ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 13496— 2013

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Обнаружение красителей

Метод тонкослойной хроматографии

ISO 13496:2000
Meat and meat products —Detection of colouring agents – Method using Thin-layer chromatography
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом птицеперерабатывающей промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИПП Россельхозакадемии) на основе аутентичного перевода на русский язык стандарта, указанного в пункте 4, выполненного ФГУП "Стандартинформ"

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22.11.13 г № 1615-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 13496:2000 "Мясо и мясные продукты. Обнаружение красителей. Метод с применением тонкослойной хроматографии" (ISO 13496:2000 «Meat and meat products – Detection of colouring agents – Method using thin-layer chromatography»).

ИСО 13496 подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34 «Пищевые продукты», подкомитетом SC 6 «Мясо и мясные продукты».

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 Следует иметь в виду, что некоторые элементы международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). 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 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.ru)

© Стандартинформ, 2014

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ
Обнаружение красителей. Метод тонкослойной хроматографии

Meat and meat products.
Detection of colouring agents.
Method using thin-layer chromatography

Дата введения — 2015—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод тонкослойной хроматографии для обнаружения синтетических водорастворимых красителей в мясе и мясных продуктах.

Данный метод может быть использован для обнаружения следующих красителей:

Тартразин (*tartrazine*)	Синий патентованный V (*Patent Blue V*)
Хинолиновый желтый (*Quiniline Yellow*)	Индигокармин (*Indigotine*)
Желтый «солнечный закат» FCF (*Sunset Yellow FCF*)	Черный блестящий PN (*Brilliant Black PN*)
Амарант (*Amaranth*)	Черный 7984 (*Black 7984*)
Понсо 4R (*Ponceau 4R*)	Зеленый прочный FCF (*Fast Green* FCF)
Эритрозин (*Erithrozine*)	Синий VRS (*Blue VRS*)

Синонимы и идентификационные номера этих красителей приведены в приложении А.

Растительные красители и растительные экстракты, не препятствующие обнаружению с помощью данного метода, приведены в приложении В.1.

Натуральные красители, которые в некоторых случаях могут препятствовать обнаружению по данному методу, приведены в приложении В.2.

2 Нормативные ссылки

Нижеследующие нормативные документы содержат положения, которые в силу их упоминания в настоящем тексте, составляют положения настоящего стандарта. Для датированных ссылок любые публикации с последующими поправками или изменениями не применимы. Для недатированных ссылок следует использовать последнее издание указанного документа, включая все поправки и изменения.

ИСО 3696:1987 *Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний (ISO 3696:1987, Water for analytical laboratory use – Specification and test methods)*

AOAC 46.1.08:1995 Официальные методы анализа (AOAC International)

3 Термин и определение

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **обнаружение красителей:** Обнаружение наличия или отсутствия красителей с помощью метода, описанного в настоящем стандарте.

4 Сущность метода

Красители экстрагируют из пробы горячей водой и адсорбируют на полиамидном порошке. Экстрагированные красители очищают с помощью колоночной хроматографии и затем элюируют из колонки. Идентификацию красителей проводят с помощью метода тонкослойной хроматографии.

5 Реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если не указано иное.

5.1 Вода, соответствующая, по крайней мере, степени чистоты 3 по ИСО 3696.

5.2 Петролейный эфир с диапазоном температуры кипения от 40 °С до 60 °С.

5.3 Метанол.

5.4 Аммиак, 25 %-ный водный раствор, ρ_{20} = 0,910 г/см^3.

5.5 Кислота уксусная массовой долей 100 %, ρ_{20} = 1,050 г/см^3.

5.6 Цитрат натрия дигидрат.

5.7 Пропан-1-ол.

5.8 Этилацетат.

5.9 2-Метил-2-пропанол.

5.10 Кислота пропионовая.

5.11 Раствор – элюент для колоночной хроматографии

Смешивают 95 объемов метанола (см. 5.3) с 5 объемами раствора аммиака (см. 5.4).

5.12 Кислота уксусная, 50 %-ный раствор в метаноле

Смешивают один объем уксусной кислоты (см. 5.5) с одним объемом метанола (см. 5.3).

5.13 Полиамидный порошок, с размером частиц от 0,05 до 0,16 мм.

5.14 Песок, мелкозернистый, промытый в соляной кислоте и прокаленный.

5.15 Стандарты красителей

Чистота стандартов красителей может быть различной, поэтому необходимо знать чистоту красителей, используемых в качестве стандартов. Чистота должна определяться по методу AOAC 46.1.08.

Примечание – Сертифицированные пищевые красители также могут использоваться в качестве стандартов.

5.16 Стандартные растворы для тонкослойной хроматографии

Стандартные водные растворы каждого красителя (см. 5.15) концентрацией около 1 г/дм^3 готовят отдельно.

Растворы индигокармина готовят в день использования. Растворы других красителей могут храниться в темноте не более трех месяцев (растворы эритрозина – в течение одного месяца).

5.17 Элюент для тонкослойной хроматографии: раствор I

В мерной колбе с одной отметкой вместимостью 1000 см^3 взвешивают 25 г дигидрата цитрата натрия (см. 5.6) с точностью 0,1 г. Растворяют в воде, доводят до метки водой и перемешивают.

Смешивают 80 объемов полученного раствора цитрата с 20 объемами раствора аммиака (см. 5.4) и 12 объемами метанола (см. 5.3).

Для предотвращения или снижения влияния сафлора или шафрана рекомендуется использовать раствор II (см. 5.18).

5.18 Элюент для тонкослойной хроматографии: раствор II

Смешивают 6 объемов пропан-1-ола (см. 5.7) с одним объемом этилацетата (см. 5.8) и 3 объемами воды.

5.19 Элюент для тонкослойной хроматографии: раствор III

Смешивают 50 объемов 2-метил-2-пропанола (см. 5.9) с 12 объемами пропионовой кислоты (см. 5.10) и 38 объемами воды.

6 Оборудование

Применяется обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

6.1 Оборудование механическое или электрическое для гомогенизации лабораторных проб

Используют высокоскоростной измельчитель куттерного типа или мясорубку с диаметром отверстий решетки не более 4,0 мм.

6.2 Пробирки центрифужные стеклянные вместимостью 75 см^3.

6.3 Колбы плоскодонные вместимостью 250 см^3 с притертыми стеклянными пробками.

6.4 Колбы круглодонные вместимостью 100 $см^3$ с притертыми стеклянными пробками.

6.5 Центрифуга, обеспечивающая радиальное ускорение примерно 2000 g_n.

6.6 Испаритель ротационный.

6.7 Колонка хроматографическая стеклянная, с пористым фильтром и краном, длиной около 20 см, диаметром около 30 мм и размером пор фильтра от 40 мкм до 100 мкм (класс пористости Р 100 по [2]).

В колонку помещают небольшой кусок стекловаты и добавляют от 1 г до 2 г песка (см. 5.14).

6.8 Емкость из пластика вместимостью около 10 $см^3$, с крышкой.

6.9 Пластинки для тонкослойной хроматографии, покрытые слоем порошка из целлюлозы толщиной 0,10 мм, или эквивалентные пластинки.

Допускается использование готовых пластинок.

6.10 Микропипетки вместимостью около 5 $мм^3$.

6.11 pH-метр, обеспечивающий измерение с точностью до 0,1 pH.

7 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного настоящим стандартом. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в [1].

Важно, чтобы в лабораторию поступала представительная проба, которая не была повреждена или изменена во время транспортирования или хранения.

Масса пробы должна быть не менее 200 г. Пробу необходимо хранить таким образом, чтобы не допустить ее порчи и изменения состава.

8 Подготовка пробы

Лабораторную пробу гомогенизируют с помощью соответствующего оборудования (см. 6.1). При этом принимают меры, чтобы температура материала пробы не превышала 25 °С. При использовании мясорубки пробу необходимо измельчить не менее двух раз.

Подготовленную пробу помещают в соответствующую герметичную емкость. Емкость закрывают крышкой и хранят таким образом, чтобы не допустить порчи и изменения состава пробы. Анализ пробы проводят как можно скорее, но не более чем в течение 24 ч после гомогенизации.

9 Процедура

Предупреждения

Если проба содержит индигокармин, то ее температура в течение всего анализа не должна превышать 35 °С. Индигокармин частично распадается в хроматографическом растворе I, поэтому необходимо использовать хроматографический раствор II.

Эритрозин чувствителен к воздействию света. Поэтому при любых перерывах в ходе анализа растворы и пластинки необходимо хранить в темном месте. То же самое относится к индигокармину.

9.1 Проба для анализа

В центрифужной пробирке (см. 6.2) взвешивают 5 г подготовленной пробы (см. раздел 8) с точностью до 0,1 г.

Дальнейшие процедуры для проб, содержащих жир, описаны в 9.2.

Дальнейшие процедуры для проб, не содержащих жир, описаны в 9.3

9.2 Пробы, содержащие жир

В центрифужную пробирку добавляют около 20 $см^3$ петролейного эфира (см. 5.2) и перемешивают стеклянной палочкой. Петролейный эфир декантируют.

Эту процедуру повторяют три раза.

9.3 Пробы, не содержащие жир

В центрифужную пробирку добавляют 25 $см^3$ кипящей воды (см. предупреждение выше) и перемешивают. Добавляют 25 $см^3$ элюента (см. 5.11).

С помощью pH-метра (см. 6.11) проверяют, находится ли pH в интервале (9 ± 0,5) ед. pH. Если pH выходит за указанный интервал, то его доводят до необходимой величины уксусной кислотой (см. 5.5) или раствором аммиака (см. 5.4).

Тщательно перемешивают. Охлаждают пробу в морозильной камере в течение 15 мин (для предотвращения помутнения).

Центрифугируют (см. 6.5) в течение 10 мин при радиальном ускорении около 2000 g_n.

Декантируют прозрачный раствор в плоскодонную колбу (см. 6.3). В случае присутствия индигокармина используют круглодонную колбу (см. 6.4).

В центрифужную пробирку, содержащую осадок, добавляют 5 см^3 воды. Перемешивают и добавляют 10 см^3 элюента (см. 5.11). Снова перемешивают и центрифугируют как описано выше.

Эту процедуру повторяют, пока все красители не экстрагируются из пробы, затем объединяют все экстракты.

Смешанный экстракт упаривают на водяной бане до объема около 25 см^3 для удаления метанола. В случае присутствия индигокармина используют круглодонную колбу (см. 6.4) и ротационный испаритель (см. 6.6) при температуре 35 °С.

Добавляют 25 см^3 кипящей воды (см. предупреждения) и перемешивают.

9.4 Перенос красителей на полиамидный порошок

С помощью уксусной кислоты (см. 5.5) или раствора аммиака (см. 5.4) доводят pH до значения от 4 до 5 ед. pH.

К теплому раствору (см. предупреждения) добавляют 1 г полиамидного порошка (см. 5.13). Энергично встряхивают в течение 1 мин.

Дают возможность порошку сформировать осадок.

Проверяют, окрашен ли раствор. Если раствор окрашен, то добавляют еще немного полиамидного порошка и энергично встряхивают.

Примечание – Некоторые натуральные красители (см. приложение В) не полностью адсорбируются на полиамидном порошке, оставляя раствор окрашенным, даже если все синтетические красители были полностью адсорбированы. Обычно по типу пробы можно заключить, присутствуют ли в ней такие натуральные красители.

Встряхивают и переносят теплую суспензию в хроматографическую колонку (см. 6.7).

Промывают плоскодонную колбу тремя порциями по 10 см^3 горячей воды (см. предупреждения), добавляют каждый раз промывные воды в колонку. Промывают колонку другими тремя порциями по 10 см^3 горячей воды (см. предупреждения) и затем тремя порциями по 5 см^3 метанола (см. 5.3). Если натуральные красители элюируются, то продолжают промывать колонку метанолом, пока он не обесцветится.

9.5 Элюирование и концентрирование выделенных красителей

Помещают колбу (см. 6.4) под колонкой и элюируют красители из полиамидного порошка порциями по 5 см^3 элюента (см. 5.11) при объемной скорости потока элюента 2 см^3 /мин, пока полиамид не станет бесцветным.

Выпаривают полученный элюат досуха с помощью испарителя (см. 6.6) при температуре не выше 35 °С (см. предупреждения).

В зависимости от содержания и числа красителей, добавляют 1,0 или 2,0 см^3 элюента (см. 5.11) и растворяют высушенный остаток. Помещают раствор красителей в пластиковую емкость (см. 6.8).

9.6 Разделение с помощью тонкослойной хроматографии

9.6.1 Пластинки со стандартными растворами

Готовят три стандартные пластинки для тонкослойной хроматографии со стандартными растворами (см. 5.16). Используя микропипетку (см. 6.10), наносят около 5 мм^3 каждого стандартного раствора (см. 5.16) отдельно на каждую пластинку в виде пятна (диаметр < 5 мм) на каждую пластинку (см. 6.9). Развитие хроматограмм на пластинках проводят отдельно в ненасыщенных камерах с каждым из элюентов для хроматографии (см. 5.17, 5.18 и 5.19), пока фронт растворителя не достигнет расстояния около от 10 см до 12 см от стартовой линии. Вынимают пластинки из камеры и сушат на воздухе в вытяжном шкафу. Пластинки хранят в темном месте. Пятна всех красителей, за исключением индигокармина, являются устойчивыми в течение нескольких лет.

9.6.2 Пробы

На пластинку для тонкослойной хроматографии (см. 6.9) с помощью микропипетки (см. 6.10) наносят едва видимое количество раствора пробы (см. 9.5). Сушат пластинку с помощью фена. В случае присутствия индигокармина сушат на воздухе.

Развитие хроматограммы на пластинке проводят в ненасыщенной камере до высоты около от 10 см до 12 см, используя подходящий раствор для хроматографии (см. 5.16, 5.17 или 5.18), то есть тот раствор, который обеспечивает наилучшее разделение красителей, обнаруженных в пробе (см. раздел 1). В некоторых случаях для получения наилучшего разделения может потребоваться приготовление второй пластинки с пробой и развитие хроматограммы с одним из двух других элюентов.

Вынимают пластинку из камеры и сушат на воздухе в вытяжном шкафу.

Сравнивают пятна на пластине с пробой с пятнами на соответствующих пластинах со стандартными растворами (см. 9.6.1).

В случае присутствия смеси красителей рекомендуется наносить различные количества раствора пробы, так как в концентрате красители могут присутствовать в разных концентрациях.

Образование «хвостов» обычно вызвано недостаточной очисткой. При наличии «хвостов» краситель снова адсорбируют адсорбентом, промывают горячей водой и выделяют из адсорбента, как описано выше.

9.7 Подтверждение

Идентичность красителей подтверждают хроматографированием концентрата (см. 9.6.2) в смеси со стандартными красителями, идентифицированными на первой хроматограмме.

В сомнительных случаях краситель элюируют с пластинки нейтральным раствором (вода, или этиловый спирт, или раствор ацетата аммония концентрацией 0,2 г/дм^3), кислотой (соляная кислота концентрацией 0,1 моль/дм^3) и щелочью (раствор гидроокиси натрия концентрацией 0,1 моль/дм^3) и сравнивают спектр поглощения красителя со спектром стандарта. Спектры поглощения красителей представлены в приложении С.

Примечание – Участок пластинки с пятном анализируемого красителя осторожно соскабливают скальпелем, помещают в пробирку, добавляют несколько см^3 нейтрального элюирующего раствора (см. выше в 9.7) и энергично встряхивают (если краситель не элюируется, то используют другой раствор из перечисленных выше в 9.7). Отфильтрованный через фильтровальную бумагу или слой ваты раствор помещают в кювету спектрофотометра и регистрируют спектр поглощения в диапазоне длин волн от 350 до 750 нм. Полученный спектр сравнивают качественно со спектрами поглощения стандартных растворов красителей, приведенными в приложении С.

10 Протокол испытаний

В протоколе должны быть указаны:

- вся информация, необходимая для полной идентификации пробы;
- использованный метод отбора проб, если он известен;
- использованный метод анализа со ссылкой на настоящий стандарт;
- все особенности методики, не указанные в настоящем стандарте или считающиеся необязательными, а также все факторы, которые могут повлиять на результат(ы) испытания;
- полученный(е) результат(ы) испытаний.

Приложение А
(справочное)

Синонимы и идентификационные номера синтетических водорастворимых красителей

Таблица А.1

Наименование	Синоним 1	Синоним 2	C.I.[a]	E No.[b]
Тартразин	FD&C Желтый № 5		19140	E102
Хинолиновый желтый			47005	E104
Желтый «солнечный закат» FCF	FD&C Желтый № 6		15985	E110
Амарант	FD&C Красный № 2	Нафтол красный S	16185	E123
Понсо 4R	Новый кокцин	Кошениль красная А	16255	E124
Эритрозин	FD&C Красный № 3		45430	E127
Синий патентованный V			42051	E131
Индигокармин	FD&C Синий № 2		73013	E132
Черный блестящий PN			28440	E151
Черный 7984			27755	E152
Зеленый прочный FCF	FD&C Зеленый № 3		42053	c)
Синий VRS			2045	c)

[a] – C.I. – идентификационный номер согласно Colour Index [4].
[b] – E No. – номер красителя, действующий в странах Европейского экономического сообщества (ЕЭС).
[c] – номер красителя E No. не существует.

Приложение В
(обязательное)

Возможное взаимное влияние красителей

В.1 Красители, не препятствующие обнаружению

Известно, что следующие красители растительного происхождения или растительные экстракты не препятствующие обнаружению по данному методу:

- люцерна
- аннато (биксин и норбиксин)
- антоцианы
- β-каротин
- β-апокаротеналь
- этиловый эфир β-апокаротиновой кислоты
- кантаксантин
- хлорофилл
- медный комплекс хлорофиллина
- эфирное масло паприки
- рибофлавин
- ноготки
- корень свеклы красный
- горчица
- цветок тагетеса
- чай
- томат

В.2 Красители, которые могут препятствовать обнаружению

В некоторых случаях натуральные красители могут препятствовать обнаружению данным методом. В таблице В.2.1 приведено их применение в пищевых продуктах, а также синтетические красители, обнаружению которых эти натуральные красители могут препятствовать.

Таблица В.2.1

Вещество	Применение в пищевых продуктах	Краситель, обнаружению которого препятствует данное вещество
Куркумин	Специи; также используется как желтый краситель	Хинолиновый желтый (Е104) [a] Черный блестящий PN (Е151) [a] Черный 7984 (Е152) [a]
Шафран	Специи (слишком дорогостоящий для использования в качестве красителя)	Эритрозин (Е127) [b] Хинолиновый желтый (Е104) [a], [b] Черный блестящий PN (Е151) [a], [b] Черный 7984 (Е152) [b]
Сафлор	Заменитель шафрана	Тартразин (Е102) [b]

[a] – Влияние можно рассматривать как незначительное.
[b] – Для предотвращения или уменьшения влияния сафлора или шафрана рекомендуется использовать для хроматографирования раствор II (см. 5.18)

Приложение С
(справочное)

Спектры поглощения

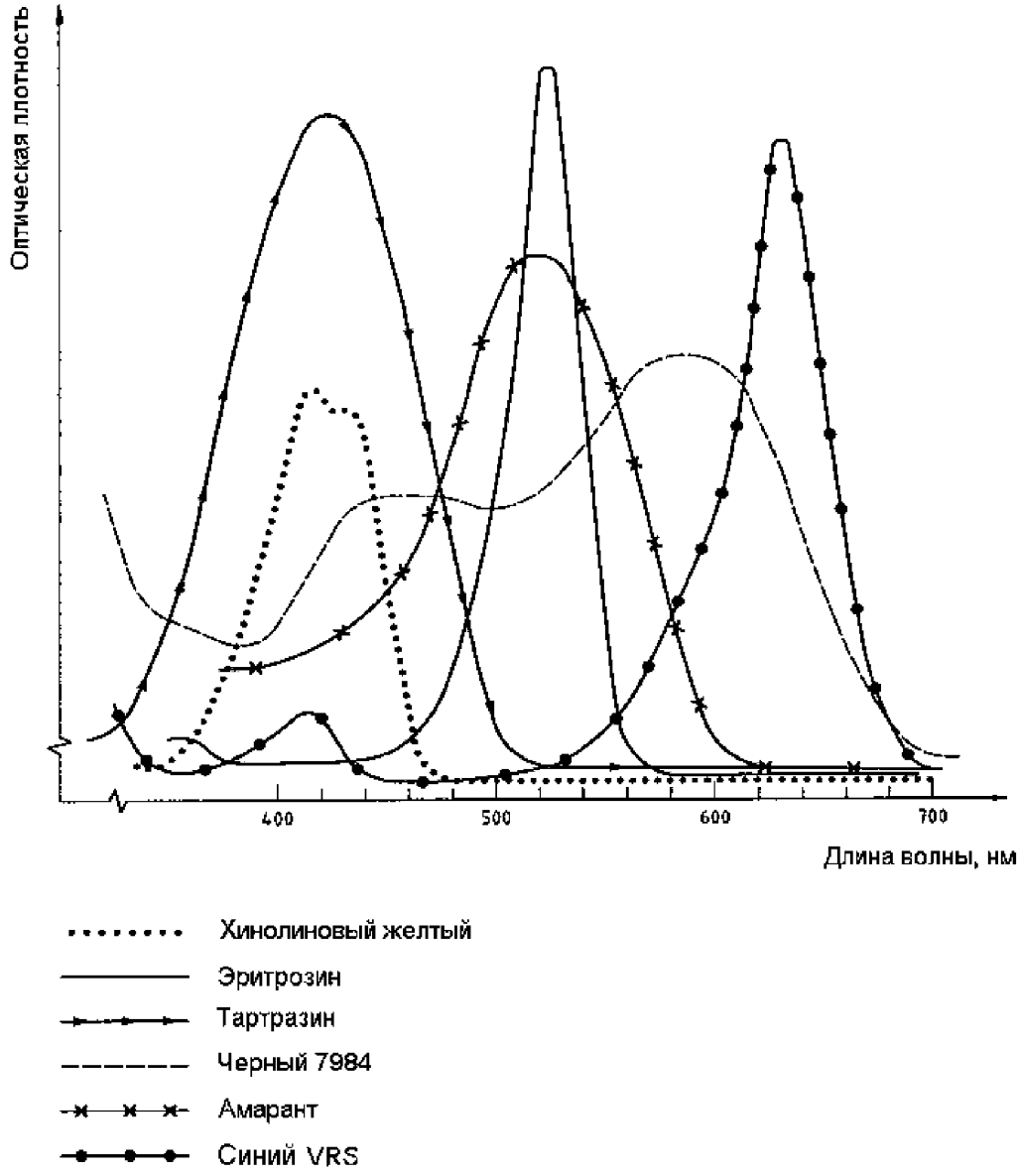

Рис. С.1 – Спектры поглощения амаранта, черного 7984, синего VRS, эритрозина, тартразина и хинолинового желтого

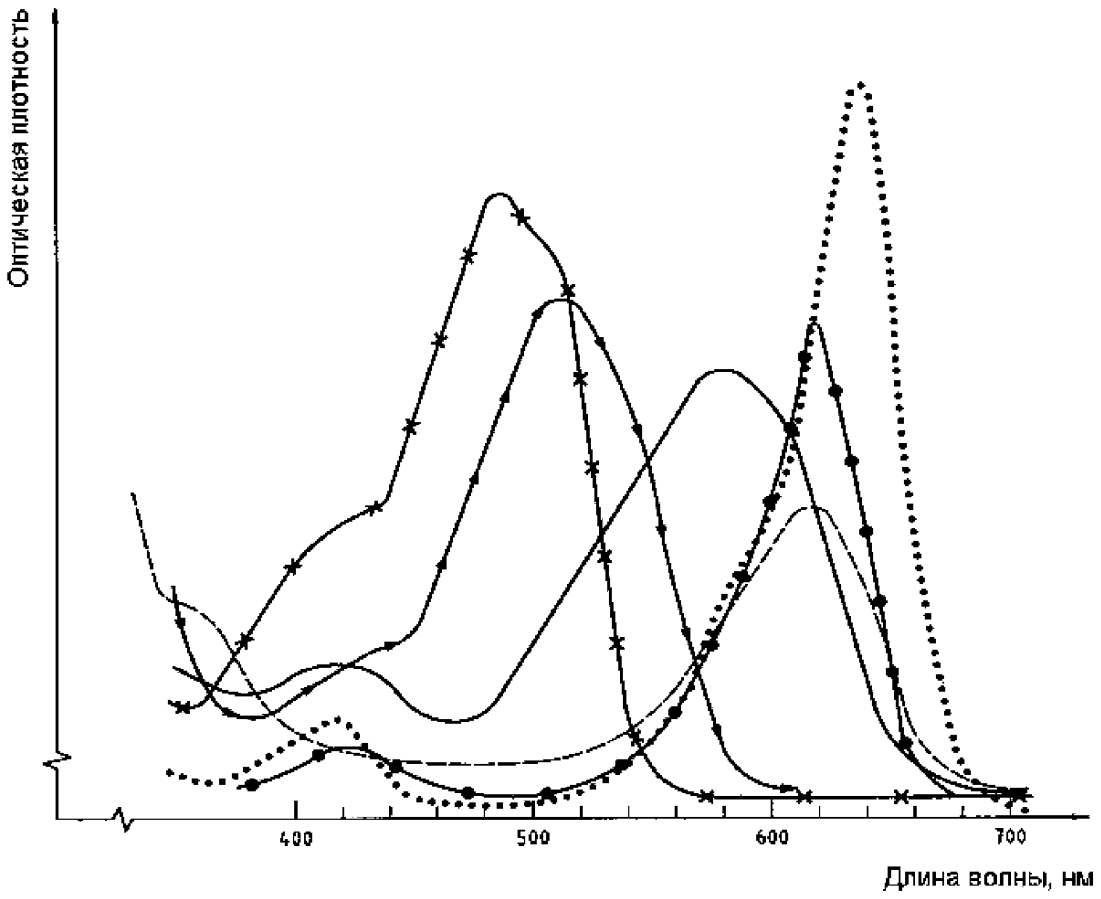

Рис. С.2 – Спектры поглощения черного блестящего PN, зеленого прочного FCF, индигокармина, синего патентованного V, понсо 4R и желтого «солнечный закат» FCF

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 3696:1987	MOD	ГОСТ Р 52501-2005 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия
AOAC 46.1.08:1995	–	*

* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание – В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

MOD – модифицированные стандарты.

Библиография

[1] ISO 3100-1, *Meat and meat products – Sampling and preparation of test samples – Part 1: Sampling (ИСО 3100-1, Мясо и мясные продукты – Отбор и подготовка проб – Часть 1: Отбор проб)*

[2] ISO 4793, *Laboratory sintered (fitted) filters – Porosity grading, classification and designation (ИСО 4793, Фильтры лабораторные спечённые (фриттованные) – Классы пористости, классификация и обозначения)*

[3] *Colours, synthetic, water-soluble. Semi-quantitative determination by chromatography and spectrophotometry,* Nordic Committee on Food Analysis (NMKL), No. 134, 1990

[4] Colour Index, 3rd edition, 1971

УДК 637.5:543.06:006.034 ОКС 67.120.10

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, синтетические водорастворимые красители, обнаружение, метод тонкослойной хроматографии

Подписано в печать 05.11.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 58 экз. Зак. 4627.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru