ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53752— 2009

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Определение содержания консервантов и красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

БЗ 12—2009/1017

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВНИМИ» Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 470 «Молоко и продукты переработки молока»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 декабря 2009 г. № 1239-ст.

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии сети Интернет

© Стандартинформ, 2010

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 2
4 Сущность метода . . . 2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы . . . 2
6 Отбор проб исследуемого продукта . . . 3
7 Условия проведения измерений . . . 3
8 Определение массовой доли консервантов . . . 3
8.1 Подготовка к проведению определения . . . 3
8.2 Проведение измерений . . . 5
8.3 Обработка результатов измерений . . . 5
9 Определение массовой концентрации синтетических красителей . . . 6
9.1 Подготовка к проведению определения . . . 6
9.2 Проведение измерений . . . 7
9.3 Обработка результатов измерений . . . 7
10 Контроль точности результатов измерений . . . 8
11 Оформление результатов измерений . . . 9
12 Требования, обеспечивающие безопасность . . . 9
Библиография . . . 10

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Определение содержания консервантов и красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Milk and milk products. Determination of preservatives and synthetic colours content by high performance liquid chromatography method

Дата введения — 2011—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко, молочную продукцию и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определения массовой доли консервантов (бензойной, сорбиновой, пропионовой кислот и их солей) и массовой концентрации синтетических красителей (индигокармина, желтого «Солнечный закат», тартразина, понсо 4R, азорубина).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3117—78 Реактивы. Аммоний уксуснокислый. Технические условия

ГОСТ 3622—68 Молоко и молочные продукты. Отбор проб и подготовка их к испытанию

ГОСТ 4207—75 Реактивы. Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 5823—78 Реактивы. Цинк уксуснокислый 2-водный. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 10521—78 Реактивы. Кислота бензойная. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13928—84 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины, установленные нормативным правовым актом Российской Федерации [1], а также следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **метод высокоэффективной жидкостной хроматографии:** Разделение веществ на отдельные компоненты, основанное на использовании сорбционных процессов в динамических условиях.

4 Сущность метода

Метод основан на экстракции консервантов и синтетических красителей из анализируемой пробы, качественном и количественном их определении с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением обращеннофазовой колонки и спектрофотометрического детектора в диапазонах измерений, указанных в таблицах 4 и 5.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы

Весы по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,2 мг.

Хроматограф, включающий следующие элементы:

- колонку защитную длиной 250 мм, внутренним диаметром 4 или 4,6 мм, заполненную обращеннофазовым сорбентом с привитыми октадецильными группами диаметром частиц 5 мкм;
- колонку длиной 125 мм, внутренним диаметром 4 мм;
- насос высокого давления с верхним пределом давления не менее 25 МПс, диапазоном регулирования подачи растворителя 0,1—5,0 $см^3$/мин;
- устройство петлевое для ввода пробы рабочим объемом петли 0,010 и 0,020 $см^3$;
- детектор спектрофотометрический с переменной длиной волны, позволяющий проводить измерения оптической плотности при длине волны 235 нм, снабженный проточной кварцевой кюветой объемом не более 0,01 $см^3$;
- программное обеспечение для обработки полученных результатов измерений.

Микрошприц для ВЭЖХ вместимостью 0,025 или 0,050 $см^3$.

pH-метр или универсальный иономер диапазоном измерения от 4 до 9 pH с погрешностью измерения ± 0,05 ед. pH.

Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

Баня ультразвуковая лабораторная рабочим объемом не менее 2 $дм^3$.

Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.

Центрифуга лабораторная со скоростью вращения не менее 5000 об/мин.

Колбы мерные 1-10, 2-25, 1-50, 1-100, 1-250, 1-1000 по ГОСТ 1770.

Пипетки 1-2-1, 1-2-2 по ГОСТ 29169.

Дозаторы пипеточные переменного объема дозирования в диапазоне 0,040—1,000 см³ с относительной погрешностью дозирования ± 1 %.

Цилиндры вместимостью 1-50-2, 1-100-2 по ГОСТ 1770.

Колба К-1-1000-29/32 по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1-1000 по ГОСТ 25336.

Фильтры бумажные обеззоленные марки ФОМ по ГОСТ 12026.

Фильтры бумажные обеззоленные типа «синяя лента» по ГОСТ 12026.

Фильтры мембранные с диаметром пор не более 0,5 мкм.

Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, х.ч., с содержанием основного вещества не менее 99,98 %.

Аммоний уксуснокислый по ГОСТ 3117, ч.д.а.

Гексадецил-3-метиламмония бромид, х.ч., с содержанием основного вещества не менее 95,0 %.

Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207, х.ч, раствор массовой концентрации 150 г/дм³ (раствор Карреза I).

Калий сорбат, ч., или сорбиновая кислота с содержанием основного вещества не менее 95,0 %.

Кальций пропионат или пропионовая кислота с содержанием основного вещества не менее 95,0 %.

Кислота уксусная, ч.д.а., по ГОСТ 61.

Набор синтетических красителей, содержащий:

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

Натрий бензоат, ч., или бензойная кислота, ч.д.а., по ГОСТ 10521.

Натрий дигидрофосфат, х.ч., с содержанием основного вещества не менее 95,0 %.

Цинк уксуснокислый 2-водный по ГОСТ 5823, ч.д.а, раствор массовой концентрации 300 г/дм³ (раствор Карреза II).

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений и оборудования с метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

6 Отбор проб исследуемого продукта

Отбор проб — по ГОСТ 3622, ГОСТ 13928 и ГОСТ 26809.

7 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . (20 ± 5) °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 30 % до 80 %;

атмосферное давление . . . . . от 84 до 106 кПа.

Для проведения измерений применяют бидистиллированную воду, которую приготавливают следующим образом: дистиллированную воду фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,45 мкм), затем кипятят для удаления растворенного воздуха и охлаждают до комнатной температуры.

8 Определение массовой доли консервантов

8.1 Подготовка к проведению определения

8.1.1 Приготовление экстрагирующего раствора

Готовят водный раствор ацетата аммония массовой концентрацией 0,8 г/дм³. В мерную колбу вместимостью 1000 дм³ помещают (0,800 ± 0,001) г ацетата аммония, растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки, затем pH раствора доводят до 4,2—4,3, добавляя по каплям «ледяную» уксусную кислоту.

Полученный раствор смешивают с ацетонитрилом в соотношении 3:2 (по объему).

Срок хранения раствора в плотно укупоренной посуде — 7 сут.

8.1.2 Приготовление подвижной фазы для жидкостной хроматографии

Раствор ацетата аммония массовой концентрацией 0,8 г/дм^3, приготовленный по 8.1.1, смешивают с ацетонитрилом в соотношении 65:35. Указанное соотношение является примерным, поскольку для обеспечения оптимального разделения пиков консервантов следует подбирать оптимальный состав подвижной фазы применительно к используемой хроматографической колонке. Полученную подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр. Перед использованием подвижную фазу дегазируют в круглодонной колбе под вакуумом на ультразвуковой бане.

Срок хранения подвижной фазы в плотно укупоренной посуде — 7 сут.

8.1.3 Приготовление основных и рабочих растворов консервантов

В качестве стандартных веществ используют бензойную, сорбиновую, пропионовую кислоты или их соли.

8.1.3.1 Приготовление основных растворов

Пробы стандартных веществ по (10,0 ± 0,1) мг помещают в мерные колбы вместимостью 50 см^3. В колбы вносят около 10 см^3 ацетонитрила для растворения бензойной, сорбиновой и пропионовой кислот или такой же объем экстрагирующего раствора, приготовленного по 8.1.1, для растворения бензоата натрия, сорбата калия и пропионата калия. Содержимое колб перемешивают до полного растворения кристаллов, после чего объем содержимого в колбах доводят до метки экстрагирующим раствором. Колбы тщательно перемешивают, получают основные растворы.

Массовые концентрации бензойной, сорбиновой и пропионовой кислот в растворах, приготовленных из самих кислот, составляют 200 мг/дм^3. Массовая концентрация бензойной кислоты в растворе, приготовленном из бензоата натрия, составляет 144 мг/дм^3. Массовая концентрация сорбиновой кислоты в растворе, приготовленном из сорбата калия, составляет 150 мг/дм^3. Массовая концентрация пропионовой кислоты в растворе, приготовленном из пропионата кальция, составляет 112 мг/дм^3.

8.1.3.2 Приготовление рабочих растворов

Из основных растворов готовят не менее пяти рабочих растворов каждой кислоты в диапазоне массовых концентраций бензойной кислоты 0,2—1,5 мг/дм^3, сорбиновой кислоты 0,1—3,0 мг/дм^3 и пропионовой кислоты 0,1—2,5 мг/дм^3 путем точного разведения основных растворов экстрагирующим раствором в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Растворы дозируют с помощью пипеточного дозатора. Приготовленные рабочие растворы фильтруют через мембранный фильтр.

Срок хранения основных и рабочих растворов при температуре (4 ± 2) °С в плотно укупоренной посуде: бензойной кислоты — 6 мес., сорбиновой и пропионовой кислот — 2 мес.

8.1.4 Подготовка хроматографа к работе

8.1.4.1 Условия хроматографирования:

- длина волны детектора — 235 нм;
- чувствительность детектора — 0,08 единицы оптической плотности по шкале (ориентировочное значение);
- скорость потока подвижной фазы — 0,5 см^3/мин (ориентировочное значение);
- температура — 50 °С;
- подвижная фаза: ацетат аммония с ацетонитрилом.

Проверку оптимальности условий хроматографического разделения осуществляют путем хроматографического анализа смешанного раствора бензойной, сорбиновой и пропионовой кислот массовой концентрацией каждой кислоты не менее 1 мг/дм^3. Данный раствор готовят из основных растворов бензойной, сорбиновой и пропионовой кислот по аналогии с методикой приготовления рабочих растворов по 8.1.3.2. Для хроматографического анализа петлю инжектора полностью заполняют анализируемым раствором. Эффективность хроматографического разделения признается удовлетворительной, если коэффициент разделения пиков сорбиновой, бензойной и пропионовой кислот составляет не менее 1,3. В противном случае для достижения требуемой эффективности разделения экспериментальным путем подбирают новый состав подвижной фазы (объемную долю ацетонитрила в ней) и скорость ее потока. При невозможности достижения требуемых условий эффективности хроматографического разделения аналогичным образом проводят испытания других колонок.

Чувствительность детектора устанавливают так, чтобы высота пика сорбиновой кислоты при хроматографическом анализе рабочего раствора массовой концентрации 1 мг/дм^3 не выходила за пределы рабочей шкалы регистрирующего устройства, но находилась вблизи ее верхней границы.

Контроль эффективности хроматографического разделения проводят не реже одного раза в две недели.

8.1.4.2 Градуировка хроматографа

Проводят хроматографический анализ всех рабочих растворов, полностью заполняя петлю инжектора. Регистрируют высоту пиков бензойной, сорбиновой и пропионовой кислот.

Массовая концентрация стандартных веществ в рабочем растворе С, мг/дм^3, и высота пика каждого вещества h, мм, находятся в следующей функциональной зависимости:

$$C = Kh, \quad (1)$$

где K — градуировочный коэффициент, мг/дм^3, мм;

h — высота пика стандартного вещества, мм.

Градуировочный коэффициент K, мг/дм^3 мм, для бензойной, сорбиновой и пропионовой кислот вычисляют по результатам анализа рабочих растворов с помощью системы автоматизированной обработки данных или, при ее отсутствии в составе хроматографа, по методу наименьших квадратов, полагая свободный член в уравнении регрессии равным нулю, по формуле

$$K = \frac{\Sigma (h_i C_i)}{\Sigma h_i^2}, \quad (2)$$

где h_i — высота пика бензойной, сорбиновой или пропионовой кислоты при анализе i-го рабочего раствора, мм;

C_i — массовая концентрация бензойной, сорбиновой или пропионовой кислот в i-м рабочем растворе, мг/дм^3.

8.1.5 Подготовка проб исследуемого продукта

Подготовка проб заключается в экстракции сорбиновой, бензойной и пропионовой кислот из исследуемого продукта.

(10,0 ± 0,001) г продукта переносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3. В колбу вносят 100 см^3 экстрагирующего раствора, приготовленного по 8.1.1, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 10 мин, после чего в нее вносят по 5 см^3 растворов Карреза I и Карреза II, тщательно перемешивая после каждого внесения. Содержимое колбы доводят бидистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр. 1 см^3 фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3, объем содержимого в колбе доводят до метки подвижной фазой для ВЭЖХ. Полученный раствор используют для хроматографического анализа. Перед анализом рекомендуется профильтровать анализируемый раствор через мембранный фильтр.

8.2 Проведение измерений

8.2.1 Качественное обнаружение консервантов

Проводят хроматографический анализ рабочих растворов массовой концентрацией: бензойной и пропионовой кислот — 0,2 мг/дм^3 и сорбиновой кислоты — 0,1 мг/дм^3, полностью заполняя ими петлю инжектора. Регистрируют время удерживания и высоту пиков определяемых компонентов. Далее проводят хроматографический анализ экстракта из пробы или серии экстрактов из нескольких проб. При обнаружении на хроматограмме экстракта из пробы пиков, совпадающих по времени удерживания с пиками бензойной, сорбиновой и пропионовой кислот, регистрируют их высоту и фиксируют качественное обнаружение этих кислот.

8.2.2 Количественное определение консервантов

Значения высоты пиков бензойной, сорбиновой и пропионовой кислот на хроматограмме экстракта из пробы, полученной по 8.2.1, используют для расчета массовых долей этих кислот при условии, что они не выходят за верхнюю границу диапазона градуировки хроматографа. В противном случае увеличивают степень разведения экстракта из пробы по 8.1.5 и проводят его повторный хроматографический анализ.

8.3 Обработка результатов измерений

Массовую долю консерванта X, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{hKV_1V_3}{V_2m}, \quad (3)$$

где h — высота пика сорбиновой, бензойной или пропионовой кислот на хроматограмме экстракта из пробы, мм;

K — градуировочный коэффициент для сорбиновой, бензойной или пропионовой кислоты, мг/дм^3, мм;

V_1 — объем, в котором растворена часть экстракта из пробы перед хроматографическим анализом, см^3;

V_3 — объем, в котором растворена проба экстракта из пробы при приготовлении экстракта, см^3;

V_2 — объем части экстракта из пробы, взятый для разведения, см^3;

m — масса пробы по 8.1.5, г.

Вычисления проводят до второго десятичного знака.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, выполненных в условиях повторяемости, округленное до второго десятичного знака, если выполняется условие приемлемости по 10.3.

9 Определение массовой концентрации синтетических красителей

9.1 Подготовка к проведению определения

9.1.1 Приготовление буферного раствора

(1,300 ± 0,001) г дигидрофосфата натрия и (1,000 ± 0,001) г гексадецил-3-метиламмонийбромида, растворяют в 200—300 см^3 бидистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3, перемешивают. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре в плотно закрытой стеклянной таре — 1 мес.

9.1.2 Приготовление основного раствора смеси пяти синтетических красителей массовой концентрацией 100 мкг/см^3

Пробу синтетических красителей для приготовления основного раствора рассчитывают с учетом содержания основного действующего вещества таким образом, чтобы конечное содержание каждого красителя в смеси основного стандартного раствора составляло 100 мкг/см^3. Например, при содержании основного действующего вещества для индигокармина 95 %, желтого «Солнечный закат» — 90 %, тартразина — 94,6 %, понсо 4R — 75 % и азорубина — 50 % масса пробы красителя составит соответственно: (0,105 ± 0,001) г; (0,110 ± 0,001) г; (0,106 ± 0,001) г; (0,130 ± 0,001) г и (0,200 ± 0,001) г.

Пробы синтетических красителей помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, добавляют 200 — 300 см^3 бидистиллированной воды и перемешивают. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора — 7 сут.

9.1.3 Приготовление рабочего раствора смеси пяти красителей массовой концентрацией 10 мкг/см^3

10 см^3 основного раствора, приготовленного по 9.1.2, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют небольшое количество бидистиллированной воды и перемешивают. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки.

9.1.4 Приготовление градуировочных растворов смеси пяти синтетических красителей

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

Таблица 1

№ градуировочного раствора	Массовая концентрация каждого синтетического красителя в рабочем растворе, мкг/см^3	Часть рабочего раствора смеси пяти синтетических красителей, см^3
1	1,0	10
2	2,0	20
3	5,0	50
4	10,0	—

Части рабочего раствора смеси пяти синтетических красителей массовой концентрацией 10 мкг/см^3 переносят в мерные колбы вместимостью 100 см^3, добавляют небольшое количество бидистиллированной воды и перемешивают. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки.

9.1.5 Установление градуировочной характеристики

Каждый рабочий раствор хроматографируют по два раза, начиная с наименьшей концентрации, принимая за результат среднеарифметическое значение двух параллельных измерений.

Условия хроматографирования:

- объем вводимой пробы 0,02 см^3;
- состав подвижной фазы: А — буферный раствор, В — ацетонитрил;
- скорость потока элюента 0,7 см^3/мин.

Условия градиентного элюирования представлены в таблице 2.

Таблица 2

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 синтетических красителей устанавливают при проведении градуировочных работ. Для этого оптимальной является массовая концентрация 5,0 мкг/см^3 (таблица 1).

Время выхода синтетических красителей указано в таблице 3.

Таблица 3

Наименование красителя	Длина волны поглощения, нм	Время выхода, мин
Индигокармин	350	13,50 ± 0,15
Желтый «Солнечный закат»	500	13,80 ± 0,15
Азорубин	500	14,60 ± 0,15
Тартразин	450	15,00 ± 0,15
Понсо 4R	500	15,60 ± 0,15

9.1.6 Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика измеряют площади пиков, соответствующие массовой концентрации синтетических красителей в градуировочных растворах. По полученным данным рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = aC_1 + b$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения:

$$Y = aC_1 + b, \quad (4)$$

где Y — площадь пика синтетических красителей;

a и b — коэффициенты регрессии;

C_1 — массовая концентрация синтетических красителей в градуировочном растворе, мкг/см^3.

Контроль градуировочного графика осуществляют каждый раз перед началом измерений не менее чем по двум точкам в рабочем диапазоне измерений. Для контроля применяют градуировочные растворы синтетических 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 и 1,44 % для азорубина.

9.1.7 Подготовка проб исследуемого продукта

8,0—10,0 г исследуемого продукта взвешивают с записью результата до третьего знака после запятой, помещают в центрифужные пробирки вместимостью 25 см^3, добавляют 96 %-ный этанол до метки 25 см^3. Пробирки закрывают пробками, интенсивно встряхивают в течение 1—2 мин и центрифугируют 20 мин при 5000 об/мин. Отделяют верхний слой и фильтруют через мембранный фильтр размером пор 0,45 мкм. 0,02 см^3 подготовленной пробы вводят в хроматограф.

9.2 Проведение измерений

При анализе проб условия хроматографирования устанавливают те же, что и при построении градуировочного графика по 9.1.6. Определяют площади пиков, используя компьютерную программу. Каждую пробу хроматографируют по два раза.

9.3 Обработка результатов измерений

Массовую концентрацию синтетических красителей C_2, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$C_2 = \frac{V_5 C_3}{V_4}, \quad (5)$$

где V_5 — объем пробы после разбавления, дм³;

C_3 — массовая концентрация красителя, рассчитанная по градуировочному графику, мг/дм³;

V_4 — объем пробы, взятый для анализа, дм³.

Вычисления проводят до второго десятичного знака.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости по 10.3.

10 Контроль точности результатов измерений

10.1 Метрологические характеристики метода определения массовой доли консервантов

10.1.1 Приписанные характеристики погрешности и ее составляющих метода определения массовой доли консервантов при $P = 0,95$ приведены в таблице 4.

Таблица 4

Наименование консерванта	Диапазон измерений массовой доли консервантов, млн$^{-1}$ (мг/кг)	Предел повторяемости $r_{отн.}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн.}$, %	Границы относительной погрешности ± δ, %
Бензойная кислота	От 50 до 2000 включ.	18	32	23
Сорбиновая кислота	От 1 до 1000 включ.			
Пропионовая кислота	От 1 до 500 включ.			

10.2 Метрологические характеристики метода определения массовой концентрации синтетических красителей

10.2.1 Приписанные характеристики погрешности определения массовой концентрации красителей при $P = 0,95$ приведены в таблице 5.

Таблица 5

Наименование синтетического красителя	Диапазон измерений массовой концентрации красителя, мг/дм³	Предел повторяемости $r_{отн.}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн.}$, %	Границы относительной погрешности ± δ, %
Индигокармин	От 10 до 200 включ.	33	68	48
Желтый «Солнечный закат»		39	79	56
Тартразин		31	64	45
Понсо 4R		42	80	57
Азорубин		39	78	55

10.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений массовой доли консервантов и массовой концентрации синтетических красителей в молоке и молочной продукции, полученных в условиях повторяемости (два параллельных определения, $n = 2$), проводят с учетом требований ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

Результаты измерений считаются приемлемыми при условии:

$$|X_1 - X_2| \le r_{отн} \cdot 0,01 \cdot X_{ср},$$

где X_1, X_2 — значения двух параллельных измерений массовой доли консервантов или массовой концентрации синтетических красителей в молоке и молочной продукции, полученные в условиях повторяемости, млн$^{-1}$ или мг/дм³;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение двух параллельных измерений массовой доли консервантов или массовой концентрации синтетических красителей, млн$^{-1}$ или мг/дм^3;

$r_{отн}$ — пределы повторяемости (сходимости), значения которых приведены в таблицах 4 и 5, %.

Если данное условие не выполняется, то проводят повторные измерения и проверку приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

10.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений массовой доли консервантов и массовой концентрации красителей в молоке и молочной продукции, полученных в условиях воспроизводимости (в двух лабораториях, $m = 2$), проводят с учетом требований ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.2.1).

Результаты измерений, выполненные в условиях воспроизводимости, считают приемлемыми при условии:

$$|X_1' - X_2'| \le R_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср},$$

где X_1', X_2' — результаты измерений массовой доли консервантов или массовой концентрации синтетических красителей в молоке и молочной продукции, полученные в двух лабораториях в условиях воспроизводимости, млн$^{-1}$ или мг/дм^3;

$R_{отн}$ — пределы воспроизводимости, значения которых приведены в таблицах 4 и 5, %;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение измерений массовой доли консервантов или массовой концентрации красителей, выполненных в условиях воспроизводимости, млн$^{-1}$ или мг/дм^3.

Если данное условие не выполняется, то определение повторяют в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

11 Оформление результатов измерений

Результат измерений массовой доли консервантов и массовой концентрации красителей в молоке и молочной продукции в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$X_{ср} \pm \delta \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср}, \text{ при } P = 0{,}95,$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, млн$^{-1}$ или мг/дм^3;

δ — границы относительной погрешности измерений, % (таблицы 4 и 5).

12 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;

- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.007;

- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.009.

Библиография

[1] Федеральный закон от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

УДК 637.12.04/07:576.8:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: молоко, молочная продукция, пробы, экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, консерванты, синтетические красители, массовая доля, массовая концентрация, метрологические характеристики

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 13.10.2010. Подписано в печать 17.11.2010. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 266 экз. Зак. 930.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru