МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
31504—
2012**

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Определение содержания консервантов и красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 24 мая 2012 г. № 41)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

(Поправка).

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 ноября 2012 г. № 884-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31504—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ИЗДАНИЕ (ноябрь 2019 г.) с Поправкой (ИУС 6—2019)

7 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 53752—2009*

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

* Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 ноября 2012 г. № 884-ст ГОСТ Р 53752—2009 отменен с 1 июля 2013 г.

© Стандартинформ, оформление, 2013, 2019

В Российской Федерации 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 анализируемого продукта 3
7 Условия проведения измерений 3
8 Определение массовой доли консервантов 4
9 Определение массовой концентрации синтетических красителей 6
10 Контроль точности результатов измерений 8
11 Оформление результатов определения 9
12 Требования безопасности 10

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Определение содержания консервантов и красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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

Дата введения — 2013—07—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 межгосударственные стандарты:

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

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

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

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

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

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

ГОСТ 61 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

ГОСТ 3117 Реактивы. Аммоний уксуснокислый. Технические условия

ГОСТ 3622 Молоко и молочные продукты. Отбор проб и подготовка их к испытанию[1)]

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

ГОСТ ИСО 5725-6[2)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

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

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 10521 Реактивы. Кислота бензойная. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

[1)] В Российской Федерации действуют ГОСТ Р 55063—2012, ГОСТ Р 55361—2012.

[2)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

Издание официальное

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

ГОСТ 24104 Весы лабораторные. Общие технические требования[1)]

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

ГОСТ 26809 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу[2)]

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

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru казателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ 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 применен 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 ВЭЖХ 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 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,2 мг.

Хроматограф, включающий следующие элементы:

- колонка защитная длиной 250 мм, с размером внутреннего диаметра 4 или 4,6 мм, заполненная обращеннофазовым сорбентом с привитыми октадецильными группами с размером диаметра частиц 5 мкм;
- колонка длиной 125 мм, с размером внутреннего диаметра 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 с диапазоном измерения от 4 до 9 ед. pH с погрешностью измерения ± 0,05 ед. pH.

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

[2)] В Российской Федерации действуют ГОСТ Р 55063—2012, ГОСТ Р 55361—2012.

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 $см^3$ 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 «синяя лента» по ГОСТ 12026.

Фильтры мембранные с размером диаметра пор не более 0,5 мкм.

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

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

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

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

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

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

Кислота уксусная, ч. д. а., по ГОСТ 61.

Набор синтетических красителей, содержащий:

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

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

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

Цинк уксуснокислый 2-водный, ч. д. а., по ГОСТ 5823, раствор массовой концентрации 300 $г/дм^3$ (раствор Карреза II).

Спирт этиловый ректификованный по нормативным документам государства, присоединившегося к стандарту.

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 анализируемого продукта

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

7 Условия проведения измерений

При проведении измерений в лаборатории необходимо соблюдать 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 диаметра 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 концентрации 0,8 г/дм^3. В мерную колбу вместимостью 1000 дм^3 помещают (0,800 ± 0,001) г ацетата аммония, растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки, затем кислотность раствора доводят до 4,2—4,3 ед. pH, добавляя по каплям «ледяную» уксусную кислоту.

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

Срок хранения раствора в плотно укупоренной посуде — не более 7 сут.

8.1.2 Приготовление подвижной фазы для жидкостной хроматографии

Раствор ацетата аммония массовой концентрации 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 — не более 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 профильтровывают через мембранный фильтр.

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

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

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 кислоты в i-м рабочем растворе, мг/дм^3.

8.1.5 Подготовка проб анализируемого продукта

Подготовка проб заключается в экстракции сорбиновой, бензойной и пропионовой кислот из анализируемого 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 кислоты 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 анализируемой пробы по 8.1.5, г.

Вычисления проводят до второго десятичного знака.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, округленное до второго десятичного знака, если выполнено 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 — не более 1 мес.

9.1.2 Приготовление основного раствора смеси пяти синтетических красителей массовой концентрации 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 синтетического 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 — не более 7 сут.

9.1.3 Приготовление рабочего раствора смеси пяти синтетических красителей массовой концентрации 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 концентрации 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 (см. таблицу 1).

Время выхода синтетических красителей указано в таблице 3.

Таблица 3

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

8,0—10,0 г анализируемого продукта взвешивают с записью результата до третьего знака после запятой, помещают в центрифужные пробирки вместимостью 25 см^3, добавляют 96 %-ный этиловый

спирт 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 с размером диаметра 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, дм^3;

C_3 — массовая концентрация синтетического красителя, рассчитанная по градуировочному графику, мг/дм^3;

V_4 — объем анализируемой пробы, дм^3.

Вычисления проводят до второго десятичного знака.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполнено 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 $\pm\delta$, %
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 синтетических красителей при P = 0,95 приведены в таблице 5.

Таблица 5

Наименование синтетического красителя	Диапазон измерений массовой концентрации красителя, мг/дм^3	Предел повторяемости $r_{отн}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	Границы относительной погрешности $\pm\delta$, %
Индигокармин	От 10 до 200 включ.	33	68	48
Желтый «Солнечный закат»		39	79	56
Тартразин		31	64	45

Окончание таблицы 5

Наименование синтетического красителя	Диапазон измерений массовой концентрации красителя, мг/дм^3	Предел повторяемости $r_{отн}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	Границы относительной погрешности $\pm\delta$, %
Понсо 4R	От 10 до 200 включ.	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 ИСО 5725-6.

Результаты измерений считают приемлемыми при условии:

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

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

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов 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 выполнено, то проводят повторные измерения и проверку приемлемости результатов определений в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6.

10.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

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

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

$$|X'_1 - X'_2| \le R_{отн} \cdot 0{,}01 \quad X_{ср},$$

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 результатов измерений массовой доли консервантов или массовой концентрации синтетических красителей, выполненных в условиях воспроизводимости, млн$^{-1}$ или мг/дм^3.

Если данное условие не выполнено, то определение повторяют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6.

11 Оформление результатов определения

Результат определения массовой доли консервантов и массовой концентрации синтетических 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, % (см. таблицы 4 и 5).

12 Требования безопасности

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

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

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

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

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

УДК 637.12.04/07:576.8:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко, молочная продукция, термины и определения, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, пробы, экстракция, консерванты, синтетические красители, массовая доля, массовая концентрация, контроль точности результатов определений, оформление результатов определений, требования безопасности

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 12.11.2019. Подписано в печать 02.12.2019 Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 0,98.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва. Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ 31504—2012 Молоко и молочная продукция. Определение содержания консервантов и красителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	Минэкономразвития Республики Армения

(ИУС № 6 2019 г.)

gost.e-ecolog.ru