МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32050— 2013

Продукты пищевые

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАССОВОЙ ДОЛИ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ В КАРАМЕЛИ

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых ароматизаторов, кислот и красителей» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИПАКК Россельхозакадемии), Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-исследовательский институт питания» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИ питания» РАМН)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 марта 2013 г. № 55-П)

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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 июля 2013 г. № 458-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32050—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2014 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 52671—2006

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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 в сети Интернет

© Стандартинформ, 2014

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 Отбор проб . . . 2
4 Требования безопасности . . . 2
5 Хроматографический метод качественного определения (идентификации) красителей в тонком слое сорбента . . . 3
6 Денситометрический метод определения массовой доли красителей в тонком слое сорбента . . . 8
7 Спектрофотометрический метод определения массовой доли красителей . . . 11
8 Определение массовой доли красителей методом зонального капиллярного электрофореза . . . 13
9 Обработка и оформление результатов измерений . . . 16
Приложение А (обязательное) Стандартные красители и их характеристики . . . 18
Приложение Б (обязательное) Определение массовой доли основного красящего вещества в стандартных красителях спектрофотометрическим методом . . . 19
Приложение В (рекомендуемое) Пример количественного определения Понсо 4R в смеси красителей с помощью видеоденситометра . . . 21

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

Продукты пищевые

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАССОВОЙ ДОЛИ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ В КАРАМЕЛИ

Food products. Methods for identification and determination of artificial colours mass fraction in caramel

Дата введения — 2014—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на карамель и устанавливает:

- хроматографический метод качественного определения (идентификации) синтетических красителей (далее — красители) в тонком слое сорбента при содержании красителей не менее 0,001 %;
- денситометрический метод определения массовой доли красителей в тонком слое сорбента (диапазон измеряемых массовых долей красителей — от 0,0012 % до 0,0250 %);
- спектрофотометрический метод определения массовой доли красителей (диапазон измеряемых массовых долей красителей — от 0,0004 % до 0,0015 %);
- метод зонального капиллярного электрофореза [диапазон определяемой массовой доли (содержания) с учетом разбавления от 1 до 100 млн$^{-1}$ (мг/кг)].

При возникновении разногласий применяют денситометрический метод количественного определения красителей в тонком слое сорбента. Предварительное разделение красителей следует проводить с использованием хроматографического метода качественного определения (идентификации) красителей в тонком слое сорбента (см. раздел 5).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.0.004—90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

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 12.2.007.0—75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

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

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

Издание официальное

ГОСТ 12.4.103—83 Система стандартов безопасности труда. Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 83—79 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия

ГОСТ 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—73, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3760—79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 3956—76 Силикагель технический. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4517—87 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе

ГОСТ ИСО 5725-2—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений*

ГОСТ 5830—79 Реактивы. Спирт изоамиловый. Технические условия

ГОСТ 5904—82 Изделия кондитерские. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб

ГОСТ 6016—77 Реактивы. Спирт изобутиловый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9875—88 Диэтиламин технический. Технические условия

ГОСТ 13647—78 Реактивы. Пиридин. Технические условия

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

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

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

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

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 ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. 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 Отбор проб

Отбор проб карамели — по ГОСТ 5904.

4 Требования безопасности

4.1 При выполнении анализов необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007 и ГОСТ 12.4.103.

4.2 Помещение, в котором проводят анализы, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021.

4.3 Электробезопасность при работе с электроустановками — по ГОСТ 12.2.007.0 и ГОСТ 12.1.019.

4.4 Организация обучения работающих безопасности труда — по ГОСТ 12.0.004.

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений».

4.5 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.6 Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

5 Хроматографический метод качественного определения (идентификации) красителей в тонком слое сорбента

Настоящий метод распространяется на карамель и предназначен для идентификации красителей, перечень которых приведен в таблице 1 (см. 5.6.1).

5.1 Сущность метода

Метод основан на сорбции красителей из раствора анализируемой карамели твердыми сорбентами, десорбции аммиаком, удалении последнего выпариванием и последующей идентификации красителей хроматографированием в тонком слое сорбента (ТСХ).

Идентификацию проводят методом сравнения значений R_f' (отношение расстояния миграции пятна анализируемого красителя до линии старта к расстоянию миграции границы элюента до линии старта) каждого красителя многокомпонентной анализируемой смеси со значениями R_f контрольных красителей (КО).

В качестве КО используют водные растворы стандартных красителей из числа ожидаемых.

5.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

- атмосферное давление — от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт. ст.);
- температура окружающего воздуха — от 10 °С до 35 °С;
- относительная влажность воздуха — от 40 % до 95 %;
- напряжение в электросети — $220^{+\,10\%}_{-\,15\%}$ В;
- частота тока в электросети — от 49 до 51 Гц.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

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

5.3.1 Весы по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт, со значением среднего квадратического отклонения (СКО), не превышающим 0,03 мг, и погрешностью от нелинейности не более ±0,06 мг.

5.3.2 Весы по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт, с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,1 г.

5.3.3 Весы со значением среднего квадратического отклонения (СКО), не превышающим 0,3 мг, и погрешностью от нелинейности не более ±0,6 мг.

5.3.4 Патрон для твердофазной экстракции с сорбентом алюминия оксидом.

5.3.5 Пластина для тонкослойной хроматографии с силикагелем на полимерной подложке размерами 10 × 10 см.

5.3.6 Камера хроматографическая размерами 12 × 12 × 5 м или 20 × 20 × 10 см.

5.3.7 Шприц медицинский инъекционный вместимостью 10—20 $см^3$.

5.3.8 Микрошприц вместимостью 0,001 $см^3$ с ценой деления не более 0,02 $мм^3$.

5.3.9 Пипетки по ГОСТ 29169 с одной меткой вместимостью 1, 5, 25, 50 $см^3$ 1-го класса точности.

5.3.10 Пипетки градуированные по ГОСТ 29227 вместимостью 1, 5, 10 $см^3$ 1-го класса точности.

5.3.11 Стаканы термостойкие по ГОСТ 25336 вместимостью 50, 200 $см^3$.

5.3.12 Колбы мерные с пришлифованной пробкой вместимостью 10, 50, 100, 500 $см^3$ 1-го класса точности по ГОСТ 1770.

5.3.13 Колбы конические термостойкие вместимостью 50, 250 $см^3$ по ГОСТ 25336.

5.3.14 Пробки стеклянные с конусом 29/32 по ГОСТ 1770.

5.3.15 Стаканчик СВ—14/8 по ГОСТ 25336.

5.3.16 Чашка выпарная круглодонная вместимостью 100 $см^3$ по ГОСТ 25336.

5.3.17 Палочка стеклянная с оплавленным концом.

5.3.18 Термостат или водяная баня.

5.3.19 Сушильный шкаф диапазоном температур в рабочей камере от 40 °С до 200 °С и основной погрешностью стабилизации температуры ±1 °С.

5.3.20 Эксикатор по ГОСТ 25336.

5.3.21 Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919.

5.3.22 Линейка металлическая по ГОСТ 427.

5.3.23 Ножницы конторские.

5.3.24 Пинцет медицинский по ГОСТ 21241.

5.3.25 Красители стандартные в соответствии с приложением А, за исключением стандартного красителя индигокармина.

5.3.26 Пиридин по ГОСТ 13647, ч. д. а.

5.3.27 Кислота уксусная по ГОСТ 61, х. ч., ледяная, раствор массовой концентрации 10 г/дм^3; готовят по ГОСТ 4517.

5.3.28 Спирт этиловый ректификованный технический высшего сорта по ГОСТ 18300.

5.3.29 Спирт изоамиловый по ГОСТ 5830, ч. д. а.

5.3.30 Спирт изобутиловый по ГОСТ 6016, ч. д. а.

5.3.31 Аммиак водный по ГОСТ 3760, ч. д. а., раствор массовой концентрации 250 г/дм^3.

5.3.32 Алюминия оксид активированный кислый pH = 4,5 ± 0,5, зернением от 0,05 до 0,15 мм, удельной поверхностью 155 м^2/г для колоночной хроматографии.

5.3.33 Силикагель марки КСМГ высшего или 1-го сорта по ГОСТ 3956.

5.3.34 Диэтиламин технический по ГОСТ 9875.

5.3.35 Хлороформ по ГОСТ 20015.

5.3.36 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов по качеству не хуже вышеуказанных.

5.4 Приготовление реактивов

5.4.1 Приготовление раствора аммиака (NH_3) массовой концентрации 125 г/дм^3

В мерную колбу (с пришлифованной пробкой) по ГОСТ 1770 вместимостью 10 см^3 вносят пипеткой по ГОСТ 29169 5 см^3 водного аммиака по ГОСТ 3760. Доводят объем раствора аммиака в колбе до метки дистиллированной водой по ГОСТ 6709, закрывают колбу пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

Раствор аммиака хранят в плотно закрытой таре по ГОСТ 3760 при температуре (20 ± 5) °С не более 1 мес.

5.4.2 Приготовление элюентов

5.4.2.1 Приготовление элюента 1

В коническую колбу по ГОСТ 25336 вместимостью 50 см^3 вносят пипетками по ГОСТ 29227, индивидуальными для каждого реактива, 3 см^3 пиридина по ГОСТ 13647, 3 см^3 изоамилового спирта по ГОСТ 5830, 3 см^3 изобутилового спирта по ГОСТ 6016, 4 см^3 технического ректификованного этилового спирта по ГОСТ 18300, 4 см^3 водного аммиака по ГОСТ 3760. Колбу закрывают стеклянной пробкой по ГОСТ 1770, и содержимое тщательно перемешивают.

5.4.2.2 Приготовление элюента 2

В коническую колбу вместимостью 50 см^3 вносят пипетками, индивидуальными для каждого реактива, 3 см^3 пиридина, 3 см^3 изоамилового спирта, 3 см^3 изобутилового спирта, 4 см^3 технического ректификованного этилового спирта, 8 см^3 водного аммиака. Колбу закрывают стеклянной пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

5.4.2.3 Приготовление элюента 3

В коническую колбу вместимостью 50 см^3 вносят пипетками, индивидуальными для каждого реактива, 6 см^3 диэтиламина по ГОСТ 9875, 5 см^3 хлороформа по ГОСТ 20015, 6 см^3 технического ректификованного этилового спирта, 3 см^3 раствора аммиака (NH_3) массовой концентрации 125 г/дм^3, приготовленного по 5.4.1. Колбу закрывают стеклянной пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

Элюенты готовят за 1 ч до начала анализа.

Не допускается повторное использование элюента.

5.5 Подготовка к анализу

5.5.1 Приготовление раствора КО стандартных красителей

5.5.1.1 В необходимое число стаканов по ГОСТ 25336 вместимостью 50 см^3 каждый взвешивают на весах (5.3.1) образцы стандартных красителей с записью результата до четвертого десятичного знака.

Массу образца стандартного красителя m, г, рассчитывают с учетом массовой доли основного красящего вещества в образце по формуле

$$m = \frac{0,25}{X} 100, \quad (1)$$

где 0,25 — масса образца красителя, при условии содержания в нем 100 % основного красящего вещества, г;

X — массовая доля основного красящего вещества в образце стандартного красителя, в соответствии с приложением Б, %;

100 — коэффициент пересчета, %.

5.5.1.2 В каждый стакан с образцом стандартного красителя, подготовленного по 5.5.1.1, прибавляют 20 см^3 дистиллированной воды и перемешивают стеклянной палочкой (см. 5.3.17) до полного растворения. Для интенсификации растворения допускается нагревание раствора в стакане на водяной бане до температуры не более 90 °С . Затем раствор охлаждают до 20 °С, переносят количественно в мерную колбу (с пришлифованной пробкой) вместимостью 100 см^3, доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой, закрывают колбу пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

5.5.1.3 Массовую концентрацию основного красящего вещества полученного раствора КО стандартного красителя $C_{КО}$, г/дм^3, определяют по формуле

$$C_{КО} = \frac{0,25}{V_{КО} \cdot 10^{-3}} \quad (2)$$

или

$$C_{КО} = 2,5, \quad (3)$$

где 0,25 — масса образца красителя, при условии содержания в нем 100 % основного красящего вещества, г;

$V_{КО}$ — объем раствора КО стандартного красителя ($V_{КО}$ = 100 см^3), см^3;

10^{-3} — коэффициент пересчета см^3 в дм^3.

Раствор КО стандартного красителя хранят в склянке из темного стекла с завинчивающейся пробкой при комнатной температуре.

Срок хранения растворов КО стандартных красителей 6 мес.

5.5.2 Извлечение красителей из анализируемой карамели методом твердофазной экстракции

5.5.2.1 Приготовление анализируемого раствора карамели

В стакане вместимостью 50 см^3 взвешивают на весах (см. 5.3.2) не менее 5 г анализируемой карамели (см. раздел 3) с точностью ±0,1 г. Затем в стакан прибавляют дистиллированную воду из расчета не менее 2 см^3 на 1 г карамели и перемешивают стеклянной палочкой (см. 5.3.17) до полного растворения карамели. Для интенсификации растворения карамели допускается нагревание раствора в стакане на водяной бане до температуры не более 90 °С. Раствор анализируемой карамели необходимо охладить до комнатной температуры.

5.5.2.2 Подготовка патрона для твердофазной экстракции

Медицинским шприцем (см. 5.3.7) набирают от 10 до 20 см^3 дистиллированной воды, соединяют шприц с патроном для твердофазной экстракции (см. 5.3.4), заполненным сорбентом [оксидом алюминия (см. 5.3.32)]. Патрон промывают со скоростью (15 ± 5) капель дистиллированной воды в минуту. Объем пропускаемой через патрон дистиллированной воды должен быть не менее 30 см^3. После этого патрон промывают один раз 25 см^3 раствора ледяной уксусной кислоты массовой концентрации 10 г/дм^3 (см. 5.3.27). Затем патрон отсоединяют от шприца.

5.5.2.3 Сорбция красителей из карамели

Медицинским шприцем набирают от 10 до 20 см^3 анализируемого раствора карамели, подготовленного по 5.5.2.1, и соединяют шприц с патроном. Пропускают анализируемый раствор карамели через патрон по одной капле со скоростью (15 ± 5) капель в минуту. При появлении на выходе из патрона окрашенного анализируемого раствора карамели его пропускают через второй патрон. При необходимости используют от 1 до 5 патронов, подготовленных по 5.5.2.2, до достижения полноты сорбции красителя. После этого промывают каждый патрон с сорбированным красителем 25 см^3 раствора ледяной уксусной кислоты массовой концентрации 10 г/дм^3 по одной капле со скоростью (15 ± 5) капель в минуту.

5.5.2.4 Десорбция красителей из патронов водным аммиаком

Медицинским шприцем набирают от 10 до 20 $см^3$ водного аммиака (см. 5.3.31) и соединяют шприц с патроном. Пропускают водный аммиак через патрон по одной капле со скоростью (15 ± 5) капель в минуту. При необходимости промывание патрона водным аммиаком повторяют до полного обесцвечивания сорбента (оксида алюминия) в патроне. Элюат (раствор водного аммиака, пропущенный через патрон) собирают в выпарную чашку (см. 5.3.16) и выпаривают досуха на водяной бане температурой от 80 °С до 90 °С. Сразу после испарения раствора аммиака чашку с сухим остатком (красителем) охлаждают. Краситель растворяют в чашке, добавляя пипеткой по ГОСТ 29227 от 0,5 до 1,0 $см^3$ дистиллированной воды.

5.5.3 Подготовка хроматографической камеры

В хроматографическую камеру (см. 5.3.6) вносят элюент 1, приготовленный по 5.4.2.1, в количестве, необходимом для погружения хроматографической пластины на глубину не более 0,5 см от нижнего края пластины. Камеру плотно закрывают и выдерживают в течение 1 ч.

5.5.4 Подготовка пластин для ТСХ анализа

На хроматографическую пластину (см. 5.3.5) карандашом наносят линию старта на расстоянии 1 см от края пластины и линию границы элюента на расстоянии 7 см от линии старта. На линию старта карандашом наносят точки с интервалом не менее 1 см.

5.5.5 Получение хроматографических карт реперов КО стандартных красителей

На пластину, подготовленную по 5.5.4, микрошприцем (см. 5.3.8) наносят на линию старта в несколько приемов с промежуточным подсушиванием на воздухе 0,3 $мм^3$ каждого раствора репера КО стандартных красителей, полученных по 5.5.1. После нанесения раствора пластину подсушивают в течение 3—4 мин и затем пинцетом по ГОСТ 21241 погружают в раствор элюента 1 на глубину не более 0,5 см от нижнего края пластины под углом примерно 45°. Камеру плотно закрывают. Элюирование заканчивают при достижении элюентом 1 линии границы элюента. По окончании элюирования пластину вынимают и подсушивают.

Аналогично получают хроматографические карты с использованием элюентов 2 и 3.

Значения R_f реперов стандартных красителей рассчитывают по формуле

$$R_f = \frac{l_к}{l_э}, \quad (4)$$

где $l_к$ — расстояние до линии старта от центра пятна репера стандартного красителя, см;

$l_э$ — расстояние до линии старта от линии границы элюента, см.

5.6 Проведение анализа

5.6.1 Предварительная идентификация красителя в анализируемой карамели

Пластину, подготовленную по 5.5.4, разрезают ножницами на две части на расстоянии от 3,0 до 3,5 см от боковой стороны пластины, перпендикулярно к линии старта.

На подготовленную хроматографическую пластину шириной от 3,0 до 3,5 см микрошприцем (см. 5.3.8) наносят на линию старта в несколько приемов с промежуточным подсушиванием на воздухе от 0,3 до 1,0 $мм^3$ раствора, полученного по 5.5.2.4. После нанесения раствора пластину подсушивают в течение 3—4 мин и затем пинцетом погружают в раствор элюента 1 на глубину не более 0,5 см от нижнего края пластины под углом примерно 45°. Камеру плотно закрывают. Элюирование заканчивают при достижении элюентом 1 линии границы элюента. По окончании элюирования пластину вынимают и подсушивают.

При отсутствии разделения пятен красителей на хроматограмме анализ повторяют, используя элюент 2 или элюент 3.

Предварительную идентификацию анализируемого красителя проводят на основе визуальной оценки цвета пятен и сравнением значений R_f' анализируемых красителей, рассчитанных по формуле (9), со значениями R_f стандартных красителей, рассчитанных по формуле (4) и приведенных в таблице 1, или с помощью хроматографических карт, полученных при предварительном хроматографировании растворов КО стандартных красителей.

Таблица 1 — Значения R_f стандартных красителей

Наименование стандартного красителя	Номер красителя*	Индекс пищевой добавки**	Значения R_f для элюента		
			1	2	3
Тартразин	CI 19140	E102	0,27	0,49	0,37

Окончание таблицы 1

Наименование стандартного красителя	Номер красителя*	Индекс пищевой добавки**	Значения R_f для элюента		
			1	2	3
Желтый хинолиновый	CI 47005	E104	0,74 0,83	0,65 0,69	0,47 0,65
Желтый «Солнечный закат»	CI 15985	E110	0,39	0,68	0,64
Азорубин	CI 14720	E122	0,34	0,67	0,54
Понсо 4R	CI 16255	E124	0,24	0,65	0,48
Красный очаровательный AC	CI 16035	E129	0,50	0,67	0,66
Синий патентованный V	CI 42051	E131	0,20	0,63	0,46
Синий блестящий FCF	CI 42090	E133	0,43	0,69	0,59
Зеленый S	CI 44090	E142	0,16	0,54 0,63	0,55
Зеленый прочный FCF	CI 42053	E143	0,43	0,37	0,39
Черный блестящий PN	CI 28440	E151	0,25	0,62	0,40
Желтый 2 G	CI 18965	E107	0,32	0,65	0,31
Амарант	CI 16185	E123	0,29	0,64	0,43
Эритрозин	CI 45430	E127	0,57	0,76	0,90
Красный 2G	CI 18050	E128	0,49	0,51	0,48

* Номер красителя в соответствии с международным каталогом красителей Colour Index.

** Индекс красителя в соответствии с европейской кодификацией пищевых добавок.

5.6.2 Приготовление растворов КО смесевых стандартных красителей

5.6.2.1 Растворы КО смесевых стандартных красителей готовят с учетом предварительной идентификации красителей по 5.6.1.

Примечание — На силикагелевых пластинах синие, фиолетовые и красные красители идентифицируются намного лучше желтых и оранжевых.

5.6.2.2 Приготовление раствора А

В мерную колбу (с пришлифованной пробкой) вместимостью 500 см^3 пипеткой вносят по 50 см^3 растворов КО стандартных красителей, присутствие которых наиболее вероятно в анализируемой карамели, доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой, закрывают колбу пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

Массовую концентрацию каждого компонента полученного раствора А $C_к$, г/дм^3, определяют по формуле

$$C_к = \frac{C_{КО} V_к}{V} \quad (5)$$

или

$$C_к = 0{,}25, \quad (6)$$

где $C_{ко}$ — массовая концентрация основного красящего вещества раствора КО стандартного красителя, г/дм^3, приготовленного по 5.5.1.2;

$V_к$ — объем раствора КО стандартного красителя, взятого для приготовления раствора КО смесевого стандартного красителя ($V_к$ = 50 см^3), см^3;

V — объем раствора КО смесевых стандартных красителей (V = 500 см^3), см^3.

5.6.2.3 Приготовление раствора Б

Пипеткой (см. 5.3.9) отбирают 25 см^3 раствора А, приготовленного по 5.6.2.2, и переносят в мерную колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 50 см^3. Доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой, закрывают колбу пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

Массовую концентрацию каждого компонента полученного раствора Б $C_{к1}$, г/дм^3, определяют по формуле

$$C_{к1} = \frac{C_к}{2}, \quad (7)$$

где $C_к$ — массовая концентрация красителя в растворе А по 5.6.2.2, г/дм^3;

2 — коэффициент разведения.

5.6.2.4 Приготовление раствора В

Пипеткой отбирают 25 см^3 раствора Б, приготовленного по 5.6.2.3, и переносят в мерную колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 50 см^3. Доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой, колбу закрывают пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

Массовую концентрацию каждого компонента полученного раствора В $C_{к2}$, г/дм^3, определяют по формуле

$$C_{к2} = \frac{C_{к1}}{2}, \quad (8)$$

где $C_{к1}$ — массовая концентрация красителя в растворе Б по 5.6.2.3, г/дм^3;

2 — коэффициент разведения.

Полученные растворы Б и В используют в качестве реперов (свидетелей).

5.6.3 Идентификация красителя

На хроматографическую пластину, подготовленную по 5.5.4, шириной от 6,5 до 7,0 см, микрошприцем наносят на линию старта в несколько приемов с промежуточным подсушиванием на воздухе от 0,3 до 1,0 мм^3 растворов реперов (растворы Б и В) и анализируемого раствора красителя по 5.5.2.4. Все растворы наносят на пластину в одинаковой пропорции. После нанесения растворов пластину подсушивают в течение 3—4 мин и затем пинцетом помещают в хроматографическую камеру, заполненную элюентом. Элюент выбирают в соответствии с 5.6.1 и таблицей 1. Камеру плотно закрывают. Элюирование заканчивают при достижении элюентом линии границы элюента 7,0 см от линии старта. По окончании элюирования хроматографическую пластину вынимают и подсушивают.

5.6.4 Обработка результатов

Линейкой по ГОСТ 427 измеряют расстояние от центра каждого пятна анализируемого красителя и линии границы элюента до линии старта.

Вычисляют значение R_f' анализируемого красителя по формуле

$$R_f' = \frac{l_к}{l_э}, \quad (9)$$

где $l_к$ — расстояние до линии старта от центра пятна анализируемого красителя, см;

$l_э$ — расстояние до линии старта от линии границы элюента, см.

При совпадении цвета и положения хотя бы одного из пятен обнаруженных красителей с одним из пятен КО, идентифицируют обнаруженные красители, сравнивая значения R_f' рассчитанные по формуле (9), со значениями R_f КО, рассчитанными по формуле (4) и приведенными в таблице 1.

6 Денситометрический метод определения массовой доли красителей в тонком слое сорбента

Метод предназначен для количественного определения в карамели синтетических красителей (основных красящих веществ): тартразина Е102, желтого хинолинового Е104, желтого «Солнечный закат» Е110, азорубина Е122, амаранта Е123, понсо 4R Е124, эритрозина Е127, красного 2G Е128, красного очаровательного АС Е129, синего патентованного V Е131, синего блестящего FCF Е133, зеленого прочного FSF Е143, черного блестящего PN Е151.

6.1 Сущность метода

Метод основан на сорбции красителей из раствора анализируемой карамели твердыми сорбентами, десорбции аммиаком, удалении аммиака выпариванием, хроматографировании в ТСХ и определении массовой доли красителей методом количественной оптической денситометрии с компьютерной обработкой тонкослойных хроматограмм.

В качестве реперов (свидетелей) используют растворы КО стандартных красителей (растворы Б и В, приготовленные по 5.6.2.3 и 5.6.2.4).

6.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха — от 15 °С до 25 °С;
- атмосферное давление — от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт. ст.);
- относительная влажность воздуха — от 30 % до 80 %;
- напряжение в электросети — $200^{+10\%}_{-15\%}$ В;
- частота тока в электросети — от 49 до 51 Гц.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

6.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Для проведения анализа следует использовать средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы по 5.3, за исключением стандартных красителей: желтый 2 G, индигокармина и зеленого S (см. приложение А), а также:

- оптический денситометр, работающий в диапазоне длин волн от 400 до 800 нм, с чувствительностью по каждому измеряемому красителю в карамели не ниже 0,0012 %;
- детектор — черно-белую малогабаритную видеокамеру или аналогичную цветную с чувствительностью не ниже 0,02 лк, с ручной фокусировкой и ручной регулировкой диафрагмы либо цветной сканер с разрешением от 200 dpi и выше с графическим интерфейсом, функциями управления сканером, связи и передачи данных в программное приложение компьютера;
- компьютер с операционной системой, совместимой с программным обеспечением сканера и специальным программным обеспечением по обработке тонкослойных хроматограмм;
- блок ввода изображения.

Допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования и программного обеспечения, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов по качеству не хуже вышеуказанных.

6.4 Приготовление реактивов

Приготовление реактивов — по 5.4.

6.5 Подготовка к анализу

Подготовка к анализу — по 5.5.

6.6 Проведение анализа

6.6.1 Предварительная идентификация анализируемого красителя — по 5.6.1.

6.6.2 Приготовление растворов КО смесевых стандартных красителей — по 5.6.2.

6.6.3 Идентификация красителя — по 5.6.3.

6.6.4 Проведение измерений

Определение значений R_f, R'_f и массовых долей красителей проводят на денситометре.

Массу каждого красителя в пятне репера (свидетеля) КО смесевого стандартного красителя, полученном нанесением на пластину раствора Б, $m_Б$, мкг, рассчитывают по формуле

$$m_Б = C_{к1} V_Б, \quad (10)$$

где $C_{к1}$ — массовая концентрация каждого красителя в растворе репера Б (свидетеля) смесевого стандартного красителя по 5.6.2.3, мкг/мм^3;

$V_Б$ — объем раствора репера Б (свидетеля) смесевого красителя, нанесенного на пластину ТСХ по 5.6.3, мм^3.

Массу каждого красителя в пятне репера (свидетеля) КО смесевого стандартного красителя, полученном нанесением на пластину раствора В, $m_В$, мкг, рассчитывают по формуле

$$m_В = C_{к2} V_В, \quad (11)$$

где $C_{к2}$ — массовая концентрация каждого красителя раствора репера В (свидетеля) смесевого стандартного красителя по 5.6.2.4, мкг/мм^3;

$V_В$ — объем раствора репера В (свидетеля) смесевого красителя, нанесенного на пластину ТСХ по 5.6.3, мм^3.

Значения массы каждого красителя в пятне репера (свидетеля) КО смесевого стандартного красителя вводят в программу компьютерной обработки, а массу анализируемого красителя обозначают X.

Получают результат измерения — массу анализируемого красителя, нанесенного на пластину (мкг).

В случае если массовая доля красителя в анализируемом растворе превысит диапазон измерения от 0,0012 % до 0,0250 %, необходимо разбавить раствор до концентрации, соответствующей указанному диапазону, и значение массовой доли красителя, рассчитанное по формуле (12), умножить на коэффициент разбавления.

Пример количественного определения красителя приведен в приложении В.

6.7 Обработка результатов

6.7.1 Массовую долю красителя в анализируемой карамели C_1, %, рассчитывают по формуле

$$C_1 = \frac{M_{вых} 10^{-6} V_1}{V_2 10^{-3} m_1} 100 \quad (12)$$

или

$$C_1 = \frac{M_{вых} V_1}{m_1 V_2 10}, \quad (13)$$

где $M_{вых}$ — масса анализируемого красителя в пятне пластины ТСХ, мкг;

10^{-6} — коэффициент пересчета мкг в г;

V_1 — объем анализируемого раствора красителя, полученного по 5.5.2.4, см^3;

V_2 — объем анализируемого раствора красителя, нанесенного на пластину ТСХ по 5.6.3, мм^3;

10^{-3} — коэффициент пересчета мм^3 в см^3;

m_1 — масса пробы анализируемой карамели, взятой для анализа, г;

100 — коэффициент пересчета в %.

Вычисления проводят с записью результата до пятого десятичного знака.

Окончательный результат записывают с точностью до четвертого десятичного знака.

6.7.2 За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение $C_{ср}$, %, двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{C_{11} - C_{12}}{C_{ср}} 100 \le r, \quad (14)$$

где C_{11}, C_{12} — результаты анализов двух параллельных измерений массовой доли красителя, выполненных в условиях повторяемости, %;

$C_{ср}$ — среднее значение двух параллельных измерений массовой доли красителя, выполненных в условиях повторяемости, %;

r — значение предела повторяемости, %, приведенное в таблице 2.

Результат анализа представляют в виде

$$C_{ср} \pm 0{,}01\ \delta C_{ср} \text{ при } P = 0{,}95, \quad (15)$$

где $C_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух определений, признанных приемлемыми, %;

δ — границы относительной погрешности измерений, %.

Пределы повторяемости r и воспроизводимости R, а также показатель точности измерений массовой доли красителя в карамели δ приведены в таблице 2.

Таблица 2

Диапазон измерений массовой доли красителя в карамели, %	Предел повторяемости r, % отн. при $P = 0{,}95$, $n = 2$	Предел воспроизводимости R, % отн. при $P = 0{,}95$, $m = 2$	Показатель точности (границы относительной погрешности) $\pm\ \delta$, %, при $P = 0{,}95$
0,0012—0,025	10	15	10

7 Спектрофотометрический метод определения массовой доли красителей

Метод предназначен для количественного определения в карамели индивидуальных красителей (основных красящих веществ) в соответствии с таблицей 3 и смесевых красителей, в состав которых входят два индивидуальных красителя, максимумы светопоглощения которых находятся в диапазонах длин волн 400—450 нм и 590—640 нм.

Таблица 3 — Спектрофотометрические характеристики красителей

Наименование красителя	Индекс пищевой добавки	Растворитель	Длина волны, соответствующая максимуму светопоглощения, нм	Удельный коэффициент светопоглощения $E^{1\%}_{1см}$
Тартразин	Е102	Дистиллированная вода	426	530
Желтый хинолиновый	Е104	Раствор уксусной кислоты pH 5	411	865
Желтый «Солнечный закат»	Е110	Дистиллированная вода pH 7	485	555
Азорубин	Е122	Дистиллированная вода	516	510
Амарант	Е123	Дистиллированная вода	520	440
Понсо 4R	Е124	Дистиллированная вода	505	430
Красный 2G	Е128	Дистиллированная вода	532	620
Красный очаровательный АС	Е129	Дистиллированная вода pH 7	504	540
Синий патентованный V	Е131	Дистиллированная вода pH 5	638	2000
Индигокармин	Е132	Дистиллированная вода	610	480
Синий блестящий FCF	Е133	Дистиллированная вода	630	1630
Зеленый S	Е142	Дистиллированная вода	632	1720
Зеленый прочный FCF	Е143	50 %-ный раствор этанола	625	1560
Черный блестящий PN	Е151	Дистиллированная вода	570	530
Эритрозин	Е127	Дистиллированная вода pH 7	526	1100

7.1 Сущность метода

Метод основан на сорбции красителей из раствора анализируемой карамели твердыми сорбентами, десорбции аммиаком, удалении аммиака выпариванием и определении массовой доли красителей по интенсивности окраски полученного раствора методом спектрофотометрии при характеристической длине волны.

7.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены условия в соответствии с 5.2.

7.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Для проведения анализа используют средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы по 5.3, за исключением стандартного красителя Желтый 2G, а также:

- спектрофотометр диапазоном измерения в интервале длин волн от 210 до 700 нм, допустимой абсолютной погрешностью коэффициента пропускания не более 1 %, спектральной шириной не более 1 нм;
- кюветы кварцевые с толщиной поглощающего слоя 1 см.

7.4 Подготовка к анализу

Извлеченный по 5.5.2 из анализируемой карамели раствор красителя переносят количественно в мерную колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 10 см^3. Доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой, закрывают колбу пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

7.5 Проведение анализа

Кювету спектрофотометра заполняют приготовленным по 7.4 раствором анализируемого красителя и измеряют оптическую плотность при длине волны, соответствующей максимуму светопоглощения в соответствии с таблицей 3, относительно оптической плотности растворителя.

При совпадении максимумов светопоглощения растворов анализируемых красителей с максимумами светопоглощения красителей желтого хинолинового и зеленого прочного FCF (см. таблицу 3), проводят повторный анализ извлеченного по 5.5.2 из анализируемой карамели раствора красителя, используя для его растворения растворитель в соответствии с таблицей 3.

Значение оптической плотности раствора должно находиться в диапазоне от 0,2 до 0,8. В случае превышения значения оптической плотности раствора 0,8 необходимо разбавить раствор и значение массовой доли красителя, рассчитанное по формуле (16), умножить на коэффициент разбавления.

7.6 Обработка результатов

7.6.1 Массовую долю красителя в анализируемой карамели C_2, %, рассчитывают по формуле

$$C_2 = \frac{AV_1}{E^{1\%}_{1см} d m_2}, \qquad (16)$$

где A — оптическая плотность раствора анализируемого красителя по 7.5 при длине волны, указанной в таблице 3;

V_1 — объем разведения по 7.4, см^3 (V_1 = 10 см^3);

$E^{1\%}_{1см}$ — удельный коэффициент светопоглощения в соответствии с таблицей 3, численно равный оптической плотности раствора с массовой долей красителя 1 % при толщине поглощающего слоя 1 см, %$^{-1}$·см$^{-1}$;

d — толщина поглощающего слоя, см (d = 1 см);

m_2 — масса пробы анализируемой карамели, взятой для анализа, г.

Вычисления проводят с записью результата до пятого десятичного знака.

Окончательный результат записывают с точностью до четвертого десятичного знака.

7.6.2 За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение $C_{ср}$, %, двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{C_{2_1} - C_{2_2}}{C_{ср}} 100 \le r, \qquad (17)$$

где C_{2_1}, C_{2_2} — результаты анализов двух параллельных измерений массовой доли красителя, %;

$C_{ср}$ — среднее значение двух параллельных измерений массовой доли красителя, %;

r — значение предела повторяемости, приведенное в таблице 4.

7.6.3 Результат анализа представляют в виде:

$$C_{ср} \pm 0{,}01\delta C_{ср} \text{ при } P = 0{,}95, \qquad (18)$$

где $C_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух определений, признанных приемлемыми, %;

δ — границы относительной погрешности измерений, %.

Пределы повторяемости r и воспроизводимости R, а также показатель точности δ измерений массовой доли красителя в карамели приведены в таблице 4.

Таблица 4

Диапазон измерений массовой доли красителя в карамели, %	Предел повторяемости r, % отн. при P = 0,95, n = 2	Предел воспроизводимости R, % отн. при P = 0,95, m = 2	Показатель точности (границы относительной погрешности) ± δ, %, при P = 0,95
0,0004—0,0015	10	15	10

8 Определение массовой доли красителей методом зонального капиллярного электрофореза

Метод предназначен для количественного определения в карамели синтетических красителей (основных красящих веществ) в соответствии с таблицей 5.

8.1 Сущность метода

Метод капиллярного электрофореза для определения массовой доли красителей основан на разделении компонентов в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Капиллярный зональный электрофорез (английское сокращение CZE образовано от слов capillary zone electrophoresis) является простейшим видом капиллярного электрофореза, когда разделение обеспечивается за счет миграции растворенных веществ в зонах, движущихся с разной скоростью, и электроосмотического потока.

Идентификацию и количественное определение анализируемых красителей проводят, регистрируя поглощение при длинах волн 254, 450, 520 и 599 нм (а также снятием спектра в диапазоне от 200 до 600 нм) и времена миграции красителей.

В капиллярном электрофорезе разделение проводят с использованием кварцевых капилляров, имеющих внешнее полимерное покрытие, обычно полиимидное, улучшающее их механическую прочность, и значительно реже полимерные капилляры, например из тефлона. Внутренний диаметр капилляров колеблется в пределах от 25 до 200 микрон, а длина капилляра в зависимости от поставленной задачи — от нескольких сантиметров до 1 м.

Диапазон определяемой массовой доли (содержания) с учетом разбавления — от 1 до 100 млн$^{-1}$ (мг/кг).

8.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

Система капиллярного электрофореза с диодноматричным детектором с кварцевым капилляром $L_{эфф}/L_{общ}$ = 56/64 см, ID = 50 мкм. Детектирование проводят на длинах волн 254, 450, 520 и 599 нм.

Технические характеристики системы капиллярного электрофореза: диапазон напряжений — от 0 до 30 кВ; ток — от 0 до 300 мкА; мощность — от 0 до 6 Вт; гидродинамическое введение образца; регистрация детектором с диодной матрицей в диапазоне длин волн от 190 до 600 нм (с шагом 1 нм); продолжительность периода сканирования — 0,1 с; автоматический пробоотборник; термостатирование капилляра — от температуры на 10 °С ниже комнатной до 60 °С (шаг указания температуры — 0,1 °С).

Спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора, диапазоном измерения длин волн от 400 до 700 нм.

Весы по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт, со значением среднего квадратического отклонения (СКО), не превышающим 0,3 мг, и погрешностью от нелинейности не более ±0,6 мг.

Весы по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт, с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,01 г.

УЗ-ванна частотой ультразвука 43—45 кГц, рабочее время сессии — 99 с, мощность — 90 Вт.

Центрифуга с ротором для одноразовых пробирок из полимерных материалов вместимостью 1,5 см^3, с частотой вращения не менее 14680 об/мин (20000*g*).

Шейкер рабочим диапазоном 50—350 об/мин (шаг — 10 об/мин) и таймер диапазоном от 1 мин до 96 ч.

pH-метр диапазоном измерений –1,99 ...+19,99 с пределом погрешности измерения pH не более ± 0,1.

Кювета кварцевая, длина оптического пути — 1 см.

Пипетки градуированные вместимостью 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 см^3 по ГОСТ 29227.

Колбы мерные 2–250–2, 2–100–2, 2–50–2, 2–25–2 по ГОСТ 1770.

Стаканы химические вместимостью 100 см^3 по ГОСТ 25336.

Цилиндры мерные лабораторные с носиком 2-го класса точности вместимостью 25 см^3 по ГОСТ 1770.

Пробирки центрифужные одноразовые из полимерных материалов вместимостью 1,5 см^3.

Флаконы (виалы), соответствующие пробоотборнику (автосэмплеру) прибора.

Мембранный фильтр целлюлозный диаметром 47 мм, размер пор — 0,45 мкм.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, ч. д. а.

Натрий углекислый по ГОСТ 83, ч. д. а.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч. д. а.

Ацетонитрил, ос. ч.

Красители стандартные в соответствии с приложением А, за исключением стандартных синтетических красителей: амаранта, желтого 2 G, зеленого S, зеленого прочного FCF.

Допускается применение других реактивов и средств измерения с характеристиками не хуже указанных.

8.3 Приготовление градуировочных растворов

8.3.1 Приготовление исходных растворов красителей

В необходимое число стеклянных стаканов отбирают по 0,1 г (с точностью 0,001 г) стандартных образцов красителей. В каждый стакан прибавляют примерно 50 см^3 дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения навески, при необходимости подвергая ультразвуковому воздействию в УЗ-ванне. Полученные растворы количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой, закрывают колбу пробкой и тщательно перемешивают содержимое. Массовую долю полученных исходных растворов красителей определяют методом спектрофотометрии в соответствии с приложением Б.

8.3.2 Приготовление градуировочных растворов красителей

Градуировочные растворы с массовой долей на уровне 0,005; 0,01; 0,02 и 0,05 г/дм^3 (точное содержание зависит от определенной концентрации красителя в исходном растворе) готовят из исходных растворов красителей. Для этого в мерные колбы объемом 100 см^3 вносят по 0,5; 1,0; 2,0 и 5,0 см^3 исходного раствора и доводят объем до метки дистиллированной водой. Колбы укупоривают пробками и тщательно перемешивают содержимое.

Срок хранения исходных градуировочных растворов при температуре от 6 °С до 22 °С — не более 1 мес. Срок хранения градуировочных растворов при температуре от 2 °С до 6 °С — не более 3 мес.

8.4 Подготовка проб

От 0,500 до 1,000 г измельченной пробы помещают в стеклянный стакан, после чего добавляют от 50 до 70 см^3 дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения образца, при необходимости озвучивая в УЗ-ванне. В случае нагрева растворов их охлаждают до комнатной температуры. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки дистиллированной водой. Колбу укупоривают пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

Полученные пробы исследуют в течение суток.

8.5 Приготовление растворов гидроокиси натрия

8.5.1 Приготовление концентрированного раствора

4,0 г гидроокиси натрия помещают в стеклянный стакан, добавляют примерно 50 см^3 дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу объемом 100 см^3, доводят объем до метки дистиллированной водой. Колбу укупоривают пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

8.5.2 Приготовление разбавленного раствора

0,40 г гидроокиси натрия помещают в стеклянный стакан, добавляют около 50 см^3 дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки дистиллированной водой. Колбу укупоривают пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

Полученные растворы фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 6 °С — не более 1 мес.

8.6 Приготовление буферного раствора

0,136 г фосфорнокислого однозамещенного калия и 0,106 г углекислого натрия помещают в стеклянный стакан, затем добавляют 50 см^3 дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения, при необходимости озвучивая в УЗ-ванне. Затем концентрированным раствором гидроокиси натрия доводят значение pH буферного раствора до 10,0 ед. pH (контроль по pH-метру). В случае нагрева растворов их охлаждают до комнатной температуры. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3. После этого мерным цилиндром в колбу добавляют 20 см^3 ацетонитрила, перемешивают и доводят объем до метки дистиллированной водой, колбу укупоривают пробкой и перемешивают. При наблюдении явления контракции объем снова доводят до метки дистиллированной водой и повторно перемешивают.

Полученный буферный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Срок хранения буферного раствора — не более 1 мес при температуре от 2 °С до 6 °С.

Перед анализом буферный раствор переносят в соответствующие флаконы (виалы).

8.7 Подготовка прибора

Прибор подготавливают к работе в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают следующие рабочие параметры:

- дозирование пробы — гидродинамическое при 30 мбар в течение 10 с;
- напряжение: 0 мин — 0 кВ, далее с 0 мин до 1,0 мин напряжение поднимают до 20 кВ, от 1,0 мин до 1,5 мин напряжение поднимают до 30 кВ;
- кварцевый капилляр общей длиной 64 см, расстояние до детектора (эффективная длина) — 56 см, внутренний диаметр — 50 мкм.

Термостатирование капилляра проводят при температуре 25 °С.

Детектирование: аналитические длины волн с шириной окна 20 нм: 254, 450, 520 и 590 нм (см. таблицу 5), снятие спектра в диапазоне от 200 до 600 нм; аналитическую длину волны используют для градуировки и количественного определения.

Время анализа — 25 мин.

Перед началом работы капилляр в течение 5 мин промывают концентрированным раствором гидроокиси натрия, затем в течение 10 мин дистиллированной водой и в течение 5 мин буферным раствором.

Между анализами капилляр в течение 3 мин промывают дистиллированной водой, затем 2 мин разбавленным раствором гидроокиси натрия, в течение 3 мин снова дистиллированной водой и в конце в течение 1 мин буферным раствором.

Первое измерение, проведенное на новой порции буфера, отбрасывают. Содержимое одного флакона (виалы) с буферным раствором рекомендуется использовать для выполнения не более 5 измерений.

8.8 Градуировка прибора

По 1 $см^3$ приготовленных градуировочных растворов помещают в центрифужную одноразовую пробирку и центрифугируют 2 мин. Не менее 0,5 $см^3$ супернатанта переносят в виалу и устанавливают в лоток прибора, после чего проводят измерение.

На основании полученных данных строят градуировочный график и определяют формулу, описывающую его (например, методом наименьших квадратов). Также определяют коэффициент корреляции: градуировка признается удовлетворительной, если коэффициент корреляции, рассчитанный программой, будет не менее 0,99.

Допускается проведение расчетов по градуировке автоматически с помощью программного обеспечения прибора.

8.9 Проведение анализа

1 $см^3$ приготовленного раствора образца помещают в центрифужную одноразовую пробирку и центрифугируют 2 мин. Не менее 0,5 $см^3$ супернатанта переносят в виалу и устанавливают в лоток прибора, после чего проводят измерение.

При проведении определения следует ориентироваться на аналитические длины волн и времена миграции, приведенные в таблице 5.

Пример электрофореграммы смеси пищевых красителей приведен на рисунке 1.

Таблица 5

Краситель и его индекс	Аналитическая длина волны, нм	Время миграции основного изомера, мин*	Время миграции других изомеров, мин**
Тартразин Е102	450	22,5	—
Желтый хинолиновый Е104	450	14,22	11,52; 22,00
Желтый «Солнечный закат» Е110	450	11,74 или 15,90	—
Азорубин, кармуазин Е122	520	18,20	—
Понсо 4R, пунцовый 4R Е124	520	18,38	—
Эритрозин Е127	520	9,13	9,29

Окончание таблицы 5

Краситель и его индекс	Аналитическая длина волны, нм	Время миграции основного изомера, мин*	Время миграции других изомеров, мин**
Красный 2G E128	520	10,5	—
Красный очаровательный AC E129	520	10,31	—
Синий патентованный V E131	590	7,63	—
Индигокармин E132	590	10,88	—
Синий блестящий FCF E133	590	7,72	—
Черный блестящий PN E151	590	19,84	—

* Состав некоторых красителей представлен несколькими изомерами, один из которых, как правило, является основным (преобладающим). Для количественного определения необходимо обрабатывать сумму всех пиков, относящихся к данному красителю, т. к. коэффициенты молярной экстинкции у изомеров одинаковые.

** Время миграции 11,74 наблюдают, как правило, при анализе сложных смесей, в то время как время миграции 15,90 наблюдают при анализе однокомпонентной смеси, состоящей из красителя и носителя.

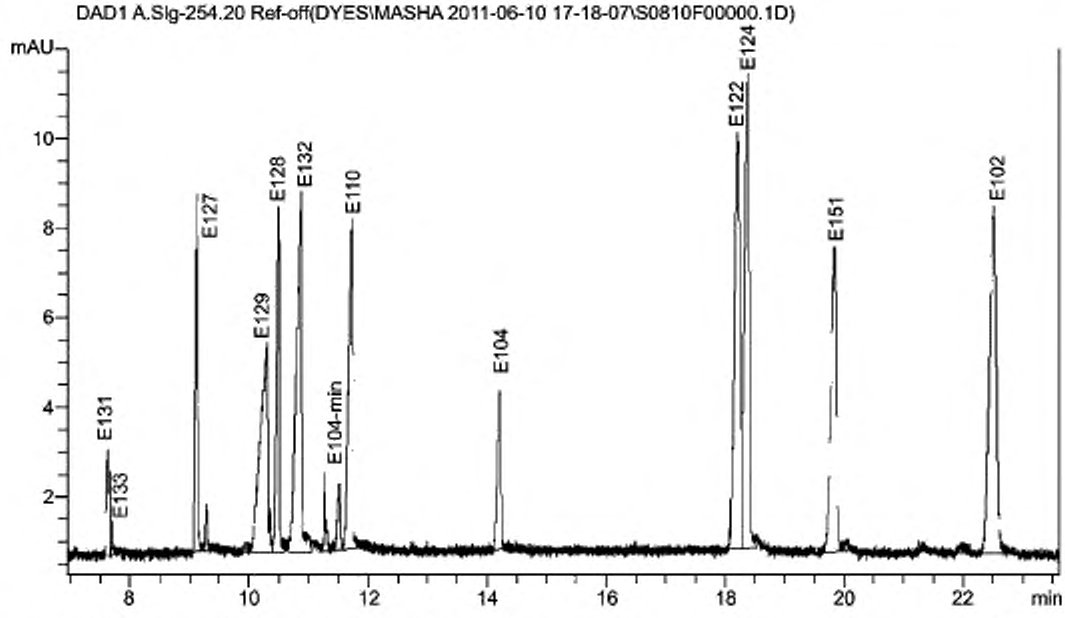

Рисунок 1 — Пример электрофореграммы смеси синтетических пищевых красителей на длине волны 254 нм

9 Обработка и оформление результатов измерений

Идентификацию красителей осуществляют, исходя из сравнения времен миграции и спектров анализируемых образцов со стандартными растворами красителей. Таким образом, в случае наблюдения пика вещества или пиков веществ в зоне выхода соответствующих красителей необходимо предварительно сравнить спектр каждого пика с предполагаемым красителем и после установления тождественности этих двух спектров проводить количественное определение. Следует отметить, что совпадение спектров красителей имеет приоритет перед временем миграции и является определяющим при установлении вида красителя в образце. В случае несовпадения времени миграции, но тождественности спектров, пик принимают за соответствующий краситель.

Концентрацию красителя в пробе определяют согласно градуировочному графику.

Массовую долю (содержание) соответствующих красителей X, млн$^{-1}$ (мг/кг), в исследуемом образце вычисляют по формуле

$$X = \frac{CV1000}{m} = \frac{C100 \cdot 1000}{m}, \quad (19)$$

где C — массовая доля красителя, найденная по градуировочной таблице или с помощью внешнего стандарта, мг/см^3;

V — объем мерной колбы, см^3; V = 100 см^3;

1000 — коэффициент пересчета;

m — масса пробы (см. 8.4), г.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение $X_{ср}$, млн$^{-1}$ (мг/кг), двух параллельных определений массовой концентрации красителя, полученных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$(X_1 - X_2) \cdot 100/X_{ср} \le r, \quad (20)$$

где X_1, X_2 — результаты двух параллельных измерений массовой доли (содержания) красителя в образце, млн$^{-1}$ (мг/кг);

$X_{ср}$ — среднее значение двух параллельных измерений массовой доли (содержания) красителя в пробе, млн$^{-1}$ (мг/кг);

r — значение предела повторяемости, %.

Результаты анализа представляют в виде:

$$(X_{ср} \pm \Delta) \text{ при } P = 0{,}95, \text{ млн}^{-1} \text{ (мг/кг)},$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение двух определений массовой доли (содержания) красителя в пробе, млн$^{-1}$ (мг/кг), признанных приемлемыми;

Δ — границы абсолютной погрешности определения, млн$^{-1}$ (мг/кг), при доверительной вероятности P = 0,95.

Границы абсолютной погрешности Δ вычисляют по формуле

$$\Delta = \delta X/100, \quad (21)$$

где δ — границы относительной погрешности измерения, %;

X — среднеарифметическое значение двух определений массовой доли (содержания) красителей в исследуемой пробе, млн$^{-1}$ (мг/кг).

Показатели прецизионности метода определены в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-2 и представлены в таблице 6.

Таблица 6

Предел повторяемости r, %, P = 0,95	Предел воспроизводимости R, %, P = 0,95	Границы относительной погрешности $\pm$ δ, %, при вероятности P = 0,95	Погрешность времени миграции $\pm$ $\delta_и$, %, при вероятности P = 0,95
10	12	15	5

Приложение А
(обязательное)

Стандартные красители и их характеристики

А.1 Стандартные красители и их характеристики приведены в таблице А.1.

Таблица А.1

Наименование стандартного красителя	Номер красителя*	Индекс пищевой добавки**	Содержание основного красящего вещества, %, не менее
Азокрасители			
Тартразин	CI 19140	E102	85
Желтый 2 G	CI 18965	E107	70
Желтый «Солнечный закат»	CI 15985	E110	85
Азорубин	CI 14720	E122	85
Амарант	CI 16185	E123	85
Понсо 4R	CI 16255	E124	85
Красный 2G	CI 18050	E128	80
Красный очаровательный AC	CI 16035	E129	80
Черный блестящий PN	CI 28440	E151	85
Триарилметановые красители			
Синий патентованный V	CI 42051	E131	85
Синий блестящий FCF	CI 42090	E133	85
Зеленый S	CI 44090	E142	80
Зеленый прочный FCF	CI 42053	E143	85
Ксантеновый краситель			
Эритрозин	CI 45430	E127	87
Индигоидный краситель			
Индигокармин	CI 73015	E132	85
Хинолиновый краситель			
Желтый хинолиновый	CI 47005	E104	70
* Номер красителя в соответствии с международным каталогом красителей Colour Index. ** Индекс красителя в соответствии с европейской кодификацией пищевых добавок.			

Приложение Б
(обязательное)

Определение массовой доли основного красящего вещества в стандартных красителях спектрофотометрическим методом

Метод предназначен для определения массовой доли основного красящего вещества в стандартных красителях.

Б.1 Сущность метода

Метод основан на определении массовой доли основного красящего вещества по интенсивности окраски полученного раствора методом спектрофотометрии при характеристической длине волны.

Б.2 Условия анализа

При подготовке и проведении анализа должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха — от 10 °С до 35 °С;
- атмосферное давление — от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт. ст.),
- относительная влажность воздуха — от 40 % до 95 %;
- напряжение в сети — $220^{+10\%}_{-15\%}$ В;
- частота тока в электросети — от 49 до 51 Гц.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией. Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

Б.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

Весы по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт, со значением СКО, не превышающим 0,03 мг, и погрешностью от нелинейности не более ± 0,06 мг.

Спектрофотометр диапазоном измерения в диапазоне длин волн от 210 до 700 нм, допустимой абсолютной погрешностью коэффициента пропускания не более 1 %, спектральной шириной не более 1 нм.

Кюветы кварцевые толщиной поглощающего слоя 1 см.

Пипетка градуированная по ГОСТ 29227 вместимостью 10 $см^3$, 1-го класса точности.

Колба мерная с пришлифованной пробкой по ГОСТ 1770 вместимостью 100 $см^3$, 1-го класса точности.

Стаканчик СВ-14/8 по ГОСТ 25336.

Стакан термостойкий по ГОСТ 25336 вместимостью 50 $см^3$.

Баня водяная.

Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919.

Силикагель по ГОСТ 3956.

Красители стандартные в соответствии с приложением А.

Шкаф сушильный диапазоном температур в рабочей камере от 40 °С до 200 °С и основной погрешностью стабилизации температуры ± 1 °С.

Эксикатор по ГОСТ 25336.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений, материалов и реактивов, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность анализа, а также реактивов по качеству не хуже вышеуказанных.

Б.4 Подготовка к анализу

Б.4.1 Подготовка стандартных красителей

В необходимое число стаканчиков типа СВ по ГОСТ 25336 взвешивают на весах образцы стандартных красителей массой от 0,2 до 0,5 г с записью результата взвешивания до четвертого десятичного знака и доводят до постоянной массы высушиванием при температуре 105 °С в сушильном шкафу. Образцы подготовленных стандартных красителей хранят в эксикаторе с силикагелем. Образцы стандартных красителей для приготовления растворов готовят не позднее чем за 1 ч до начала анализа.

Б.4.2 Приготовление КО стандартных красителей

В стакане по ГОСТ 25336 вместимостью 50 $см^3$ взвешивают на весах 0,01 г подготовленного по Б.4.1 стандартного красителя с записью результата взвешивания до четвертого десятичного знака. Растворяют образец в небольшом количестве растворителя в соответствии с таблицей 3 и количественно переносят в мерную колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 100 $см^3$. Доводят объем раствора в колбе до метки растворителем в соответствии с таблицей 3, закрывают колбу пробкой и тщательно перемешивают содержимое.

Примечание — Для интенсификации процесса растворения допускается нагревание стаканчика с растворенным красителем до температуры не более 90 °С.

Пипеткой отбирают 10 см^3 КО стандартного красителя и переносят в мерную колбу (с пришлифованной пробкой) вместимостью 100 см^3. Доводят объем раствора в колбе до метки растворителем, закрывают колбу пробкой и тщательно перемешивают.

Б.5 Проведение анализа

Приготовленный раствор дозируют пипеткой по ГОСТ 29227 в кювету спектрофотометра и измеряют оптическую плотность при длине волны, указанной в таблице 3, относительно оптической плотности растворителя.

Б.6 Обработка результатов

Массовую долю основного красящего вещества в стандартном красителе C, %, рассчитывают по формуле

$$C = \frac{AV_1V_3}{E^{1\%}_{1см}dmV_2} \quad (Б.1)$$

или

$$C = \frac{A \cdot 10^3}{E^{1\%}_{1см}m}, \quad (Б.2)$$

где A — оптическая плотность при характеристической длине волны;

V_1 — объем разведения, см^3 (V_1 = 100 см^3);

V_3 — объем разведения, см^3 (V_3 = 100 см^3);

$E^{1\%}_{1см}$ — удельный коэффициент светопоглощения в соответствии с таблицей 3, численно равный оптической плотности раствора с массовой долей красителя 1 % при толщине поглощающего слоя 1 см, %$^{-1}$ · см$^{-1}$;

d — толщина поглощающего слоя, см (d = 1 см);

m — масса стандартного красителя по Б.4.2, г;

V_2 — объем раствора красителя, взятого на разведение по Б.4.2, см^3 (V_2 = 10 см^3).

Вычисления проводят с записью результата до пятого десятичного знака.

Окончательный результат записывают с точностью до четвертого десятичного знака.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение $C_{ср}$, %, двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{C_{21} - C_{22}}{C_{ср}} 100 \le r, \quad (Б.3)$$

где C_{21}, C_{22} — результаты анализов двух параллельных измерений массовой доли красителя, %;

$C_{ср}$ — среднее значение двух параллельных измерений массовой доли красителя, %;

r — значение предела повторяемости, %, приведенное в таблице Б.1.

Результат анализа представляют в виде

$$C_{ср} \pm 0{,}01\delta\, C_{ср} \text{ при } P = 0{,}95, \quad (Б.4)$$

где $C_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух определений, при знанных приемлемыми, %;

δ — границы относительной погрешности измерений, %.

Пределы повторяемости r и воспроизводимости R, а также показатель точности δ измерений массовой доли красителя в карамели приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Диапазон измерений массовой доли красителя в карамели, %	Предел повторяемости r, % отн. при P = 0,95, n = 2	Предел воспроизводимости R, % отн. при P = 0,95, m = 2	Показатель точности (границы относительной погрешности) ± δ, %, при P = 0,95
0,0004—0,0015	10	15	10

Приложение В
(рекомендуемое)

Пример количественного определения Понсо 4R в смеси красителей с помощью видеоденситометра

В.1 Средства измерений и вспомогательное оборудование

Видеоденситометр, работающий в диапазоне длин волн от 400 до 800 нм, с чувствительностью по каждому измеряемому красителю в карамели не ниже 0,0012 %.

Детектор — черно-белая малогабаритная видеокамера с чувствительностью не хуже 0,02 лк, с ручной фокусировкой и ручной регулировкой диафрагмы.

Компьютер с операционной системой, совместимой с программным обеспечением сканера и специальным программным обеспечением по обработке тонкослойных хроматограмм.

Блок ввода изображения.

В.2 Приготовление реактивов

Приготовление реактивов — по 5.4 настоящего стандарта.

В.3 Подготовка к анализу

Подготовка к анализу — по 5.5 настоящего стандарта.

В.4 Проведение анализа

Проводят извлечение красителей из карамели по 5.5.2. Растворы КО смесевых стандартных красителей готовят по 5.6.2.

Предварительную идентификацию красителя проводят по 5.6.1.

Хроматографическое разделение смеси красителей, содержащей в качестве одного из компонентов Понсо 4R, в полученном по 5.5.2.4 растворе проводят по 5.6.3.

В.5 Обработка и оформление результатов измерений

В.5.1 С помощью видеоденситометра получают изображение (файл) хроматограммы по В.4.

В.5.2 Вводят файл с изображением хроматограммы в компьютерную программу.

В.5.3 Редактируют изображение средствами программы, устанавливая линии старта и границы элюента (рисунок В.1).

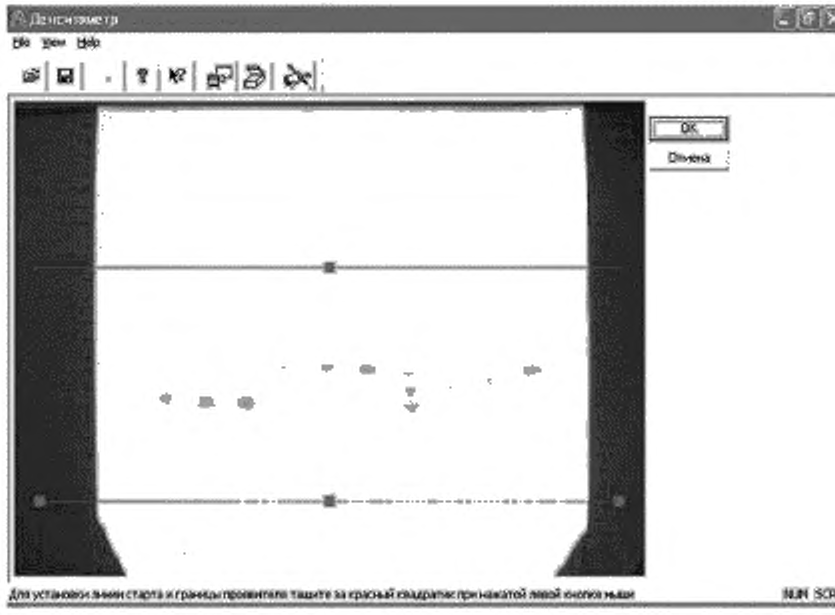

Рисунок В.1 — Указание линий старта и границы элюента

В.5.4 Проводят расчет значения R_f красителя понсо 4R.

В.5.5 Выделяют анализируемую область на изображении хроматограммы для последующей обработки (см. рисунок В.2).

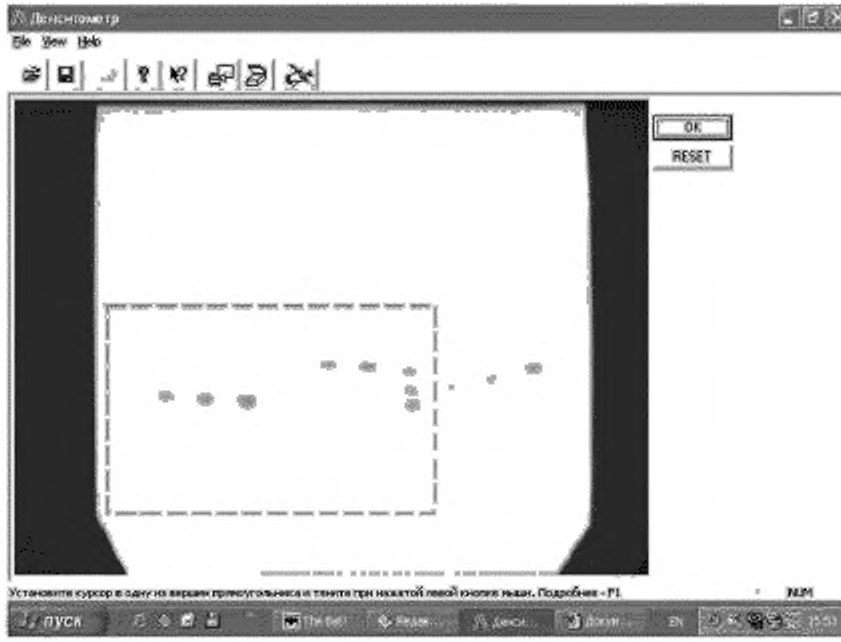

Рисунок В.2 — Выделение анализируемой области

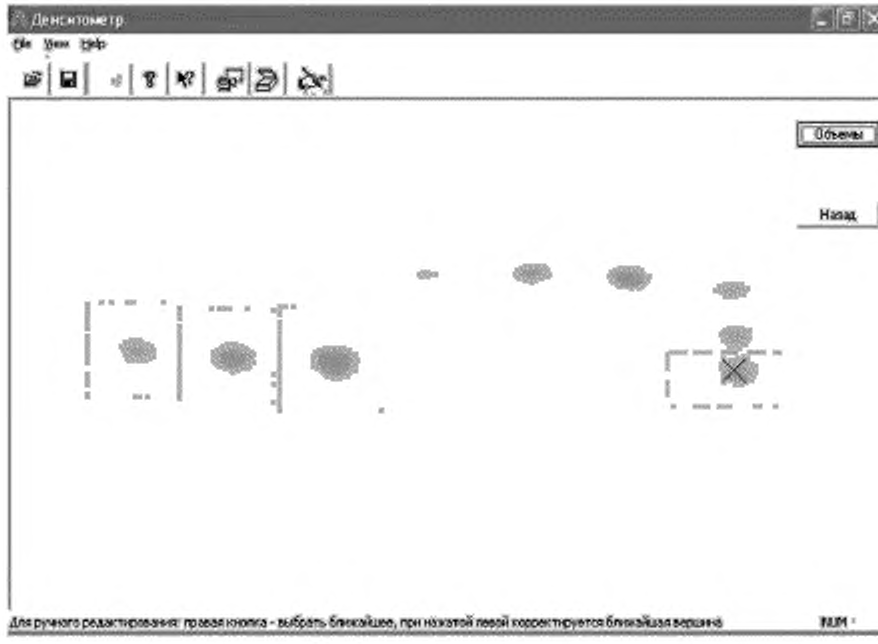

Рисунок В.3 — Выделение границ обрабатываемых пятен красителя понсо 4R

В.5.6 Выделяют на изображении хроматограммы границы обрабатываемых пятен красителя понсо 4R (см. рисунок В.3).

В.5.7 Проводят измерение пятен красителя в выделенных хроматографических зонах (см. рисунок В.4).

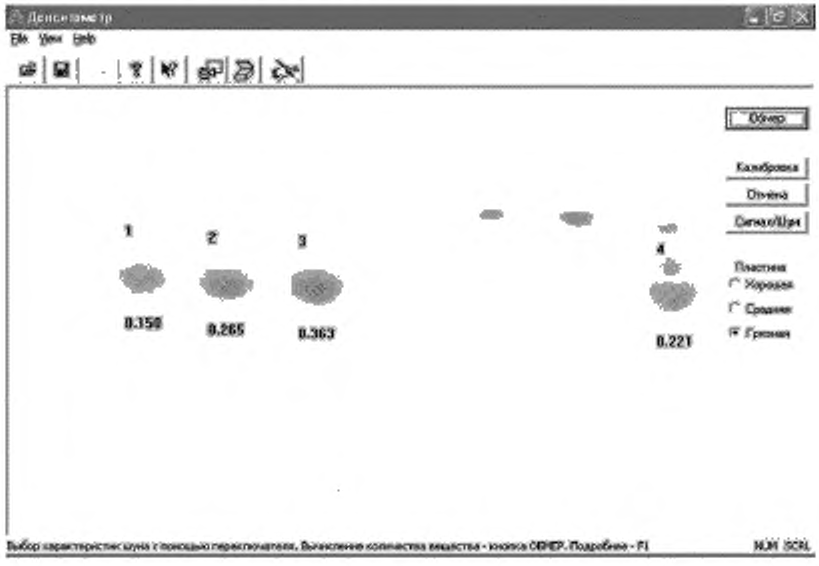

Рисунок В.4 — Измерение пятен красителя в выделенных хроматографических зонах

В.5.8 По полученным данным строят калибровочный график. Массу анализируемого красителя понсо 4R (мкг) в пятне определяют по калибровочному графику (см. рисунок В.5). Полученные данные представляют в виде отчета.

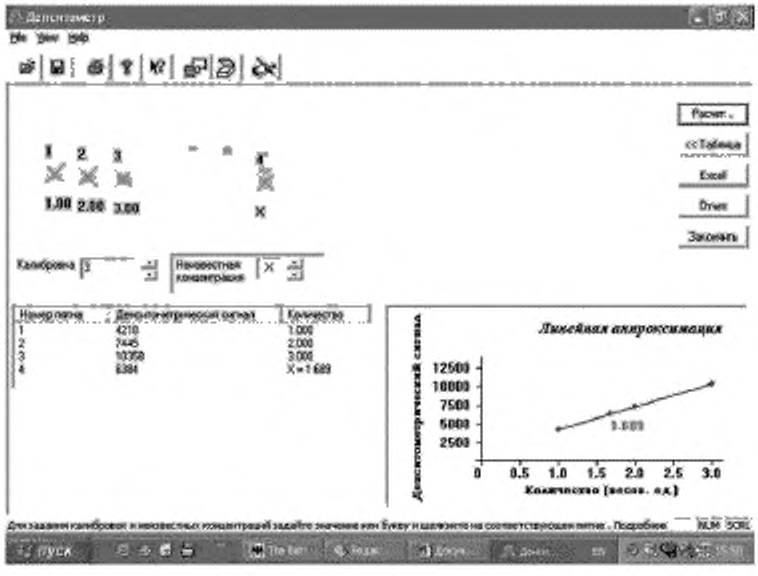

Рисунок В.5 — Построение калибровочного графика

В.5.9 Обработка результатов измерений — по 6.7.

УДК 663/664:667.28:006.354 МКС 67.180.10

Ключевые слова: пищевые продукты, карамель, синтетические красители, идентификация красителей, метод тонкослойной хроматографии, спектрофотометрический метод, денситометрический метод, метод капиллярного зонного электрофореза

Редактор *Л.М. Смирнов*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Ю.В. Демениной*

Сдано в набор 17.04.2014. Подписано в печать 13.05.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,85. Тираж 118 экз. Зак. 2031.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru