СТБ 1181-99

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВ И ОВОЩЕЙ

Методики определения содержания сорбиновой и бензойной кислот при их совместном присутствии спектрофотометрическим и хроматографическим методами

ПРАДУКТЫ ПЕРАПРАЦОЎКІ ПЛАДОЎ І АГАРОДНІНЫ

Методыкі вызначэння сарбінавай і бензойнай кіслот пры іх сумеснай прысутнасці спектрафатаметрычным і храматаграфічным метадамі

Издание официальное

Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 664.841/851.543:006.354 Н59

Ключевые слова: сорбиновая кислота, бензойная кислота, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография

ОКС 19.020; 67.080.01

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Научно-исследовательским государственным предприятием "Стандартплодоовощ", Республиканским научно-практическим центром по экспертной оценке качества и безопасности продуктов питания (РНПЦ по ЭОК и БПП)

ВНЕСЕН Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 30 декабря 1999 г. № 28

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Отбор и подготовка проб 2
4 Методика определения спектрофотометрическим методом (полуколичественный метод) 2
5 Методика высокоэффективной жидкостной хроматографии 4
6 Методика тонкослойной хроматографии 8
7 Требования безопасности 12
Приложение А Библиография 13

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВ И ОВОЩЕЙ

Методики определения содержания сорбиновой и бензойной кислот при их совместном присутствии спектрофотометрическим и хроматографическим методами

ПРАДУКТЫ ПЕРАПРАЦОЎКІ ПЛАДОЎ І АГАРОДНІНЫ

Методыкі вызначэння сарбінавай і бензойнай кіслот пры іх сумеснай прысутнасці спектрафатаметрычным і храматаграфічным метадамі

FRUIT AND VEGETABLE PRODUCTS

Methodics for determination of sorbic and benzoic acids, simultaneously contained in the product

Дата введения 2000-03-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продукты переработки плодов и овощей и устанавливает методики определения содержания сорбиновой и бензойной кислот при их совместном присутствии спектрофотометрическим и хроматографическим методами.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.4.021. ССБТ. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 61-75 Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4166-76 Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4204-77 Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4233-77 Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4523-75 Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 5556-81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5848-73 Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6709- 72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 10521-78 Кислота бензойная. Технические условия

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13830-91 Соль поваренная пищевая. Общие технические условия

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

ГОСТ 20490 -75 Калий марганцевокислый. Технические условия

ГОСТ 21400-75 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 22261-94 Средства измерений электрических и магнитных величин. Общие технические условия

Издание официальное

ГОСТ 22300-76 Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия

ГОСТ 24104-88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

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

ГОСТ 26313-84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ 26671-85 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

ГОСТ 28366-89 Реактивы. Метод тонкослойной хроматографии

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

ГОСТ 29251-91 (ИСО 385-1-84) Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования

3 Отбор и подготовка проб

Отбор проб – по ГОСТ 26313, подготовка их к испытаниям – по ГОСТ 26671.

4 Методика определения спектрофотометрическим методом (полуколичественный метод)

4.1 Сущность методики

Методика основана на отгонке сорбиновой и бензойной кислот из продукта водяным паром и спектрофотометрическом определении их в отгоне при длинах волн 225 и 255 нм.

Методика применима в диапазоне определяемых концентраций, млн$^{-1}$:

– бензойная кислота 100 – 2000;

– сорбиновая кислота 40 – 1000.

Суммарная погрешность методики Δ, %:

– для бензойной кислоты – 15;

– для сорбиновой кислоты – 18.

4.2 Аппаратура, материалы и реактивы

Спектрофотометр с диапазоном измерения, позволяющим проводить измерения оптической плотности раствора при длинах волн 225 и 255 нм, с допускаемой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1%, с допускаемой погрешностью отсчетного устройства установки длин волн не более 0,5 нм, снабженный кварцевыми кюветами с рабочей длиной 10 мм.

Весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками с наибольшим пределом взвешивания до 200 г, не ниже 3-го класса точности по ГОСТ 24104.

Установка для перегонки (рисунок 1), состоящая из:

– сосуда для перегонки;

– колбы круглодонной типа КГУ-2 с взаимозаменяемым конусом и конусом центральной горловины 29/32, вместимостью 1000 или 2000 см^3 по ГОСТ 25336;

– дефлегматора типа ВД-2 с взаимозаменяемыми конусами муфты 19/26 и керна 19/26, высотой наколов 300 мм по ГОСТ 25336;

– каплеуловителя типа КО-19/26-100 по ГОСТ 25336;

– холодильника типа ХШ, ХСН или ХСВ с длиной кожуха 300 мм по ГОСТ 25336;

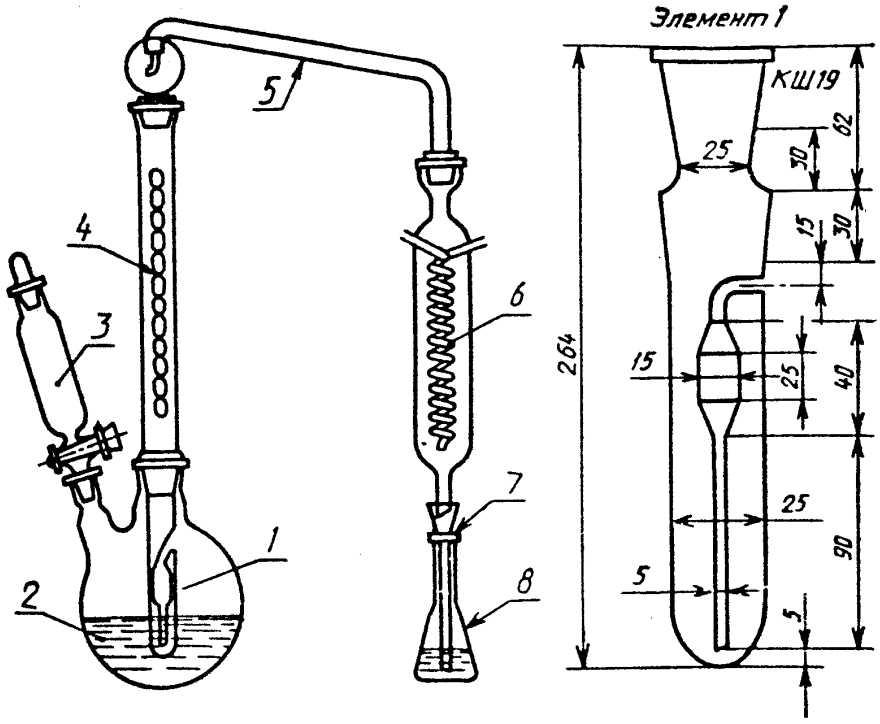
– воронки стеклянной с удлиненным концом и вложенным слоем ваты и воронки типа ВД-2 с взаимозаменяемым конусом 14/23, вместимостью 50 см^3 по ГОСТ 25336;

– колбы приемной – колбы мерной вместимостью 100 см^3 по ГОСТ 1770.

Колба мерная вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 1770.

Пипетка исполнения 2 или 3, вместимостью 20 см^3 по ГОСТ 29227.

Бюретка исполнения 1, 2 или 3, вместимостью 25 см^3 по ГОСТ 29251.



1 – сосуд для перегонки, 2 – колба двугорлая, 3 – делительная воронка с краном, 4 – дефлегматор, 5 – каплеуловитель, 6 – холодильник, 7 – стеклянная воронка, 8 – мерная колба

Рисунок 1 – **Установка для перегонки**

Кусочки фарфора или стеклянные шарики.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Соль поваренная пищевая по ГОСТ 13830, ч., раствор с массовой концентрацией 250 г/дм^3.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, х.ч., раствор с массовой долей 20% и раствор с концентрацией 0,1 моль/дм^3.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х.ч., раствор с массовой концентрацией 49 г/дм^3.

Магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523, ч.д.а.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч.д.а., титрованный раствор с концентрацией 0,1 моль/дм^3 и раствор с массовой долей 4%.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается использование другой аппаратуры, материалов и реактивов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

4.3 Подготовка к измерению

4.3.1 Установку для перегонки собирают в соответствии с рисунком 1. При сборке установки смазка шлифов не допускается.

4.3.2 Режим нагревания регулируют так, чтобы установка обеспечивала получение 100 см^3 отгона за (15 ± 3) мин.

4.3.3 Герметичность установки проверяют периодически, но не реже одного раза в квартал следующим образом: в сосуд для перегонки вносят пипеткой 20 см^3 раствора уксусной кислоты с (CH_3COOH) = 0,1 моль/дм^3, наполняют двугорлую колбу на 3/4 объема раствором хлористого натрия

и далее осуществляют отгонку, как указано в п.4.4.1. После получения 100 см^3 отгона определяют путем титрования раствором гидроокиси натрия содержание в нем уксусной кислоты, которое должно быть не менее 95% внесенного количества.

4.3.4 Допускается применение других установок, отвечающих требованиям 4.3.1 – 4.3.3.

4.4 Проведение измерения

4.4.1 В сосуд для перегонки помещают навеску продукта массой от 5,00 до 10,00 г с допускаемым отклонением ± 0,005 г, добавляют 10 см^3 раствора серной кислоты и 10,00 г с допускаемым отклонением ± 0,005 г сернокислого магния. Отгонную колбу наполняют на 3/4 объема раствором хлористого натрия и начинают нагревать при открытом кране делительной воронки. Через несколько минут после закипания жидкости в отгонной колбе кран закрывают и начинают отгонку, регулируя нагревание колбы так, чтобы объем жидкости в сосуде для перегонки был постоянным и равным примерно 20 см^3. Перегонку заканчивают после получения 95 см^3 дистиллята.

4.4.2 Объем дистиллята доводят до 100 см^3 водой и измеряют оптическую плотность раствора при длинах волн (225±0,5) нм и (255±0,5) нм, используя в качестве контрольного раствора воду. Стремятся работать в середине интервала измерений прибора; в случае необходимости допускается разбавление раствора водой. Для разбавления в 2 раза отбирают пипеткой 50 см^3 раствора в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки водой (коэффициент разбавления $k = 2$), для разбавления в 5 раз отбирают пипеткой 20 см^3 раствора в мерную колбу на 100 см^3 и доводят до метки водой (коэффициент разбавления $k = 5$).

4.5 Обработка результатов

Массовую долю сорбиновой X_1 и бензойной кислот X_2 в млн $^{-1}$ вычисляют по формулам:

$$\frac{X_1 = (489\ D_{255} - 37{,}8\ D_{225})\ V \times k \times 10^{-2}}{M}; \quad (1)$$

$$\frac{X_2 = (1451\ D_{225} - 379\ D_{255})\ V \times k \times 10^{-2}}{M}, \quad (2)$$

где D_{255}, D_{225} – оптическая плотность раствора при длинах волн 255 нм и 225 нм;

V – объем раствора, 100 см^3;

M – масса навески продукта, г;

k – коэффициент разбавления раствора;

489; 37,8; 1451; 379 – расчетные коэффициенты, г/дм^3.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемое относительное расхождение между которыми не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому при доверительной вероятности $P = 0{,}95$.

Результат выражают целым числом.

5 Методика высокоэффективной жидкостной хроматографии

5.1 Сущность методики

Методика основана на извлечении бензойной и сорбиновой кислот из продукта водой с последующим анализом аликвотной части водного раствора методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в режиме изократического разделения на колонке с обращенной фазой ОДС (C_{18}) с использованием ультрафиолетового или диодно-матричного детектора [1].

Методика применима в диапазоне определяемых концентраций, млн$^{-1}$:

– бензойная кислота – от 20 до 1600 (в соках, напитках);

– от 50 до 4000 (в соусах, кетчупах);

– сорбиновая кислота – от 5 до 400 (в джемах, соках, напитках);

– от 12,5 до 1000 (в кетчупах, соусах).

Относительная погрешность методики Δ, %:
– для бензойной кислоты – 19;
– для сорбиновой кислоты – 21,5.

5.2 Аппаратура, материалы и реактивы

Жидкостный хроматограф фирмы "Hewlett Packard", модель HP 1100, или фирмы "Beckman", с ультрафиолетовым или диодно-матричным детектором.

Весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания до 200 г, не ниже 2-го класса точности.

Микрошприцы для жидкостной хроматографии на 0,05 $см^3$.

Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2, 2-200-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Стаканы химические по ГОСТ 25336.

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

Воронки делительные вместимостью 500,0 $см^3$ по ГОСТ 25336-82.

Цилиндры мерные по ГОСТ 1770.

Колонка хроматографическая размером 125х4 мм, зернение частиц 5 мкм, фирмы Hypersil ODS (C_{18}).

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Иономер по ГОСТ 22261.

Электрод стеклянный по НД [2].

Фильтр стеклянный пористый Пор 16 по ГОСТ 25336.

Бензойная кислота, фирмы Merk, 99,5 % чистоты.

Сорбиновая кислота, фирмы Merk, 99,5 % чистоты.

Натрий уксуснокислый двухводный, о.с.ч. по НД [3], раствор с концентрацией 0,02 $моль/дм^3$.

Кислота уксусная, х.ч. по ГОСТ 61.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Ацетонитрил, ч., по НД [4].

Калий марганцевокислый, ч., по ГОСТ 20490.

Допускается использование другой аппаратуры, материалов и реактивов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:
– температура воздуха (20 ± 5) °С;
– атмосферное давление 84,0 – 106,7 кПа;
– влажность воздуха – не более 80% при температуре 25 °С;
– напряжение питающей сети – (220 ± 22) В;
– частота переменного тока – (50 ± 1) Гц.

5.3 Подготовка к измерению

5.3.1 Приготовление растворов

5.3.1.1 Приготовление подвижной фазы (элюента)

Взвешивают (2,36 ± 0,005) г уксуснокислого натрия, растворяют в 970 – 980 $см^3$ воды в мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$, устанавливают pH 4,3 – 4,4, используя уксусную кислоту, и доводят раствор до метки водой. Полученный раствор фильтруют через стеклянный пористый фильтр.

Полученный раствор используют для приготовления подвижной фазы (элюента), состоящего из раствора ацетата натрия pH 4,3 – 4,4 и ацетонитрила в соотношении 85:15 по объему.

Ацетонитрил специальной марки "для ВЭЖХ", используемый для приготовления элюента, не подвергается предварительной обработке.

Ацетонитрил марки "ч" предварительно обрабатывают. Для этого в перегонную колбу вместимостью 2 $дм^3$ помещают 1,5 $дм^3$ ацетонитрила и (30,00 ± 0,005) г калия марганцевокислого, кипятят с обратным холодильником 1 ч и перегоняют с дефлегматором, отбирая фракции по 200 $см^3$. Первую фракцию отбрасывают, остальные собирают. Перегонку прекращают, когда в колбе останется 200 $см^3$ раствора.

5.3.1.2 Приготовление основных растворов бензойной и сорбиновой кислот

5.3.1.2.1 Приготовление основного раствора бензойной кислоты концентрацией 100 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят (0,01 ± 0,00015) г бензойной кислоты, добавляют небольшое количество воды и после растворения бензойной кислоты доводят объем до метки водой. Срок годности раствора при хранении в холодильнике 10 сут.

5.3.1.2.2 Приготовление основного раствора сорбиновой кислоты концентрацией 50 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят (0,005 ± 0,00015) г сорбиновой кислоты, добавляют небольшое количество воды и после растворения сорбиновой кислоты доводят объем до метки водой. Срок годности раствора при хранении в холодильнике 10 сут.

5.3.1.3 Приготовление градуировочных растворов бензойной и сорбиновой кислот в соответствии с таблицей 1

Отбирают аликвотные части основных растворов бензойной и сорбиновой кислот, сливают в мерные колбы вместимостью 100 см^3 и доводят водой до метки.

Таблица 1

Номер градуировочного раствора	Концентрация сорбиновой кислоты в градуировочном растворе, мкг/см^3	Аликвотная часть стандартного раствора сорбиновой кислоты, см^3	Концентрация бензойной кислоты в градуировочном растворе, мкг/см^3	Аликвотная часть стандартного раствора бензойной кислоты, см^3
Раствор № 1	0,25	0,5	1,0	1,0
Раствор № 2	1,0	2,0	2,0	2,0
Раствор № 3	2,0	4,0	4,0	4,0
Раствор № 4	5,0	10,0	8,0	8,0
Раствор № 5	10,0	20,0	10,0	10,0
Раствор № 6	15,0	30,0	15,0	15,0
Раствор № 7	20,0	40,0	20,0	20,0

5.3.2 Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для блока насосов и детектора. Проводят стабилизацию работы хроматографа на рабочих режимах в течение 20 – 30 мин. Условием стабильности является дрейф нулевого сигнала, не превышающий 1 – 2 % от шкалы регистрации сигнала (0,1 – 0,05 единиц оптической плотности), при чувствительности, соответствующей минимально определяемой концентрации.

5.3.3 Построение градуировочного графика

Градуировочный график для каждой кислоты строят по трем сериям растворов. Каждую серию растворов готовят и хроматографируют с интервалом в 1 день. Каждая серия состоит из семи градуировочных растворов различной концентрации в диапазоне от 1,0 до 20,0 мкг/см^3 для бензойной кислоты и от 0,25 до 20,0 мкг/см^3 для сорбиновой кислоты. Каждый градуировочный раствор хроматографируют не менее двух раз, начиная с самой низкой концентрации. За результат принимают среднее арифметическое значение при условии сходимости для бензойной кислоты 5 %, для сорбиновой 6 %. Условия хроматографирования приведены в таблице 2.

Измеряют площади пиков, соответствующие концентрациям бензойной и сорбиновой кислот в градуировочных растворах. Полученные данные используются для расчета коэффициентов регрессии a и $в$ прямой $Y = a + вX$ методом наименьших квадратов.

Таблица 2

Наименование параметра	Значение
Объем вводимой пробы, $см^3$	0,02
Скорость потока, $см^3$/мин	0,8 – 1
Длина волны поглощения, нм	260
Ширина оптической полосы, нм	80
Время удерживания, мин:	
– бензойной кислоты	6 – 7
– сорбиновой кислоты	8 – 9

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения

$$Y = a + вX, \quad (3)$$

где Y – площадь пика бензойной (сорбиновой) кислоты;
X – концентрация бензойной (сорбиновой) кислоты;
a и $в$ – коэффициенты регрессии.

Погрешность градуировочного графика не должна превышать для бензойной кислоты 16%, сорбиновой кислоты 16,7%.

5.3.4 Контроль градуировочного графика

Контроль градуировочного графика осуществляется по градуировочным растворам бензойной и сорбиновой кислот с концентрациями, входящими в диапазон измерений, но не повторяющие по значениям концентрации, по которым рассчитывались параметры градуировочной прямой. Допустимые расхождения между заданными и установленными по графику значениями концентраций, используемых для контроля градуировочных растворов, не должны превышать для бензойной кислоты 16%, для сорбиновой кислоты 16,7%.

В противном случае график подлежит повторной проверке и, при необходимости, новому расчету параметров градуировочной прямой. График подлежит обязательной проверке при замене партии реактивов и посуды, после ремонта оборудования, но не реже одного раза в месяц.

Перед началом измерений проводят оперативный контроль градуировочного графика, используя 1 – 2 градуировочных раствора из диапазона измерений бензойной и сорбиновой кислот. Полученные при хроматографировании значения Y не должны отклоняться от градуировочной прямой более, чем на величину доверительной границы случайной составляющей погрешности градуировочного графика E, %:

– для бензойной кислоты – 7,9;
– для сорбиновой кислоты – 10,2.

В противном случае график подлежит повторной проверке.

5.4 Проведение измерений

5.4.1 Подготовка анализируемых образцов

Взвешивают навеску пробы массой:

– соки, напитки – (5,000 ± 0,005) г;
– плодоовощные консервы – (2,000 ± 0,005) г.

Навеску переносят в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$, доводят до метки водой, тщательно перемешивают и фильтруют.

После фильтрации проб растворы должны быть прозрачными (без опалесценции). Если раствор мутный, то подготовку проб повторяют.

5.4.2 Хроматографирование

Полученные фильтраты анализируют на жидкостном хроматографе. Условия хроматографирования приведены в таблице1 в 5.3.3 настоящего стандарта. Проводят анализ двух параллельных проб. Каждую пробу хроматографируют не менее двух раз.

5.5 Обработка результатов

Массовую долю бензойной и сорбиновой кислот X, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \times V.}{M}, \quad (4)$$

где $V.$ – объем воды, используемый для экстракции, см^3;

M – масса навески , г.

C – концентрация определяемого компонента в мкг/см^3, найденная по градуировочному графику или рассчитанная по регрессионной зависимости уравнения градуировочного графика $Y = a + вX$, откуда

$$X = (Y - a) / в, \quad (5)$$

где X – искомая концентрация C;

Y – площадь пика бензойной (сорбиновой) кислоты;

a и $в$ – коэффициенты регрессии.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение концентраций бензойной (сорбиновой) кислоты и двух параллельных проб, допускаемое расхождение между которыми не должно превышать 7,8 % для бензойной кислоты и 9,7 % для сорбиновой кислоты.

Допускаемое расхождение между параллельными определениями при двукратном хроматографировании одной пробы не должно превышать для бензойной кислоты 5,5 %, для сорбиновой кислоты 6,9 %.

Вычисления проводят до второго десятичного знака.

Гарантированный результат анализа представляют в следующем виде

$$X = \overline{X} \pm \Delta МВИ, \quad (6)$$

где $\overline{X}$ – среднее арифметическое значение концентраций бензойной (сорбиновой) кислоты двух параллельных проб, млн$^{-1}$;

$\Delta МВИ$ – относительная погрешность методики, %.

6 Методика тонкослойной хроматографии

6.1 Сущность методики

Методика основана на извлечении бензойной и сорбиновой кислот, а также их солей из продуктов переработки плодов и овощей перегонкой водяным паром и /или экстракцией органическим растворителем с последующим хроматографическим разделением их в тонком слое сорбента и визуальном определении количества. Методика применима в диапазоне определяемых концентраций бензойной и сорбиновой кислот от 50 до 1000 млн$^{-1}$.

Относительная погрешность методики Δ 50 %.

6.2 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания до 200 г, не ниже 2-го класса точности.

Испаритель ротационный ИР-1М по НД [5].

Установка для перегонки, собранная в соответствии с 4.3.1 настоящего стандарта.

Осветитель настольный ультрафиолетовый, снабженный светофильтром с максимумом пропускания при длине волны 254 нм.

Пластины для тонкослойной хроматографии "Сорбфил" с ультрафиолетовым индикатором УФ-254, размером 100×100 мм, по НД [6] или "Силуфол УФ-254", размером 200×200 мм, производства Чехии.

Микрошприцы для жидкостной хроматографии по НД [7].

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

Колбы грушевидные с взаимозаменяемым конусом 14/23, вместимостью 100 и 50 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Колбы остродонные с взаимозаменяемым конусом 14/23, вместимостью 100, 50 и 25 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Стаканы по ГОСТ 25336.

Пробирки с притертыми пробками, вместимостью 10 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Пипетки типа 3 исполнения 1, 1-го класса точности, вместимостью 1, 10, 20, 25 $см^3$ по ГОСТ 29227.

Бюретка исполнения 1, 2 и 3, вместимостью 25 $см^3$ по ГОСТ 29251.

Воронки делительные ВД-100-29/32, ВД-250-29/32 по ГОСТ 25336.

Воронка лабораторная В-56-80 ХС по ГОСТ 25336.

Цилиндры мерные 1-50, 1-100 по ГОСТ 1770.

Камера для тонкослойной хроматографии: сосуд с плоским дном, закрывающийся пришлифованной крышкой, или эксикатор по ГОСТ 25336.

Палочки из химико-лабораторного стекла по ГОСТ 21400.

Кусочки фарфора или стеклянные шарики.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026 или фильтры бумажные по НД [8].

Бумага индикаторная универсальная для определения pH по НД [9].

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Электроплитка по ГОСТ 14919.

Для проведения испытания применяют реактивы и растворы, указанные в 4.2, а также реактивы, указанные ниже.

Кислота бензойная по ГОСТ 10521, ч.д.а.

Кислота сорбиновая (2,4-гексадиеновая), ч.д.а. по НД [10].

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат) по ГОСТ 22300, ч.д.а.

Эфир петролейный, ч.д.а.

Эфир диэтиловый, ч.д.а.

Хлороформ, х.ч. по НД [11].

Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, ч.д.а.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х.ч., растворы с концентрацией 1 моль/$дм^3$.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166, ч.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч.д.а., раствор с концентрацией 1 моль/$дм^3$.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, ч.д.а.

Допускается использование другой аппаратуры, материалов и реактивов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

6.3 Подготовка к измерению

6.3.1 Подготовка установки для перегонки – по 4.3.

6.3.2 Приготовление стандартных растворов

Раствор 1. Взвешивают (0,1 ± 0,00015) г бензойной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ и доводят до метки этилацетатом (концентрация полученного раствора 4 мг/$см^3$).

Раствор 2. Взвешивают (0,04 ± 0,00015) г сорбиновой кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят до метки этилацетатом (концентрация полученного раствора 0,4 мг/$см^3$).

Раствор 3. Смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Концентрация бензойной кислоты в полученном растворе 2,0 мг/$см^3$, сорбиновой кислоты – 0,2 мг/$см^3$.

Растворы хранят при температуре не выше 5 °С в закрытом сосуде в течение 6 мес.

6.4 Проведение измерения

6.4.1 Извлечение бензойной и сорбиновой кислот из пробы

Извлечение бензойной и сорбиновой кислот из пробы продукта осуществляют по 4.4.1 со следующими дополнениями. В приемную колбу перед отгонкой добавляют 10 см^3 раствора гидроокиси натрия с концентрацией 1 моль/дм^3. Если проба содержит только сорбиновую кислоту, щелочь не требуется. Дистиллят переносят в коническую колбу, добавляют (60,0 ± 0,5) г хлористого натрия, фильтруют через ватный тампон в делительную воронку. Оставшийся хлористый натрий ополаскивают 10 см^3 воды, которые также фильтруют в делительную воронку. Фильтрат подкисляют раствором серной кислоты до pH 2,0 – 3,0 по универсальной индикаторной бумаге. В делительную воронку добавляют 20 см^3 этилацетата. Интенсивно перемешивают содержимое в течение 1 мин. Смеси дают отстояться и после полного разделения водный нижний слой сливают, а этилацетатный экстракт переносят в сухую коническую колбу с притертой пробкой.

Экстракцию бензойной и сорбиновой кислот из водной вытяжки проводят еще два раза свежими порциями этилацетата. Объединенный экстракт обезвоживают, фильтруя его в отгонную колбу через воронку, заполненную на треть ее высоты безводным сернокислым натрием. После окончания фильтрования фильтр промывают 10 см^3 этилацетата, которые тоже фильтруют в отгонную колбу. Экстракт упаривают на ротационном испарителе досуха. Остаток в отгонной колбе растворяют в 1 см^3 этилацетата. Полученный раствор используют для хроматографического определения.

При анализе напитков, неконцентрированных соков исключают стадию отгонки. (10,00 ± 0,005) г пробы переносят в делительную воронку, добавляют 5 см^3 насыщенного раствора хлорида натрия, подкисляют раствором серной кислоты до pH 2,0 – 3,0 по универсальной индикаторной бумаге. Экстрагируют бензойную и сорбиновую кислоты 3 раза по 10 см^3 этилацетата.

Объединенный экстракт сушат, добавляя (2,0 ± 0,5) г безводного сернокислого натрия, фильтруют в отгонную колбу и упаривают на ротационном испарителе досуха при 45 – 50 ^{0}С. Остаток в отгонной колбе растворяют в 1 см^3 этилацетата.

6.4.2 Хроматографирование

В хроматографическую камеру заливают смесь подвижных растворителей: петролейный эфир, хлороформ, диэтиловый эфир, муравьиная кислота в соотношении 20,0:8,0:2,8:1,2 на высоту не более чем 0,5 см. Пластинку размечают мягким простым карандашом (рисунок 2) и в точки 1, 2, 5, 6 вносят по 1, 2, 4 и 8 мкл раствора 3, при этом количество бензойной кислоты в пятнах составляет 2, 4, 8 и 16 мкг, а сорбиновой кислоты – 0,2; 0,4; 0,8 и 1,6 мкг соответственно. В точки 3 и 4 вносят 3 и 10 мкл экстракта. Нанесение проб проводят микрошприцем. Диаметр пятна на старте не должен превышать 2 – 3 мм. Схема нанесения пробы и стандартных растворов на хроматографическую пластинку представлена на рисунке 2.

Пластинку опускают в камеру и хроматографируют до линии фронта. Затем пластинку вынимают, подсушивают и рассматривают в УФ-свете. Наличие темной окраски в пятне экстракта по значениям Rf, соответствующим стандартным растворам, свидетельствует о присутствии этих консервантов в продукте. Ориентировочные значения Rf бензойной и сорбиновой кислот приведены в таблице 3, где Rf – отношение расстояния от стартовой линии до центра пятна на хроматограмме к расстоянию от стартовой линии до фронта растворителя по ГОСТ 28366.

Таблица 3

Наименование вещества	Значение Rf на пластинках "Силуфол"	Значение Rf на пластинках "Сорбфил"
Бензойная кислота	0,56	0,79
Сорбиновая кислота	0,48	0,61

Пятна экстрактов сравнивают с пятнами стандартных растворов и визуально по интенсивности окраски оценивают содержание бензойной и сорбиновой кислот в экстрактах.

Если содержание бензойной или сорбиновой кислот в экстрактах выходит за пределы содержания кислот в стандартных растворах, то следует провести повторное хроматографическое разделение на пластинке. При этом на линию старта наносят ряд точек – точно фиксированное количество экстракта, обычно от 1 до 8 мкл, и стандартных растворов с учетом предварительно оцененных количеств бензойной и сорбиновой кислот в пробе, чтобы количество бензойной кислоты в точке не превышало 20 мкг, сорбиновой кислоты – 5 мкг.

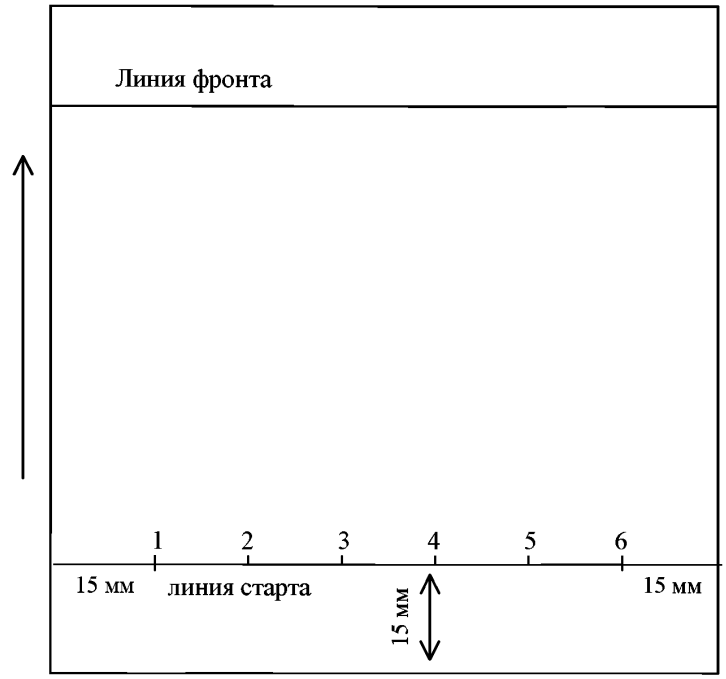


Рисунок 2 – **Схема нанесения пробы и стандартных растворов на хроматографическую пластинку**

6.5 Обработка результатов

Массовую долю бензойной и сорбиновой кислот или их солей X, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{m \times V_1 \times F}{M \times V_2}, \qquad (7)$$

где m – масса бензойной или сорбиновой кислоты, обнаруженная в пятне экстракта, мкг;

M – масса навески, г;

V_1 – объем экстракта, см^3;

V_2 – объем экстракта, нанесенного на пластинку, см^3;

F – коэффициент, равный 1 при расчете содержания бензойной или сорбиновой кислоты; равный 1,33 – при расчете содержания бензоата калия; 1,19 – бензоата натрия; 1,34 – сорбата калия; 1,2 – сорбата натрия.

Вычисления результатов определений проводят до первого десятичного знака. За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до целого значения.

Относительное допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории, не должно превышать 60% по отношению к среднему арифметическому значению при доверительной вероятности $P = 0,95$.

7 Требования безопасности

При проведении анализа продуктов переработки плодов и овощей следует соблюдать требования безопасности в соответствии с [12].

Лаборатория, в которой определяют содержание сорбиновой и бензойной кислот, должна иметь приточно-вытяжную вентиляцию в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021.

Работу с реактивами проводят в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных защитных средств.

Приложение А
(информационное)

Библиография

[1] Методика определения концентраций сорбиновой и бензойной кислот в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии МВИ.МН 806-98

[2] ТУ 25-07-567-69 Электрод стеклянный

[3] ТУ 6-09-1567-72 Ацетат натрия

[4] ТУ 6-09-3534-74 Ацетонитрил

[5] ТУ 25-1173-102-84 Испаритель ротационный

[6] ТУ 25-11-17-89 Пластины для тонкослойной хроматографии "Сорбфил"

[7] ТУ 25-03-2152-76 Микрошприц МШ-10

[8] ТУ 6-09-1705-82 Фильтры обезжиренные, желтая лента

[9] ТУ 6-09-1181-76 Бумага индикаторная универсальная

[10] ТУ 6-14-358-76 Кислота сорбиновая (2,4-гексадиеновая)

[11] ТУ 6-09-4236-76 Реактивы. Хлороформ

[12] Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях санитарно-эпидемиологических учреждений системы Минздрава, утвержденные 20.01.81 г., № 4225-81

gost.e-ecolog.ru