

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ М.И. Римжа  
«\_\_5\_\_» января \_\_\_\_\_ 2007 г.  
Регистрационный №\_\_108-1006

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ В  
КОНДИТЕРСКИХ И ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЯХ, МОЛОЧНЫХ  
ПРОДУКТАХ, СОКАХ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ И ПИЩЕ-  
ВЫХ ДОБАВКАХ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр гигиены»

Авторы: Шуляковская О.В., Бельшева Л.Л., Резникова Л.Г.

## 1 Область применения

Настоящая Инструкция устанавливает методику идентификации и выполнения измерений массовых концентраций (далее - концентрации) синтетических красителей, разрешенных для использования в пищевых продуктах - индигокармина, желтый «Солнечный закат», тартразина, понсо 4R, азорубина в кондитерских и хлебобулочных изделиях, молочных продуктах, соках, биологически активных и пищевых добавках с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием диодно-матричного детектора.

Настоящая Инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, для научно-исследовательских и других заинтересованных организаций.

## 2. Краткая характеристика исследуемых веществ

Индигокармин или E132  $C_{16}H_8N_2O_2(SO_3Na)_2$ . Молекулярная масса – 466,37. Синие кристаллы с металлическим блеском. Растворимость в воде: 1,5 г на 100 г воды при 25°C. Стабилен при pH 3 - 7.

Жёлтый «Солнечный закат» или E110  $C_{16}H_{10}N_2O(SO_3Na)_2$ . Молекулярная масса – 452,1. Оранжево-красный порошок или гранулят. Растворимость в воде: 12 г на 100 г воды при 25°C. Стабилен при pH 3 - 8.

Тартразин или E102  $C_{16}H_{13}N_4O_3Na(SO_3Na)_2$ . Молекулярная масса – 538,11. Желтый порошок или гранулят. Растворимость в воде: 14 г на 100 г воды при 25°C. Стабилен при pH 3 - 8.

Понсо 4R или E124  $C_{20}H_{11}N_2O(SO_3Na)_3$ . Молекулярная масса – 604,18. Красный порошок или гранулят. Растворимость в воде: 14 г на 100 г воды при 25°C. Стабилен при pH 3 - 8.

Азорубин E122 – динатрий 4-гидрокси-3-(4-сульфонато-1-нафтилазо)-1-нафталинсульфонат. Эмпирическая формула  $C_{20}H_{12}N_2O_7S_2Na_2$ . Молекулярный вес 502,43. Темно-красный порошок или гранулы; в воде образует красный раствор. Светостойкость, термостойкость (до 150°C) и кислотостойкость азорубина хорошие (в т.ч. по отношению к фруктовым кислотам). Устойчивость к щелочам умеренная. Цвет азорубина зависит от качества воды и колеблется между голубовато-красным и желтовато-красным.

В соответствии с «Гигиеническими требованиями к качеству и безопасности пищевых добавок и их применению», санитарные правила и нормы 13-10 РБ 2002, утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 28

ноября 2002 г. № 94, максимально допустимый уровень (далее - МДУ) красителей в кондитерских и хлебобулочных изделиях – 200 мг/кг, джемы, желе, мармелады – 100 мг/кг; в молочных продуктах: мороженое – 150 мг/кг, плавленый сыр – 100 мг/кг, молочные десерты – 150 мг/кг; добавки к пище – 100 мг/кг.

### 3. Принцип метода определения и его метрологические характеристики

Методика определения основана на анализе красителей после экстракции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием обращенно-фазовой колонки Hypersil BDS (C<sub>18</sub>) размером 125 мм x 4 мм и диодно-матричного детектора при длинах волн 350 нм (определение индигокармина), 450 нм (определение тартразина), 500 нм (определение желтого «Солнечный закат», понсо 4R, азорубин). В качестве подвижной фазы используется буферный раствор ион-парного реагента. Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение - методом абсолютной калибровки.

Интервал определяемых концентраций 10-200 мг/дм<sup>3</sup>. Линейный диапазон градуировочных графиков 1,0 мкг/см<sup>3</sup> – 10,0 мкг/см<sup>3</sup>.

Нижний предел измерения составляет 0,02 мкг каждого красителя в анализируемом объеме пробы (0,02 см<sup>3</sup>).

Метрологические значения методики характеризуются согласно приложению 1 (таблицы 1, 2).

## 4 Средства измерений, вспомогательные устройства,

реактивы и материалы

### 4.1 Средства измерений

Жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим или диодно-матричным детектором

Обеспечивающий выполнение измерений в диапазоне 200-550 нм

Кран-дозатор с петлей на 0,02 см<sup>3</sup>

Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г

ГОСТ 24104-2001

Колбы мерные

2-100-2

ГОСТ 1770-74Е

2-1000-2

Колба круглодонная

К-1-2000-29/32

ГОСТ 25336-82

Стакан химический

1-250

ГОСТ 1770-74

Пипетки градуированные

1-2-2-1

ГОСТ 29227-91

1-2-2-10

Цилиндры мерные	2-50 2-100	ГОСТ 1770-74E
-----------------	---------------	---------------

#### 4.2 Вспомогательные устройства

Колонка хроматографическая размером 125 мм х 4мм		Hypersil BDS (C <sub>18</sub> )
Плитка электрическая		ГОСТ 14919-83E
Фильтр «синяя лента» Ø 12,5 мм		ГОСТ 12026-76
Барометр		ТУ 2504-1797-75

#### 4.3 Реактивы

Вода дистиллированная, хч		ГОСТ 6709-72
Перманганат калия KMnO <sub>4</sub> , хч		ГОСТ 20490-75
Ацетонитрил для ВЭЖХ		
Дигидрофосфат натрия NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , хч		
Гексадецил-3-метиламмония бромид C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> NBr <sub>2</sub> , хч		
Набор красителей:		
Индигокармин	с содержанием основного вещества не менее 95,0 %	
Желтый «Солнечный закат»	с содержанием основного вещества не менее 90%	
Тартразин	с содержанием основного вещества не менее 94,6%	
Понсо 4R	с содержанием основного вещества не менее 75%	
Азорубин, хч	с содержанием основного вещества не менее 50%	

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства по точности, не уступающие рекомендуемым, а также реактивы не ниже указанной чистоты.

#### 5 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».

## 6 Требования к квалификации оператора

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

## 7 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  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ ;
- температура воздуха при выполнении измерений  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ ;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха не более 80% при температуре  $25^\circ\text{C}$ ;
- напряжение питающей сети  $(220 \pm 22)$  В;
- частота переменного тока  $(50 \pm 1)$  Гц

## 8 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление буферного и градуировочных растворов, построение градуировочного графика, отбор и подготовка проб к анализу.

### 8.1 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 30-40 мин.

### 8.2 Приготовление растворов и реактивов

#### Получение бидистиллированной воды

Собирают установку для дистилляции воды, состоящую из круглодонной колбы (объем  $2 \text{ дм}^3$ ), прямого холодильника и приемной колбы. В круглодонную колбу наливают  $1,5 \text{ дм}^3$  дистиллированной воды, добавляют 10 г  $\text{KMnO}_4$  и центры кипения. Нагревание воды проводят на электрической плитке с закрытой спиралью. Полученную бидистиллированную воду хранят не более 1 месяца.

#### Приготовление буферного раствора А

Взвешивают  $1,3 \pm 0,001$  г дигидрофосфата натрия и  $1,0 \pm 0,001$  г гексадецил-3-метиламмонийромида, растворяют в  $200-300 \text{ см}^3$  бидистиллированной воды в мерной колбе на  $1000 \text{ см}^3$ , доводят объём бидистиллированной водой

до метки перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в плотно закрытой стеклянной таре. Годен в течение месяца.

### 8.3 Приготовление стандартных растворов смеси пяти красителей

Приготовление основного стандартного раствора смеси пяти красителей массовой концентрацией  $100 \text{ мкг/см}^3$

Навеска красителя для приготовления основного стандартного раствора рассчитывается с учетом содержания основного действующего вещества согласно сертификату фирмы, таким образом, чтобы конечное содержание каждого красителя в смеси основного стандартного раствора составляла  $100 \text{ мкг/см}^3$ . Например:

Индигокармин – содержание основного действующего вещества 95 %, следовательно, масса навески  $0,105 \text{ г} \pm 0,001\text{г}$ ;

Желтый «Солнечный закат» - содержание основного действующего вещества 90 %, следовательно, масса навески  $0,110 \text{ г} \pm 0,001\text{г}$ ;

Тартразин - содержание основного действующего вещества 94,6 %, следовательно, масса навески  $0,106 \text{ г} \pm 0,001\text{г}$ ;

Понсо 4R - содержание основного действующего вещества 75,0 %, следовательно, масса навески  $0,130 \text{ г} \pm 0,001\text{г}$ ;

Азурubin - содержание основного действующего вещества не менее 50 % взвешивают  $0,2 \pm 0,001 \text{ г}$  красителя.

Навески красителей помещают в мерную колбу, вместимостью  $1000 \text{ см}^3$ , добавляют  $200\text{-}300 \text{ см}^3$  бидистиллированной воды, перемешивают и, после растворения, доводят объём бидистиллированной водой до метки и перемешивают. Годен в течение 7 суток.

Приготовление рабочего стандартного раствора смеси пяти красителей массовой концентрацией  $10 \text{ мкг/см}^3$

$10 \text{ см}^3$  основного раствора переносят в мерную колбу на  $100 \text{ см}^3$  и доводят бидистиллированной водой до метки.

Приготовление градуировочных растворов смеси пяти синтетических красителей

Градуировочные растворы смеси пяти синтетических красителей готовят по схеме, представленной в таблице 1.

Аликвотные части рабочего стандартного раствора пяти синтетических красителей массовой концентрацией  $10 \text{ мкг/см}^3$  переносят в мерные колбы объемом  $100 \text{ см}^3$  и доводят до метки бидистиллированной водой.

Каждый градуировочный раствор готовится и хроматографируется не менее трех раз с интервалом в 1 день.

Таблица 1 – Схема приготовления градуировочных растворов

№ градуировочного раствора	Концентрация каждого синтетического красителя в градуировочном растворе, мкг/см <sup>3</sup>	Аликвотная часть рабочего стандартного раствора смеси пяти синтетических красителей, см <sup>3</sup>
1	1,0	10
2	2,0	20
3	5,0	50
4	10,0	-

#### 8.4 Установление градуировочной характеристики

Каждый градуировочный раствор хроматографируют по два раза, начиная с самой низкой концентрации, принимая за результат измерения среднее арифметическое двух параллельных измерений. Условия хроматографирования при анализе синтетических красителей:

Объем вводимой пробы	0,02 см <sup>3</sup>
Состав подвижной фазы: А – буферный раствор; В- ацетонитрил	
Скорость потока элюента	0,7 мл/мин

Условия градиентного элюирования представлены в таблице 2.

Таблица 2- Условия градиентного элюирования

Время анализа, мин.	Состав подвижной фазы, %	
	А- буферный р-р.	В-ацетонитрил
0	85	15
1	85	15
12	30	70
15	10	90
22	85	15

Время выхода красителей устанавливают при проведении градуировочных работ. Для этого наилучшей концентрацией является 5,0 мкг/см<sup>3</sup>.

Хроматограмма, на которой виден порядок выхода красителей, приводится в приложении 2.

В таблице 3 указаны относительные времена выхода красителей.

Таблица 3 – Относительные времена выхода красителей

Наименование красителя	Длина волны поглощения, нм	Время выхода, мин
Индигокармин	350	13,5 ± 0,15
Желтый «Солнечный закат»	500	13,8 ± 0,15
Азорубин	500	14,6 ± 0,15
Тартразин	450	15,0 ± 0,15
Понсо 4R	500	15,6 ± 0,15

### 8.5 Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика измеряют площади пиков, соответствующие концентрациям красителей 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 синтетических красителей;
- $X$ - концентрация синтетических красителей в градуировочном растворе;
- $a$  и  $b$ - коэффициенты регрессии.

Возможен компьютерный вариант построения калибровочных графиков.

### 8.6 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 красителей. Полученные при хроматографировании значения  $Y$  не должны отклоняться от градуировочной прямой более чем на: 5,34% для индигокармина; 2,96 % для желтого «Солнечный закат»; 1,86 %; для тартразина; 2,97 % для понсо 4R, 1,44 % для азорубина.

В противном случае необходимо построение нового градуировочного графика не менее чем по 5 точкам.

### 8.7 Отбор проб

Отбирают не менее 1 кг каждого наименования исследуемого продукта в соответствии с требованиями СТБ 1036-97 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности».

## 8.8 Подготовка анализируемых образцов

Кондитерские и хлебобулочные изделия (сухари, мармелад, зефир и т.п.)

Отбирают среднюю пробу массой 1,0 – 10,0 г, помещают в коническую колбу объемом 250 см<sup>3</sup>, добавляют 60-80 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Колбу устанавливают на перемешивающее устройство для экстракции в течение 60 минут, затем содержимое количественно переносят в колбу на 200 см<sup>3</sup>, доводят водой до метки и оставляют на 20 - 24 часа для более полного извлечения красителей. Раствор перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента». Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см<sup>3</sup>.

Крем кондитерский и др. продукты с содержанием жира более 40 %

Отбирают среднюю пробу массой 2,0 – 10,0 г помещают в химический стакан объемом 50 см<sup>3</sup>, затем растворяют в 20 см<sup>3</sup> гексана и количественно переносят в делительную воронку. Добавляют 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и встряхивают в течение 1-2 мин. После разделения слоев водный слой фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента». Органический слой отбрасывают. Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см<sup>3</sup>.

Молоко и молочные продукты

Отбирают среднюю пробу массой 8,0 - 10,0 г помещают в центрифужные пробирки вместимостью 25 см<sup>3</sup>, добавляют ацетонитрил до отметки 25 см<sup>3</sup>. Пробирки закрывают пробками, интенсивно встряхивались в течение 1-2 минут, затем помещают в лабораторную центрифугу для центрифугирования. Условия центрифугирования: скорость - 5 - 5,5 тыс. оборотов в мин.; время – 20 мин. Затем отбирают верхний слой, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см<sup>3</sup>.

Соки

Средняя проба анализируемого образца объемом 200-300 см<sup>3</sup> термостатируется при температуре 20 ± 2°C в течение 30 мин и тщательно перемешивается. Отбирается 10 см<sup>3</sup> образца, вносится в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и доводится водой до метки. Раствор перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента». Полученный фильтрат повторно фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см<sup>3</sup>.

### Биологически активные и пищевые добавки

Отбирают среднюю пробу массой 0,5 – 2,0 г помещают в химический стакан, вместимостью 50 см<sup>3</sup>, приливают 25 – 30 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и перемешивают содержимое до полного перехода окраски в экстрагирующий раствор. Затем количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup>, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента». Полученный фильтрат повторно фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Подготовленную пробу вводят в хроматограф в количестве 0,02 см<sup>3</sup>.

### 9 Выполнение измерений

Анализ полученных по п. 8.8 образцов проводится на жидкостном хроматографе. Условия хроматографирования такие же, как и при построении градуировочного графика п. 8.4. Определяют площади пиков, используя компьютерную систему обработки сигналов. Проводят анализ двух параллельных проб. Каждую пробу хроматографируют не менее двух раз.

### 10 Обработка результатов измерений

Количество (X мг/дм<sup>3</sup>) каждого красителя в исследуемой пробе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V_2 \times C}{V_1 (m_1)}, \quad (2)$$

где: V<sub>1</sub> (m<sub>1</sub>) – объем (масса) пробы, взятый для анализа, см<sup>3</sup>;

V<sub>2</sub> – объем пробы после разбавления, см<sup>3</sup>;

C - концентрация красителя, рассчитанная по градуировочному графику, мкг/см<sup>3</sup>.

Коэффициент перевода мкг/см<sup>3</sup> в мг/дм<sup>3</sup> (мг/кг) равен 1.

За результат анализа принимают среднее арифметическое из концентраций каждого красителя, найденное в двух параллельных пробах. Вычисление проводят до второго знака с последующим округлением до первого знака после запятой.

Допустимое расхождение между параллельными измерениями не должно превышать для красителя

Индигокармин - 1,94%

Желтый «солнечный закат» – 1,97%

Тартразин – 2,0%

Понсо 4R – 2,1%

Азорубин – 2,2 %

Гарантированный результат анализа, (X), представляют в следующем виде:

$$X_i = X_{cp} \pm DMВИ \quad (3)$$

$$X_{cp} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (4)$$

где: *DMВИ* – показатель точности (пределы, в которых находится погрешность методики)

- $X_1$  – значение в первом параллельном опыте;
- $X_2$  – значение во втором параллельном опыте;
- $X_{cp}$  – среднее значение, найденное по результатам двух параллельных опытов.

Приложение 1  
к Инструкции по применению

«Методика определения синтетических красителей в кондитерских и хлебобулочных изделиях, молочных продуктах, соках, биологически активных и пищевых добавках с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии»

При доверительной вероятности  $P=0,95$  относительные суммарные погрешности измерения, границы неисключенных систематических погрешностей, доверительные границы случайной погрешности в диапазоне определяемых концентраций 10-200 мг/дм<sup>3</sup> приведены в таблице 1.

Значения точностных параметров методики представлены в таблице 2.

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

Наименование красителя	Диапазон измерений, мг/дм <sup>3</sup>	Показатель повторяемости (СКО повторяемости), $\delta_r$ , %	Показатель воспроизводимости (СКО воспроизводимости), $\delta_R$ , %	Показатель правильности (границы, в которых находится неисключенная систематическая погрешность), $\pm\Delta_c$ , %	Показатель точности (границы, в которых находится погрешность методики), $\pm\Delta$ , %
Индигокармин	10-200	2,0	6,1	8,7	12,1
Желтый «Солнечный закат»	10-200	2,0	5,6	11,9	14,3
Тартразин	10-200	2,0	6,5	7,05	11,4
Понсо 4R	10-200	2,1	6,2	11,9	14,5
Азорубин	10-200	2,2	5,04	11,4	13,4

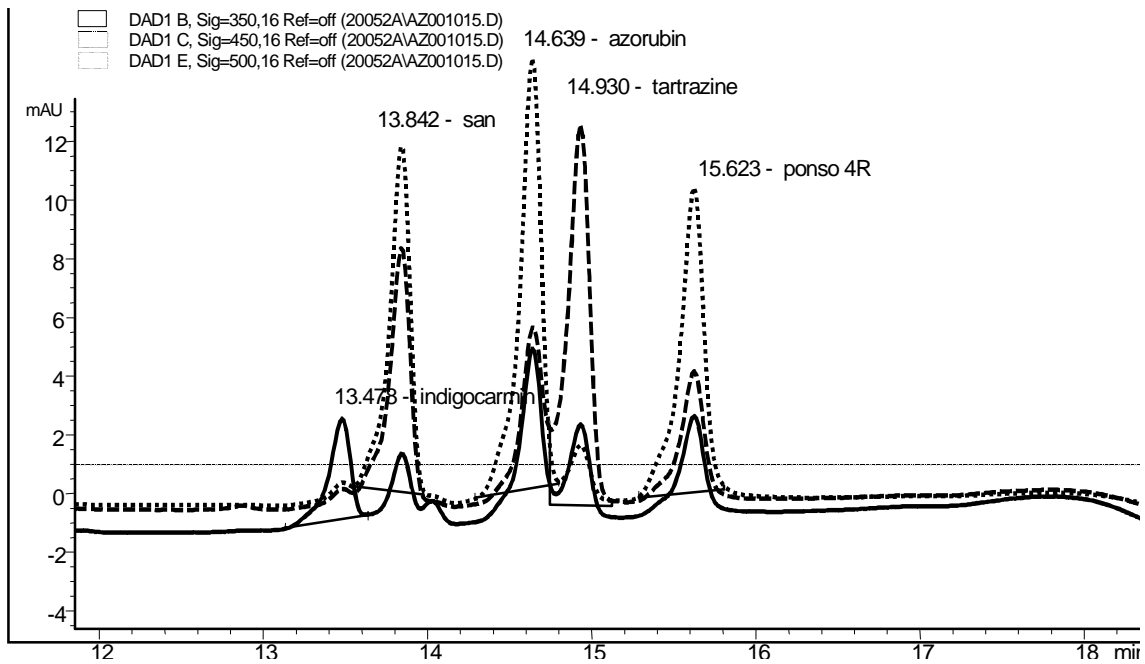
Таблица 2 - Значения точностных параметров

Параметры точности,	Инди- гокар- мин E132	«Сол- нечный закат» E110	Тар- тразин E102	Понсо 4R E124	Азору- бин E122
Число параллельных определений, n	2	2	2	2	2
Допустимые расхождения между результатами в разных лабораториях, %	24,2	28,6	22,8	29,0	28
Погрешность градуировочного графика, %	5,34	2,96	1,86	2,97	1,4
Предел повторяемости $r_{n,m}$ %	5,4	5,5	5,5	5,8	6,1
Предел воспроизводимости $R_{n,m}$ %	17,0	15,6	18,0	17,3	14,0
Норматив точности $K$	17,1	20,2	16,1	20,5	18,9

Приложение 3  
к Инструкции по применению

«Методика определения синтетических красителей в кондитерских и хлебобулочных изделиях, молочных продуктах, соках, биологически активных и пищевых добавках с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии»

Хроматограмма стандартной смеси 5-х красителей 5 мкг/см<sup>3</sup>



- 1- индигокармин – 350 нм ( $13,5 \pm 0,15$  мин)
- 2- желтый «Солнечный закат» - 500 нм ( $13,8 \pm 0,15$  мин)
- 3- азорубин – 500 нм ( $14,6 \pm 0,15$  мин)
- 4- тартразин – 450 нм ( $14,9 \pm 0,15$  мин)
- 5- понсо4R – 500 нм ( $15,6 \pm 0,15$  мин)

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция подготовлена в ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.
2. Настоящая Инструкция утверждена постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от №
3. Введена впервые