуществляется каждый раз перед началом измерений не менее чем по двум точкам в рабочем диапазоне измерений. Для контроля применяются градуировочные растворы красителей. Полученные при хроматографировании значения Y не должны отклоняться от градуировочной прямой более чем на 5,34% для индигокармина; 2,96% для желтого «Солнечный закат»; 1,86% для тартразина; 2,97% для понсо 4R; 1,44% для азорубина.

В противном случае необходимо построение нового градуировочного графика не менее чем по 5 точкам.

Отбор проб

Отбирают не менее 1 кг каждого наименования исследуемого продукта в соответствии с требованиями СТБ 1036-97 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности».

Кондитерские и хлебобулочные изделия (сухари, мармелад, зефир и т.п.)

Отбирают среднюю пробу массой 1,0–10,0 г, помещают в коническую колбу объемом 250 см³, добавляют 60–80 см³ дистиллированной воды. Колбу устанавливают на перемешивающее устройство для экстракции в течение 60 мин, затем содержимое количественно переносят в колбу на 200 см³, доводят водой до метки и оставляют на 20–24 ч для более полного извлечения красителей. Раствор перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента». Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см³.

Крем кондитерский и др. продукты с содержанием жира более 40%

Отбирают среднюю пробу массой 2,0–10,0 г, помещают в химический стакан объемом 50 см³, затем растворяют в 20 см³ гексана и количественно переносят в делительную воронку. Добавляют 200 см³ дистиллированной воды и встряхивают в течение 1–2 мин. После разделения слоев водный слой пропускают через бумажный фильтр «синяя лента». Органический слой отбрасывают. Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см³.

Молоко и молочные продукты

Отбирают среднюю пробу массой 8,0–10,0 г, помещают в центрифужные пробирки вместимостью 25 см³, добавляют ацетонитрил до отметки 25 см³. Пробирки закрывают пробками, интенсивно встряхивают в течение 1–2 мин, затем помещают в лабораторную центрифугу для центрифугирования. Условия центрифугирования: скорость — 5–5,5 тыс. об/мин; время — 20 мин. Затем отбирают верхний слой, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см³.

Соки

Средняя проба анализируемого образца объемом 200–300 см³ термостатируется при температуре 20 ± 2 °С в течение 30 мин и тщательно перемешивается. Отбирается 10 см³ образца, вносится в мерную колбу объемом 100 см³ и доводится водой до метки. Раствор перемешивают и пропускают через бумажный фильтр «синяя лента». Полученный фильтрат повторно очищают через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см³.

Биологически активные и пищевые добавки

Отбирают среднюю пробу массой 0,5–2,0 г, помещают в химический стакан вместимостью 50 см³, добавляют 25–30 см³ дистиллированной воды и перемешивают содержимое до полного перехода окраски в экстрагирующий раствор. Затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³, перемешивают и пропускают через бумажный фильтр «синяя лента». Полученный фильтрат повторно очищают через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см³.

Анализ полученных образцов проводится на жидкостном хроматографе. Условия хроматографирования такие же, как и при построении градуировочного графика. Определяют площади пиков, используя компьютерную систему обработки сигналов. Проводят анализ двух параллельных проб. Каждую пробу хроматографируют не менее двух раз.

Обработка результатов измерений

Количество (X , мг/дм³) каждого красителя в исследуемой пробе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V_2 C}{V_1}, \quad (2)$$

где V_1 — объем пробы, взятый для анализа, см³;

V_2 — объем пробы после разбавления, см³;

C — концентрация красителя, рассчитанная по градуировочному графику, мкг/см³.

Коэффициент перевода мкг/см³ в мг/дм³ равен 1.

За результат анализа принимают среднее арифметическое из концентраций каждого красителя, найденное в двух параллельных пробах.

Вычисление проводят до второго знака с последующим округлением до первого знака после запятой.

Допустимое расхождение между параллельными измерениями не должно превышать для красителя:

Индигокармин — 1,94%;

желтый «солнечный закат» — 1,97%;

тартазин — 2,0%;

понсо 4R — 2,1%;

азорубин — 2,2%.

Гарантированный результат анализа X представляют в следующем виде:

$$X_i = X_{\text{cp}} \pm \Delta MBI \quad (3)$$

$$X_{\text{cp}} = \frac{X_1 + X_2}{2} \quad (4)$$

где: ΔMBI — показатель точности (пределы, в которых находится погрешность методики);

X_1 — значение в первом параллельном опыте;

X_2 — значение во втором параллельном опыте;

X_{cp} — среднее значение, найденное по результатам двух параллельных опытов.

Приложение 1

Таблица 1

Относительные значения показателей точности, правильности, повторяемости и воспроизводимости при доверительной вероятности $p = 0,95$

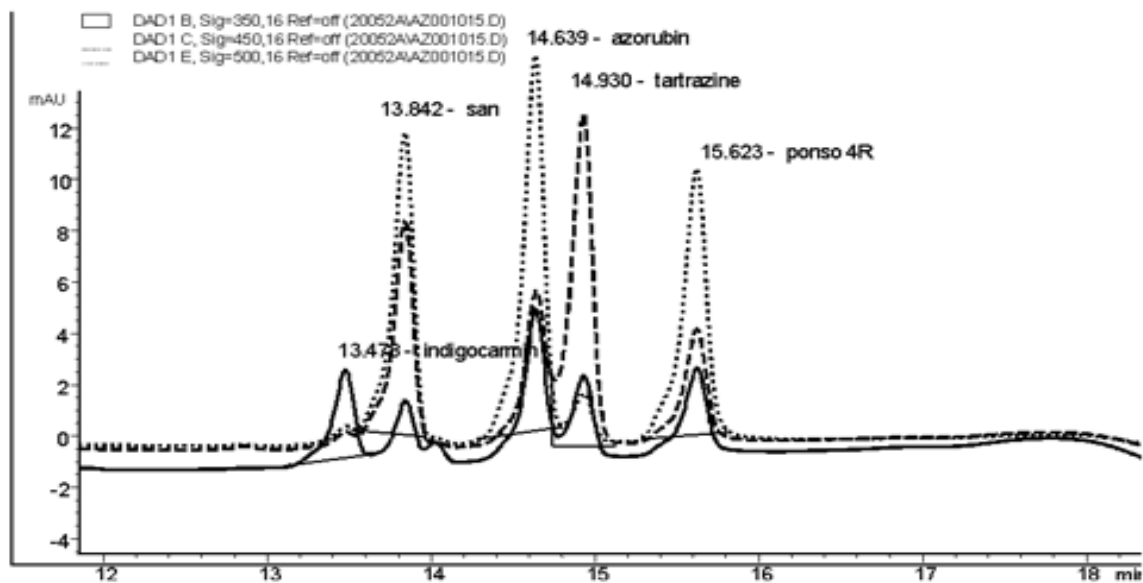
Наименование красителя	Диапазон измерений, мг/дм ³	Показатель повторяемости (СКО повторяемости), δ_r , %	Показатель воспроизводимости (СКО воспроизводимости), δ_R , %	Показатель правильности (границы, в которых находится неисключенная систематическая погрешность), $\pm\Delta_c$, %	Показатель точности и (границы, в которых находится погрешность методики), $\pm\Delta$, %
Индигокармин	10–200	2,0	6,1	8,7	12,1
Желтый «Солнечный закат»	10–200	2,0	5,6	11,9	14,3
Тартразин	10–200	2,0	6,5	7,05	11,4
Понсо 4R	10–200	2,1	6,2	11,9	14,5
Азорубин	10–200	2,2	5,04	11,4	13,4

Таблица 2

Значения точностных параметров

Параметры точности	Индигокармин E132	«Солнечный закат» E110	Тартразин E102	Понсо 4R E124	Азорубин E122
Число параллельных определений, n	2	2	2	2	2
Допустимые расхождения между результатами в разных лабораториях, %	24,2	28,6	22,8	29,0	28
Погрешность градуировочного графика, %	5,34	2,96	1,86	2,97	1,4
Предел повторяемости $r_{n,m}$, %	5,4	5,5	5,5	5,8	6,1
Предел воспроизводимости $R_{n,m}$, %	17,0	15,6	18,0	17,3	14,0
Норматив точности K	17,1	20,2	16,1	20,5	18,9

Хроматограмма стандартной смеси 5 красителей 5 мкг/см³



- 1 — индигокармин 350 — нм ($13,5 \pm 0,15$ мин)
- 2 — желтый «Солнечный закат» — 500 нм ($13,8 \pm 0,15$ мин)
- 3 — азорубин — 500 нм ($14,6 \pm 0,15$ мин)
- 4 — тартразин — 450 нм ($14,9 \pm 0,15$ мин)
- 5 — понсо4R — 500 нм ($15,6 \pm 0,15$ мин)