СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора Бел ГИМ

_____ С.А. ЛЬЕВА

«16» ___ 2006 г.

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач Республики Беларусь

_____ М.И. РИМЖА

«___» ___ 2006 г.

МВИ. МН 806-98

Методика определения концентраций сорбиновой и бензойной кислот в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

РАЗРАБОТАНО

ГУ «РНПЦ гигиены»

Директор

_____ С.М. Соколов

«___» ___ 2006 г.

Минск 2006

gost.e-ecolog.ru

Методика предназначена для одновременного определения концентраций сорбиновой и бензойной кислот в пищевых продуктах, пищевых и биологически активных добавках.

Бензойная и сорбиновая кислоты и их соли широко используются в качестве пищевых добавок, обладающих консервирующими свойствами.

Бензойная кислота.

По внешнему виду белый кристаллический порошок. Брутто формула $C_6H_5CO_2H$. молекулярная масса - 122,12\. Температура плавления - 122,05 °С, температура кипения - 249,2 °С. Растворимость в воде - 0,3 г/100 $см^3$ (20 °С), растворима в спирте, эфире, ацетоне, метаноле, бензоле, хлороформе.

Сорбиновая кислота.

По внешнему виду белый кристаллический порошок. Брутто формула $C_6H_8O_2$. Молекулярная масса -112, температура плавления 134 °С. Растворима в воде, спирте, ацетоне, метаноле.

Метод определения химических консервантов сорбиновой и бензойной кислот основан на извлечении определяемых веществ водой, обезжиривании экстрактов гексаном с последующим анализом аликвотной части водного раствора методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в режиме изократического разделения на колонке с обращенной фазой Hypersil ODS (C_{18}) с использованием ультрафиолетового или диодно-матричного детектора.

Нижний предел измерения составляет для бензойной кислоты - 0,01 мкг, для сорбиновой кислоты - 0,0025 мкг.

Диапазон определяемых концентраций:

- бензойная кислота: 20 – 4000 мг/кг (мг/л);
- сорбиновая кислота: 50 - 2000 мг/кг (мг/л).

Присутствующие в экстракте коэкстрактивные вещества определению не мешают. Время определения составляет 15-40 мин, включая подготовку образца.

1 Нормы погрешности измерений

Относительные значения показателей точности, правильности, повторяемости и воспроизводимости МВИ при доверительной вероятности $P = 0,95$ в диапазоне определяемых концентраций для бензойной кислоты 20 – 4000 мг/кг (мг/л), для сорбиновой кислоты 50 – 2000 мг/кг (мг/л) указаны в таблице 1. Относительные значения предела повторяемости и предела воспроизводимости МВИ при доверительной вероятности $P = 0,95$ указаны в таблице 2.

Таблица 1 – Относительные значения показателей точности, правильности, повторяемости и воспроизводимости МВИ при доверительной вероятности Р=0,95

Наименование консерванта	Диапазон измерений, мг/кг (мг/л)	Показатель повторяемости (СКО повторяемости), δ_r, %	Показатель воспроизводимости (СКО воспроизводимости), δ_R, %	Показатель правильности (границы, в которых находится неисключенная систематическая погрешность), $\pm\Delta_c$, %	Показатель точности (границы, в которых находится погрешность методики), $\pm\Delta$, %
Бензойная кислота	20-4000	1,4	1,1	9	10
Сорбиновая кислота	50-2000	1,7	1,1	10	11

Таблица 2 – Относительные значения предела повторяемости и предела воспроизводимости МВИ при доверительной вероятности Р=0,95

Наименование консерванта	Диапазон измерений, мг/кг (мг/л)	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений), r, %	Предел воспроизводимости (для двух результатов анализа), R, %	Предел воспроизводимости результатов, выполненных в 2-х лабораториях, 1,4 × R, %
Бензойная кислота	20-4000	3,9	3,0	4,2
Сорбиновая кислота	50-2000	4,7	3,0	4,2

2 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

2.1 Средства измерений:

Жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим или диодно-матричным детектором, обеспечивающим проведение измерений в диапазоне 200 – 450 нм

Микрошприцы для жидкостной хроматографии на 0,05 см^3 фирмы Hamilton

Кран-дозатор с петлей на 0,02 см^3 для ручного ввода пробы — Reodyne (погрешность ± 0,5 %)

Весы аналитические ВЛР-200 — ГОСТ 24104-2001

Колбы мерные
- 2-50-2 — ГОСТ 1770-74
- 2-100-2 — ГОСТ 1770-74
- 2-200-2 — ГОСТ 1770-74
- 2-1000-2 — ГОСТ 1770-74

Стаканы химические — ГОСТ 1770-74

Пипетки вместимостью 0,1 см^3, 0,2 см^3, 1,0 см^3, 2,0 см^3, 5,0 см^3, 10,0 см^3 — ГОСТ 20292-74

Воронки делительные 500,0 см^3 — ГОСТ 25336-82

Цилиндры мерные	1000,0 $см^3$	ГОСТ 1770-74

2.2 Вспомогательные устройства.

Колонка хроматографическая размером 125х4 мм, зернение частиц 5 мкм	Hypersil ODS (C_{18})
Фильтр «синяя лента»	ГОСТ 12026-76
Иономер И-135	ГОСТ 22261-94
Электрод стеклянный	ТУ 25-07-567-69

2.3 Материалы и реактивы

Бензойная кислота	Фирмы Merk,99,5% чистоты
Сорбиновая кислота	Фирмы Merk,99,5% чистоты
Ацетат натрия CH_3COONa $2H_2O$, о.с.ч.	ТУ 6-09-1567-72
Уксусная кислота, х.ч.	ГОСТ 61-75
Вода бидистиллированная	
Ацетонитрил, ч.	ТУ 6-09-3534-74
Калий марганцевокислый, ч	ГОСТ 20490-75
Гексан, ч.	ТУ 6-09-3375-78
Калий железосинеродистый, ч.д.а	ГОСТ 4207-75
Цинк уксуснокислый, ч.д.а	ГОСТ 5823-78

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства а также реактивы, по точности, не уступающие рекомендуемым в методике.

3 Метод измерения

Для определения концентраций сорбиновой и бензойной кислот используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, основанный на измерении оптической плотности водных экстрактов пищевых продуктов с использованием диодно-матричного детектора при длине волны 260 нм и ширине оптической полосы 80 нм после изократического элюирования на колонке Hypersil ODS (C_{18}).

4 Требования безопасности

Анализ по данной методике должен выполняться согласно инструкции «Основные правила безопасности работы в химических лабораториях». – М.: Химия, 1979 г., инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа, а также «Общие правила пожарной безопасности Республики Беларусь для общественных зданий и сооружений. ППБ 1.04 – 2002»

5 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, изучившие требования безопасности и настоящую методику, прошедшие подготовку для работы в качестве оператора жидкостного хроматографа.

Отдел технической информации и нормативной

6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха при приготовлении растворов, в том числе градуировочных (20 ± 2) °С;
- температура воздуха при выполнении измерений (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С;
- напряжение питающей сети (230 ± 23) В;
- частота переменного тока (50 ± 1) Гц

7 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, установление градуировочной характеристики и контроль погрешности, отбор проб к анализу.

7.1 Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для блока насосов и детектора (см. п.7.3 МВИ). 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, соответствующий минимально определяемой концентрации.

7.2 Приготовление растворов

7.2.1 Приготовление подвижной фазы (элюентов)

Взвешивают 2,36 г уксуснокислого натрия, растворяют в 970-980 $см^3$ воды в мерной колбе на 1000 $см^3$, устанавливают pH 4,3 - 4,4, используя уксусную кислоту, и доводят раствор до метки водой. Полученный раствор используют для приготовления подвижной фазы (системы элюентов), состоящей из 0,02 М уксуснокислого натрия (pH 4,3 - 4,4) и ацетонитрила в соотношении 85:15 по объему.

Ацетонитрил пригодный для использования в качестве элюента для жидкостной хроматографии получают из ацетонитрила марки "ч". Для этого в перегонную колбу вместимостью 2 $дм^3$ помещают 1,5 $дм^3$ ацетонитрила марки "ч" и 30 г $KMnO_4$, кипятят с обратным холодильником 1 час и перегоняют с дефлегматором, отбирая фракции по 200 $см^3$. Первую фракцию отбрасывают, остальные фракции собирают. Перегонку прекращают, когда в колбе останется 200 $см^3$ раствора.

7.2.2 Приготовление реактивов Карреза

Реактив Карреза I: взвешивают 106 г ± 0,001 г калия железосинеродистого растворяют в

Фонд информации и документации

200-300 см^3 дистиллированной воды, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в склянке из темного стекла не более месяца;

Реактив Карреза II: взвешивают 220 г ± 0,001 г цинка уксуснокислого, растворяют в 200-300 см^3 дистиллированной воды, добавляют 30 см^3 ледяной уксусной кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в склянке из темного стекла не более месяца.

7.2.3 Приготовление градуировочных растворов

Приготовление основных стандартных растворов сорбиновой и бензойной кислот:

Готовят основной стандартный раствор бензойной кислоты концентрацией 100 мкг/см^3, взвешивая 0,1 г ± 0,001г бензойной кислоты и растворяя в мерной колбе на 1000 см^3 водой. Раствор устойчив при хранении в холодильнике в течение 1 месяца.

Готовят основной стандартный раствор сорбиновой кислоты концентрацией 50 мкг/см^3, взвешивая 0,05 г ± 0,001г сорбиновой кислоты и растворяя в мерной колбе на 1000 см^3 водой. Раствор устойчив при хранении в холодильнике в течение 1 месяца.

Приготовление смеси градуировочных растворов сорбиновой и бензойной кислот:

Для получения смеси градуировочных растворов сорбиновой и бензойной кислот соответствующих концентраций отбирают аликвотные части основных стандартных растворов сорбиновой и бензойной кислот в соответствии с таблицей 3, сливают попарно в мерные колбы на 100 см^3 и доводят водой до метки.

Таблица 3 - Приготовление градуировочных растворов

№ градуировочного раствора	Концентрация сорбиновой кислоты в градуировочном растворе, мкг/см^3	Аликвотная часть основного стандартного раствора сорбиновой кислоты, см^3	Концентрация бензойной кислоты в градуировочном растворе, мкг/см^3	Аликвотная часть основного стандартного раствора бензойной кислоты, см^3
1	0,25	0,5	1,0	1,0
2	1,0	2,0	2,0	2,0
3	2,0	4,0	4,0	4,0
4	50	10,	8,0	8,0
5	10,0	20,0	10,0	10,0
6	15,0	30,0	15,0	15,0
7	20,0	40,0	20,0	20,0

7.3 Установление градуировочной характеристики

Каждый градуировочный раствор хроматографируют по два раза, начиная с самой низкой концентрации, принимая за результат измерения среднее арифметическое двух параллельных измерений. Каждый градуировочный раствор готовится и хроматографируется не менее трех раз с интервалом в 1 день.

Государственный институт Отдел научно-технической информации и нормативов

Условия хроматографирования при анализе сорбиновой и бензойной кислот:

Объем вводимой в пробы	0,02 $см^3$
Скорость потока	1 $см^3$/мин
Хроматографическая колонка Hypersil ODS (C_{18}), размером 125х4 мм, зернение частиц 5 мкм	
Длина волны поглощения	260 нм
Ширина оптической полосы	80 нм
Время удерживания:	
- бензойной кислоты	8,6 мин
- сорбиновой кислоты	9,6 мин

Для построения градуировочного графика измеряют площади пиков, соответствующие концентрациям сорбиновой и бензойной кислот в градуировочных растворах. По полученным данным рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = aX + b$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения

$$Y = aX + b, \quad (1)$$

где

– Y- площадь пика сорбиновой/бензойной кислоты;

– X- концентрация сорбиновой/бензойной кислоты в градуировочном растворе;

– a и b- коэффициенты регрессии.

7.4 Контроль градуировочного графика

Контроль градуировочного графика осуществляется каждый раз перед началом измерений не менее чем по двум точкам в рабочем диапазоне измерений. Для контроля применяются градуировочные растворы сорбиновой и бензойной кислот. Полученные при хроматографировании значения Y не должны отклоняться от градуировочной прямой более чем на 7 % для бензойной кислоты; 8 % для сорбиновой кислоты. В противном случае необходимо построение нового градуировочного графика не менее чем по 5 точкам.

7.5 Подготовка анализируемых образцов

7.5.1 Соки, безалкогольные, слабоалкогольные, алкогольные напитки, вина, пиво, др. напитки

Проводят дегазирование пробы (для газированных напитков): 50 $см^3$ пробы наливают в стакан вместимостью 100 $см^3$, перемешивают стеклянной палочкой или шпателем 1-2 минуты и оставляют стоять 5-10 минут до прекращения выделения пузырьков углекислоты.

Отбирают 5 $см^3$ образца, переносят в мерную колбу на 200 $см^3$ и доводят до метки водой. Раствор перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

Государственный институт отдел научно-

7.5.2 Концентраты безалкогольных напитков, концентраты чая жидкие, жидкие фруктовые концентраты, настои из трав, жидкие добавки к пище

Концентрат разбавляют согласно рецептуре приготовления, отбирают 5 $см^3$ полученного раствора и далее как описано в п.7.5.1.

7.5.3 Икра

Отбирают среднюю навеску икры 2 г и тщательно растирают в ступке с небольшим количеством воды (5-7 $см^3$). Гомогенат количественно переносят в мерную колбу на 200 $см^3$ и доводят раствор до метки водой. Раствор перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

7.5.4 Майонез, соусы

Навеску средней пробы 2 г растворяют в 200 $см^3$ воды. Затем раствор встряхивают в делительной воронке с 30 $см^3$ гексана в течение 1-2 мин. После разделения слоев, гексан отбрасывают, а водный экстракт фильтруют через бумажный фильтр.

7.5.5 Маргарин, спреды, другие жировые продукты

Навеску средней пробы 2 г предварительно растворяют в 20-30 $см^3$ гексана и количественно переносят в делительную воронку. Добавляют 200 $см^3$ воды и встряхивают в течение 1-2 мин. После разделения фаз водный экстракт фильтруют через бумажный фильтр.

7.5.6 Кетчупы, йогурты, джемы, конфитюры, желе, мармелады, муссы, другие пастообразные продукты

Навеску средней пробы 2 г предварительно растворяют в 100-150 $см^3$ воды и количественно переносят в мерную колбу на 200 $см^3$ и доводят раствор до метки. Тщательно перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

7.5.7 Пресервы, салаты, кондитерские, хлебобулочные изделия, готовые блюда

Для проведения анализа используют полностью изделие, включая соусные заправки, заливки, глазури, крема и др. Пробу массой 200-500 г гомогенизируют, пропуская через мясорубку, миксер и т.п. Отбирают среднюю навеску массой 2 г, добавляют 100-150 $см^3$ дистиллированной воды и количественно переносят в мерную колбу на 200 $см^3$, доводят раствор до метки. Подготовленную, таким образом, пробу оставляют на 2-4 часа и затем фильтруют через бумажный фильтр.

После фильтрации проб для каждого продукта растворы должны быть прозрачными (без опалесценции). В противном случае применяются растворы Карреза: отбирают среднюю навеску анализируемого образца массой 2 г, помещают в стеклянный стакан, смешивают с небольшим количеством дистиллированной воды (50 - 80 $см^3$), количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 $см^3$, добавляют 15 $см^3$ раствора Карреза I и 15 $см^3$ раствора Карреза II. Содержимое колбы доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

8 Выполнение измерений

Экстракты, полученные при анализе пищевых продуктов в соответствии п.7.5 анализируют согласно п.7.3 настоящей МВИ. Определяют содержание анализируемых веществ, используя компьютерную систему обработки сигналов, или проводят расчет площадей пиков соответствующих сорбиновой и бензойной кислотам общепринятыми методами при регистрации сигналов на самописце. Проводят анализ 2 параллельных проб.

9 Обработка результатов измерений

Содержание сорбиновой и бензойной кислот в мг/кг (мг/л) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \times V_{экстр.}}{M(V_{пр})}, \quad (2)$$

где

С - концентрация определяемого компонента, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3;

$V_{экстр.}$ - объем воды, используемый для экстракции, см^3;

М ($V_{пр}$) - масса навески (объем) пробы, г (см^3).

За результат анализа принимают среднее арифметическое параллельных определений. Вычисления проводят до второго десятичного знака, с последующим округлением до первого.

Допустимое расхождение между параллельными измерениями двух проб не должно превышать 3,9 % для бензойной кислоты и 4,0 % для сорбиновой кислоты.

Гарантированный результат анализа представляют в следующем виде:

$$C = \overline{C} \pm \Delta \text{ МВИ}, \quad (3)$$

где

$$\overline{C} = \frac{C_1 + C_2}{2}, \quad (4)$$

где

C_1 - концентрация бензойной или сорбиновой кислот в первой пробе, мг/кг (мг/л);

C_2 - концентрация бензойной или сорбиновой кислот во второй (параллельной) пробе, мг/кг (мг/л);

10 Контроль погрешности МВИ

Оперативный контроль процедуры анализа осуществляется на основе оценки погрешности результатов анализа при реализации КПКП (контрольной процедуры для контроля погрешности) с применением ОК (образца для контроля) (МИ 2335-2003 п. 5.5).

Образцами контроля могут быть:

- аттестованные образцы контролируемой продукции;

аттестованные по процедуре приготовления водные растворы (аттестованные смеси) сорбиновой и бензойной кислот. Погрешность аттестованной смеси не должна превышать 3 % относительных.

Порядок приготовления аттестованной смеси приведен в приложении А.

Образцы для контроля должны быть проведены через все стадии анализа в соответствии с МВИ.

За результат контрольного измерения принимают среднее арифметическое из результатов двух параллельных определений.

Результат контрольной процедуры $К_к$ рассчитывают по формуле

$$К_к = X\ ср - С, \quad (5)$$

Где: X ср. – результат контрольного измерения образца для контроля;

С – аттестованное значение образца для контроля.

Норматив контроля К рассчитывается по формуле

$$К = \Delta_л,$$

где $\pm\ \Delta_л$ - характеристика погрешности результатов анализа, соответствующая аттестованному значению ОК.

$$\Delta_л = 0{,}01 \times \Delta \times С, \quad (6)$$

где Δ - погрешность МВИ;

0,01 – пересчет в абсолютное значение.

Проводят сопоставление результата контрольной процедуры с нормативом контроля. Если результат контрольной процедуры удовлетворяет условию

$$|К_к| \le К, \quad (7)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (7) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (7) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

Методика разработана лабораторией химии пищевых продуктов отдела физико-химических исследований ГУ «РНПЦ гигиены» МЗ РБ.

Разработчики:

Зав. лабораторией ХПП,
канд. хим. наук О.В. Шушковская

Старший научный сотрудник Л.Л. Белтикова

Белорусский государственный институт метрологии
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(рекомендуемое)

Пример порядка приготовления и подготовки к анализу водного раствора сорбиновой и бензойной кислот (аттестованной смеси) для проведения контроля погрешности МВИ

1) Приготовление водного раствора бензойной кислоты концентрации 8000 мкг/см^3 и сорбиновой кислоты концентрации 4000 мкг/см^3

Взвешивают 0,8 ± 0,001 г бензойной кислоты и 0,4 ± 0,001 г сорбиновой кислоты, растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 см^3; и доводят объем до метки.

2) Приготовление водного раствора сорбиновой и бензойной кислот концентрации 2000 мкг/см^3 и 1000 мкг/см^3 соответственно

Отбирают 10 см^3 полученного раствора и добавляют 30 см^3 дистиллированной воды.

3) Подготовка к анализу аттестованной смеси

Отбирают 5 см^3 водного раствора сорбиновой и бензойной кислот, помещают в стеклянный стакан, смешивают с небольшим количеством дистиллированной воды (50-80 см^3), количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 см^3, добавляют 15 см^3 раствора Карреза I и 15 см^3 раствора Карреза II. Содержимое колбы доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат помещают в делительную воронку, добавляют 20-30 см^3 гексана и встряхивают в течение 1-2 мин. После разделения фаз водный экстракт фильтруют через бумажный фильтр.

Полученный экстракт анализируют согласно МВИ.

gost.e-ecolog.ru