ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57029— 2016

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ, СПЕЦИИ, ПРЯНОСТИ, ПРОДУКТЫ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ К ПИЩЕ

Определение непищевых красителей Судан I, Судан II, Судан III, Судан IV и Пара Ред (Para Red)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 036 «Продукция пищевая специализированная»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 августа 2016 г. № 965-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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 (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019

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 3
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы 3
6 Отбор проб 4
7 Подготовка к проведению анализа 4
8 Условия проведения анализа 4
9 Проведение анализа 4
10 Оформление результатов 6
11 Требования безопасности 6
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм 7
Приложение Б (справочное) Примеры спектров красителей 8

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ, СПЕЦИИ, ПРЯНОСТИ, ПРОДУКТЫ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ К ПИЩЕ

Определение непищевых красителей Судан I, Судан II, Судан III, Судан IV и Пара Ред (Para Red)

Specialized food products, spices, processed products based on spices and biologically active supplement. Determination of non-food dyes Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV and Para Red

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые специализированные продукты, специи, пряности и продукты их переработки, а также на биологически активные добавки к пище (БАД) и другие пищевые продукты (в состав которых входят специи и пряности) и устанавливает метод качественного определения непищевых красителей Судан I, Судан II, Судан III, Судан IV и Пара Ред (Para Red) (далее — красители) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Предел обнаружения настоящего метода для указанных красителей составляет 0,5 млн$^{-1}$ (мг/кг).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие 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 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 8756.0 Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию

ГОСТ 9792 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 13341 Овощи сушеные. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб[1)]

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

ГОСТ 26313 Продукты переработки фруктов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

[1)] Действует ГОСТ 34125—2017 «Фрукты и овощи сушеные. Правила приемки, отбор и подготовка проб».

Издание официальное

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

ГОСТ 28498 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 28876 (ИСО 948—80) Пряности и приправы. Отбор проб

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

ГОСТ Р 52501 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

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

ГОСТ Р 55878 Спирт этиловый технический гидролизный ректификованный. Технические условия

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 заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **Судан I**: 1-фенилазо-бета-нафтол, нейтральный жирорастворимый синтетический краситель, практически нерастворимый в воде, хорошо растворимый в органических растворителях (хлороформе, ацетоне, эфире) и имеющий интенсивную желтую окраску.

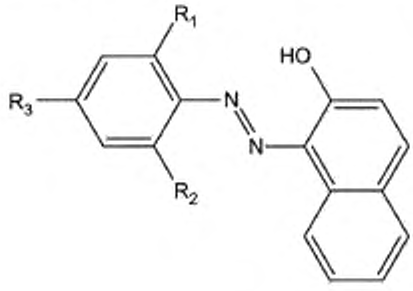
3.2 **Судан II**: 1-(о-ксилилазо)-бета-нафтол, нейтральный жирорастворимый синтетический краситель, практически нерастворимый в воде, хорошо растворимый в органических растворителях (хлороформе, ацетоне, эфире) и имеющий интенсивную оранжевую окраску.

3.3 **Судан III**: 1-[4-(фенилазо)фенилазо]-бета-нафтол, нейтральный жирорастворимый синтетический краситель, практически нерастворимый в воде, хорошо растворимый в органических растворителях (хлороформе, ацетоне, эфире) и имеющий интенсивную оранжево-красную окраску.

3.4 **Судан IV**: о-толилазо-о-толилазо-бета-нафтол, нейтральный жирорастворимый синтетический краситель, практически нерастворимый в воде, хорошо растворимый в органических растворителях (хлороформе, ацетоне, эфире) и имеющий интенсивную темно-красную окраску.

3.5 **Пара Ред (Para Red)**: 1-(4-нитрофенилазо)-бета-нафтол, нейтральный жирорастворимый синтетический краситель, практически нерастворимый в воде, хорошо растворимый в органических растворителях (хлороформе, ацетоне, эфире) и имеющий интенсивную темно-красную окраску.

Структурная формула красителей приведена на рисунке 1.



	R_1	R_2	R_3
Судан I	H	H	H
Судан II	H	CH_3	H
Судан III	H	H	фенил-N=N-
Судан IV	CH_3	H	о-CH_3-фенил-N=N-
Пара Ред (Para Red)	H	H	NO_2

Рисунок 1 — Структурная формула красителей

4 Сущность метода

Метод основан на экстракции непищевых красителей ацетоном с их последующим определением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с диодно-матричным детектированием (при длине волны 504 нм).

В качестве контрольного метода используют метод ВЭЖХ с масс-детектированием (по молекулярным и дочерним ионам).

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

Хроматограф жидкостный, оснащенный насосом высокого давления, инжектором для ручного или автоматического ввода проб, диодно-матричным детектором, позволяющим проводить измерения оптической плотности при длине волны 504 нм, масс-спектрометрическим детектором и программным обеспечением для сбора и обработки хроматографических данных.

Масс-детектор типа «ионная ловушка», оснащенный источником ионизации типа «электроспрей».

Колонка хроматографическая длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, сорбент — силикагель с привитыми группами С18 с размером частиц 5 мкм.

Баня ультразвуковая лабораторная рабочим объемом не менее 1000 $см^3$.

Емкости для жидких проб (виалы) с завинчивающимися крышками вместимостью 2,0 $см^3$.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228 специального класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,0005 г.

Установка для вакуумного фильтрования и дегазирования подвижной фазы.

pH-метр с погрешностью измерения не более ± 0,05 ед. pH, в диапазоне измерения pH от 4 до 9 ед. pH.

Центрифуга настольная с относительным ускорением 5400 g, снабженная адаптерами для пробирок вместимостью 15 $см^3$.

Пробирки полимерные центрифужные конические с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 $см^3$.

Стаканы лабораторные В-1-50, В-1-100 и В-1-1000 по ГОСТ 25336.

Мембранный фильтр из нейлона с диаметром пор 0,45 мкм.

Шприцы медицинские вместимостью 5 $см^3$ с разъемом типа Luer-Lock.

Фильтры мембранные одноразовые политетрафторэтиленовые с насадкой для шприца с диаметром пор 0,45 мкм.

Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

Пипетки 2-1-2-1 или 1-1-2-1, 2-1-2-10 или 2-2-2-10 или 3-2-2-10 по ГОСТ 29227.

Термометры жидкостные стеклянные по ГОСТ 28498 с диапазоном измеряемых температур 0–100 °С и ценой деления 1 °С.

Флаконы стеклянные с завинчивающейся крышкой объемом 20 $см^3$.

Колбы мерные 1-50-2, 1-100-2 по ГОСТ 1770.

Вода для лабораторного анализа по ГОСТ Р 52501, первой степени чистоты.

Ацетонитрил для жидкостной хроматографии с коэффициентом пропускания на 220 нм не менее 95 % или выше (относительно дистиллированной воды), массовая доля воды — не более 0,03 %.

Кислота трифторуксусная с массовой долей основного вещества не менее 99,8 %.

Ацетон по ГОСТ 2603, х. ч.

Спирт этиловый ректификованный (этанол) по ГОСТ Р 55878.

Стандартные вещества красителей:

- Судан I (CAS[1)] 842-07-9) с содержанием основного вещества не менее 90 %;
- Судан II (CAS[1)] 3118-97-6) с содержанием основного вещества не менее 90 %,
- Судан III (CAS[1)] 85-86-9) с содержанием основного вещества не менее 90 %;
- Судан IV (CAS[1)] 85-83-6) с содержанием основного вещества не менее 90 %;
- Пара Ред (Para Red) (CAS[1)] 6410-10-2) с содержанием основного вещества не менее 90 %.

Допускается применение других средств измерения и вспомогательного оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных, а также реактивов и материалов не ниже указанной степени чистоты и по качеству не ниже указанных.

[1)] Идентификатор химического соединения в реестре химической реферативной службы (Chemical Abstracts Service, CAS).

6 Отбор проб

Отбор проб продовольственного сырья и пищевых продуктов проводят по ГОСТ 9792, ГОСТ 26313, ГОСТ 13341, ГОСТ 28876, ГОСТ 8756.0.

7 Подготовка к проведению анализа

7.1 Подготовка проб

Пробу массой 1,000 г помещают во флакон вместимостью 20 $см^3$ с завинчивающейся крышкой, добавляют 10 $см^3$ ацетона, интенсивно встряхивают в течение 2 мин и выдерживают на ультразвуковой бане в течение 5 мин. Затем образец снова встряхивают и центрифугируют с относительным ускорением 5400 g. После центрифугирования надосадочную жидкость отбирают и фильтруют с помощью шприца в виалу через политетрафторэтиленовый (ПТФЭ) фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

7.2 Подготовка исходных и рабочих растворов

(0,0200 ± 0,0005) г чистого вещества помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 30 $см^3$ этанола, интенсивно встряхивают, при необходимости выдерживают на ультразвуковой бане до полного растворения вещества. После этого объем доводят до метки этанолом. Полученный раствор содержит вещество в концентрации 0,2 $мг/см^3$.

В мерную колбу на 50 $см^3$ помещают по 1,25 $см^3$ каждого основного раствора и доводят объем до метки 95 % этанолом. Раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный раствор содержит каждое вещество в концентрации 5 $мкг/см^3$.

В мерную колбу на 50 $см^3$ помещают 0,5 $см^3$ раствора с концентрациями 4 $мкг/см^3$ и доводят объем до метки 95 % этанолом. Полученный раствор содержит каждое вещество в концентрации 0,05 $мкг/см^3$.

Приготовленные растворы хранят в прохладном месте в течение 1 мес.

7.3 Приготовление подвижной фазы

Фаза А — ацетонитрил для жидкостной хроматографии. Срок и условия хранения — в соответствии с инструкцией изготовителя.

Примечание — Если в процессе хранения в реактив попадает воздух, то ацетонитрил предварительно дегазируют под вакуумом.

Приготовление фазы Б: при постоянном перемешивании добавляют в воду по каплям трифторуксусную кислоту до значения pH = 2,4 ед. pH, регистрируя показания pH-метра, и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Подвижную фазу Б хранят в холодильнике при температуре 2—8 °С не более 3 мес. Перед началом анализа фаза Б доводится до температуры помещения.

8 Условия проведения анализа

При подготовке к проведению анализа и проведении анализа соблюдают следующие условия:

температура окружающего воздуха ..... (20 ± 5) °С;
атмосферное давление..... (97 ± 10) кПа;
относительная влажность.....не более 80 %;
напряжение в питающей сети..... (220 ± 20) В;
частота тока в питающей сети..... (50 ± 1) Гц.

При проведении определения принимают во внимание, что красители чувствительны к световому и тепловому воздействиям. Определение проводят в месте, защищенном от действия прямого солнечного или ультрафиолетового излучения.

9 Проведение анализа

9.1.1 Подготовка хроматографа к работе

Включение и подготовку хроматографа к работе, вывод его на режим и выключение по окончании работы выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации.

Перед проведением измерений хроматографическую систему кондиционируют подвижной фазой до установления стабильной базовой линии и давления в системе.

9.1.2 Условия проведения хроматографического анализа

Хроматографические измерения проводят при следующих условиях:

- температура термостата колонки: (20 ± 5) °С;
- объем вводимой пробы — 0,005—0,02 см^3;
- скорость потока подвижной фазы 1,0 см^3/мин;
- режим элюирования — в условиях градиента подвижной фазы.

Параметры градиентного элюирования (в условиях градиента подвижной фазы) приведены в таблице 1.

Таблица 1

Время, мин	Содержание фазы А в общем элюенте (композиция фаз А и Б), %
0 (начало анализа)	80
10	98
20	98
21	80

Регенерация колонки занимает не менее 9 мин. Общее время хроматографического анализа, проведенного при данной программе элюирования, составляет 30 мин.

Параметры работы диодно-матричного детектора:

- аналитическая длина волны: (504 ± 4) нм,
- диапазон регистрации спектра: 200—700 нм;
- скорость опроса детектора: 2,5 Гц;
- ширина оптической щели: 4 нм.

9.1.3 Проверка хроматографической системы

При дозировании 5 мм^3 раствора смеси с массовыми концентрациями непищевых красителей (приготовленного по 7.2) на уровне 5 мкг/см^3 хроматографические параметры (за исключением времени удерживания) должны быть не меньше представленных в таблице 2. При дозировании 20 мм^3 раствора с массовыми концентрациями непищевых красителей на уровне 0,05 мкг/см^3 соотношения сигнал/шум должны быть не менее 3/1.

Порядок выхода и хроматографические параметры непищевых красителей Судан I–IV и Para Red приведены в таблице 2.

Таблица 2

Наименование	Ориентировочное время удерживания, мин	Число теоретических тарелок	Фактор симметричности	Разрешение
Para Red	6,2	20000	0,8	—
Судан I	7,5	20000	0,8	6
Судан II	10,9	30000	0,8	15
Судан III	12,9	40000	0,8	8
Судан IV	15,5	30000	0,8	13

Пример хроматограммы смеси стандартов Судан I–IV и Para Red представлен в приложении А.

9.2 Анализ проб

9.2.1 Качественное определение красителей с применением спектрального детектирования

В инжектор хроматографа вводят 20 мм^3 раствора пробы по 7.1 и проводят анализ в условиях, указанных в 9.1.2.

Идентификацию красителей на хроматограмме пробы осуществляют путем сравнения с временами удерживания и спектрами на хроматограмме красителей, полученной в 9.1.3 (порядок выхода красителей при анализе рабочих растворов должен соответствовать описанному в приложении А, примеры спектров красителей приведены в приложении Б). В случае обнаружения непищевых красителей в пробе проводят подтверждающий анализ методом хромато-масс-спектрометрии (по молекулярным массам непищевых красителей и их дочерних ионов) согласно таблице 3.

Таблица 3 — Параметры масс-детектирования

Наименование красителя	Молекулярные ионы, *m/z*	Энергия разрушения, эВ	Основные дочерние ионы, *m/z*		
Para Red	294 (M+H(+))	0,9	277	156	—
Судан I	249 (M+H(+))	1,0	232	156	—
Судан II	277 (M+H(+))	1,2	260	156	120
Судан III	352 (M+H(+))	1,2	197	336	156
Судан IV	382 (M+H(+))	1,2	224	364	156

Примечание — Идентификация красителей Судан I–IV и Para Red только по времени удерживания не будет являться достоверной ввиду сложного состава исследуемых объектов и наличия в анализируемых продуктах природных компонентов, обладающих сходными спектральными характеристиками и хроматографическим поведением.

9.2.2 Подтверждающий анализ методом хромато-масс-спектрометрии

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводят в условиях хроматографирования по 9.1.2 с параметрами работы масс-детектора по 9.2, используется масс-спектрометрический детектор типа ионная ловушка с ионизацией электроспреем (*ESI*).

В таблице 3 приведены основные параметры масс-детектирования (массы молекулярных ионов, энергия разрушения (параметр является рекомендательным, поскольку может зависеть от модели детектора), масса основных дочерних ионов). При регистрации хроматографических пиков (с соотношением сигнал/шум более 3) в данных условиях с временами удерживания, совпадающими с временами удерживания красителей, результат анализа является положительным.

10 Оформление результатов

Результат определения присутствия непищевых красителей в анализируемом продукте представляют в документах в виде

«Обнаружено присутствие непищевого красителя.....(наименование пищевого красителя)».

11 Требования безопасности

11.1 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.

11.2 Требования к оператору

Работу по указанной методике могут исполнять специалисты, обладающие необходимыми специальными навыками и познаниями в области хроматомасс-спектрометрии и аналитической химии.

Приложение А
(справочное)

Примеры хроматограмм

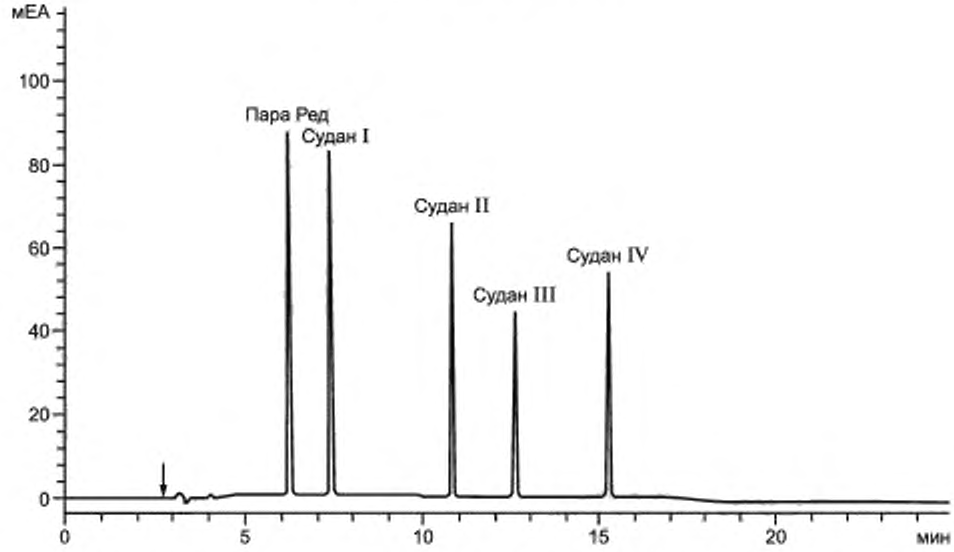


Рисунок А.1 — Пример хроматограммы смеси стандартов Судан I–IV и Пара Ред

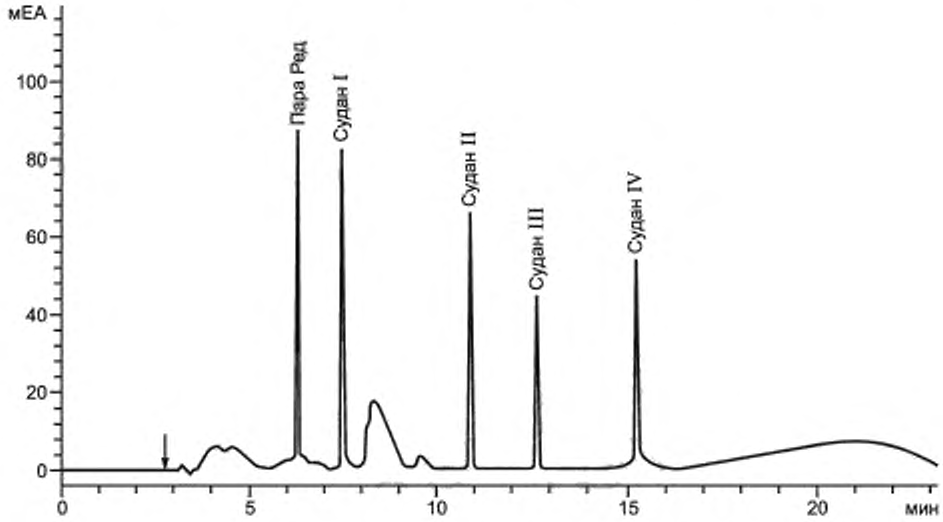


Рисунок А.2 — Пример хроматограммы пробы паприки
с добавлением стандартных растворов Судан I–IV и Пара Ред

Приложение Б
(справочное)

Примеры спектров красителей

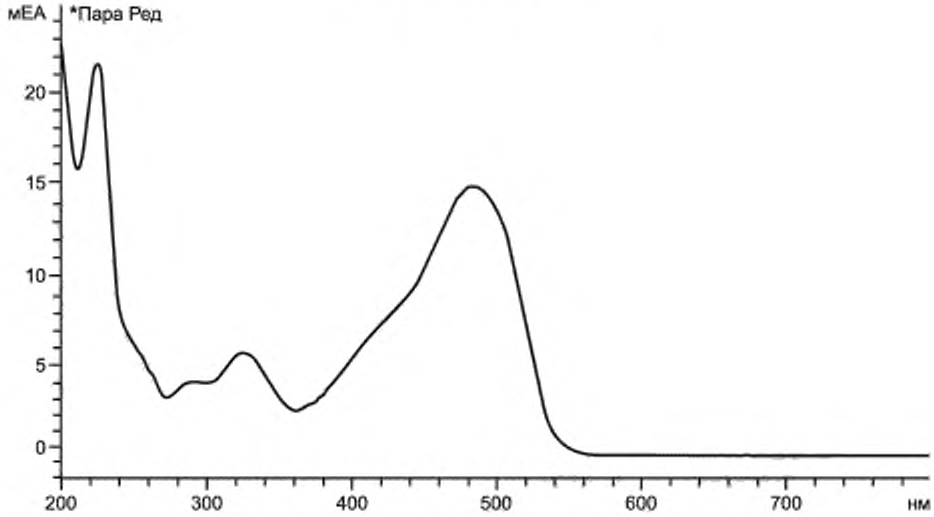


Рисунок Б.1 — УФ-видимый спектр красителя Пара Ред (Para Red)

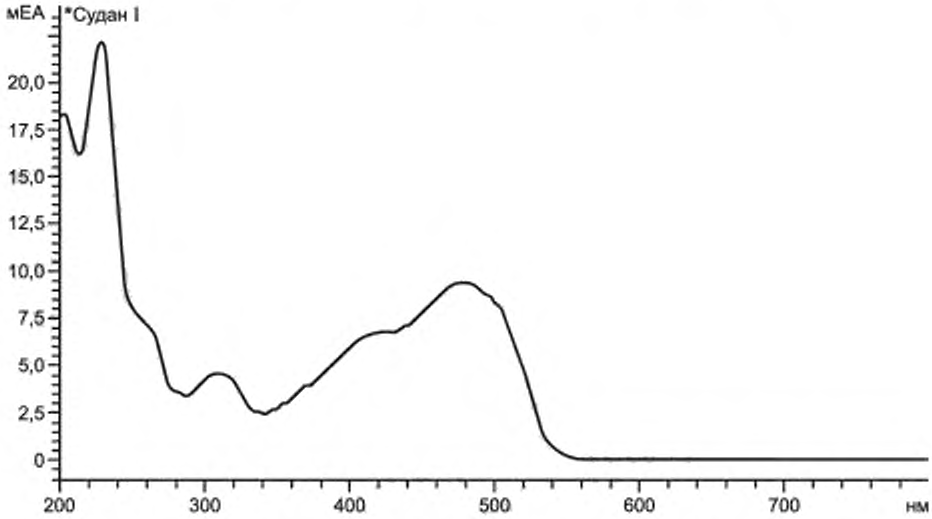


Рисунок Б.2 — УФ-видимый спектр красителя Судан I

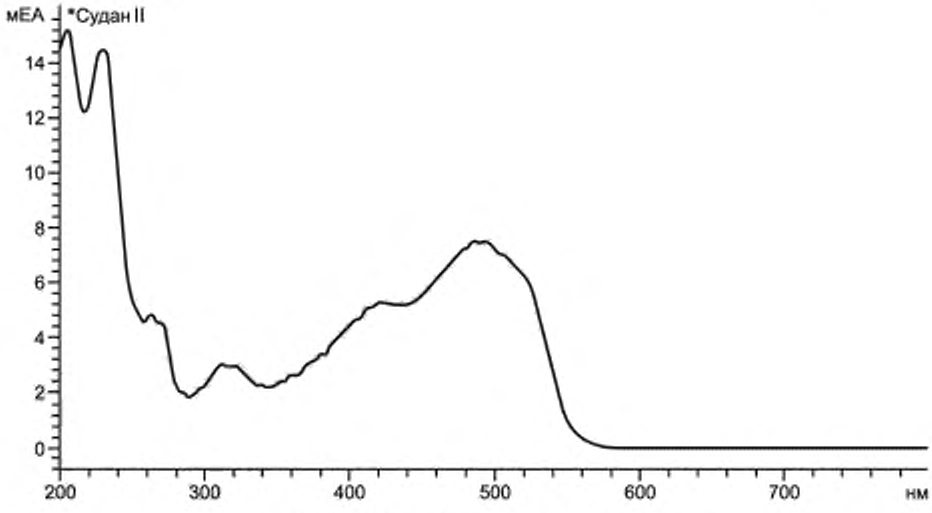


Рисунок Б.3 — УФ-видимый спектр красителя Судан II

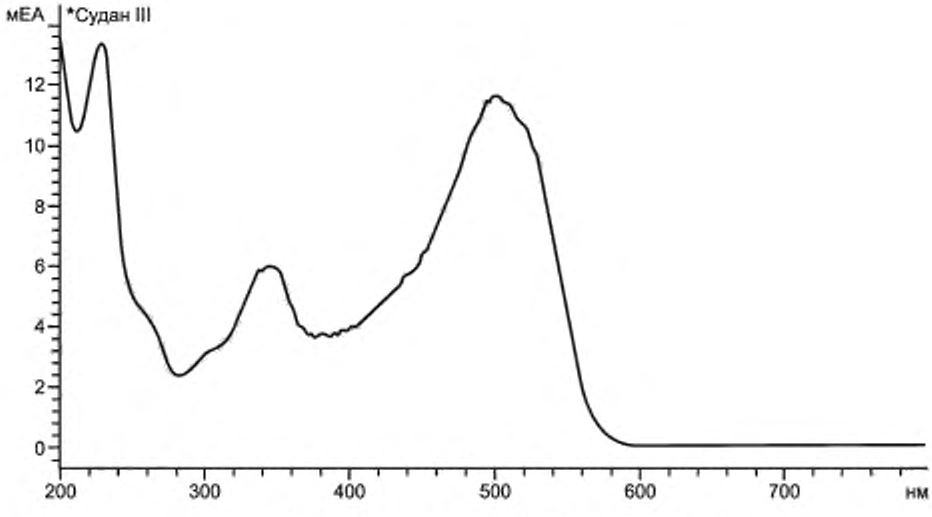


Рисунок Б.4 — УФ-видимый спектр красителя Судан III

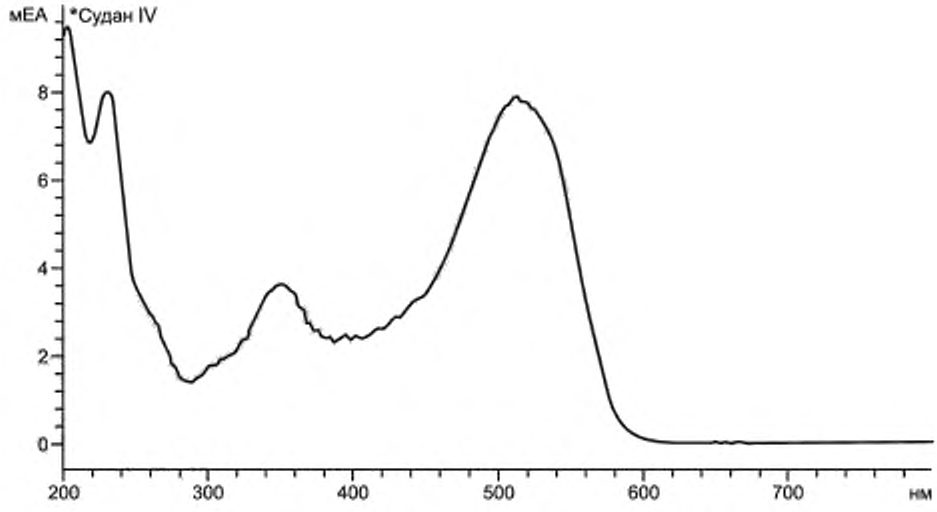


Рисунок Б.5 — УФ-видимый спектр красителя Судан IV

УДК 664:543.061/064:006.354 ОКС 67.020

Ключевые слова: продукты пищевые, пряности, специи, непищевые красители, Пара Ред, Судан I, Судан II, Судан III, Судан IV, жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, хроматограмма, УФ-видимый спектр

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 05.11.2019. Подписано в печать 14.11.2019. Формат 60×84 1/8 Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,30.
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.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru