

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

УДК 664.841/851.543:006.354

H59

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

ОКС 19.020; 67.080.01

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Научно-исследовательским государственным предприятием "Стандартплодовоощ", 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, мензуры, 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

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. Бюretki. 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, снаженный 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.

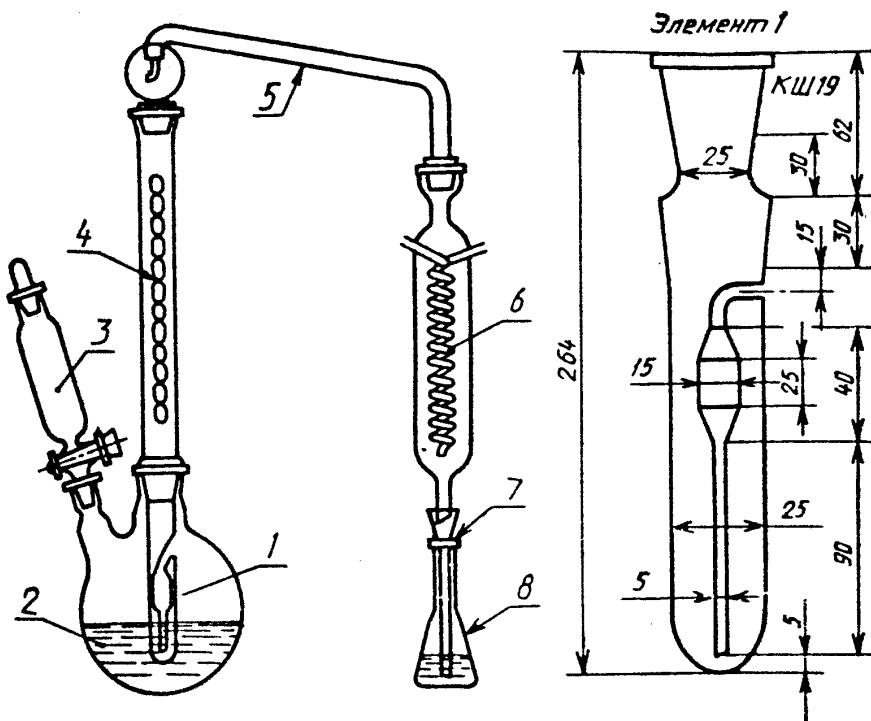
Установка для перегонки (рисунок 1), состоящая из:

- сосуда для перегонки;
- колбы круглодонной типа КГУ-2 с взаимозаменяемым конусом и конусом центральной горловины 29/32, вместимостью 1000 или 2000 cm^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 cm^3 по ГОСТ 25336;
- колбы приемной – колбы мерной вместимостью 100 cm^3 по ГОСТ 1770.

Колба мерная вместимостью 250 cm^3 по ГОСТ 1770.

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

Бюretka исполнения 1, 2 или 3, вместимостью 25 cm^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/дм³.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, х.ч., раствор с массовой долей 20% и раствор с концентрацией 0,1 моль/дм³.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х.ч., раствор с массовой концентрацией 49 г/дм³.

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/дм³ и раствор с массовой долей 4%.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается использование другой аппаратуры, материалов и реагентов 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 см³ 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 см³ раствора уксусной кислоты с (CH₃COOH) = 0,1 моль/дм³, наполняют двугорлую колбу на 3/4 объема раствором хлористого натрия

и далее осуществляют отгонку, как указано в п.4.4.1. После получения 100 см³ 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 см³ 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 см³. Перегонку заканчивают после получения 95 см³ дистиллята.

4.4.2 Объем дистиллята доводят до 100 см³ 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 см³ раствора в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки водой (коэффициент разбавления $k = 2$), для разбавления в 5 раз отбирают пипеткой 20 см³ раствора в мерную колбу на 100 см³ 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 см³;

M – масса навески продукта, г;

k – коэффициент разбавления раствора;

489; 37,8; 1451; 379 – расчетные коэффициенты, г/дм³.

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 высокоеффективной жидкостной хроматографии

5.1 Сущность методики

Методика основана на извлечении бензойной и сорбиновой кислот из продукта водой с последующим анализом аликовотной части водного раствора методом высокоеффективной 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.

Микрошлизы для жидкостной хроматографии на 0,05 см³.

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 см³.

Воронки делительные вместимостью 500,0 см³ по ГОСТ 25336-82.

Цилиндры мерные по ГОСТ 1770.

Колонка хроматографическая размером 125x4 мм, зернение частиц 5 мкм, фирмы Hypersil ODS (C₁₈).

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/дм³.

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) °C;
- атмосферное давление 84,0 – 106,7 кПа;
- влажность воздуха – не более 80% при температуре 25 °C;
- 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 см³ воды в мерной колбе вместимостью 1000 см³, 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 дм³ помещают 1,5 дм³ ацетонитрила и (30,00 ± 0,005) г калия марганцевокислого, кипятят с обратным холодильником 1 ч и перегоняют с дефлегматором, отбирая фракции по 200 см³. Первую фракцию отбрасывают, остальные собирают. Перегонку прекращают, когда в колбе останется 200 см³ 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/см³**

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят ($0,01 \pm 0,00015$) 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/см³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят ($0,005 \pm 0,00015$) 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 аликовотные части основных растворов бензойной и сорбиновой кислот, сливают в мерные колбы вместимостью 100 см³ и доводят водой до метки.

Таблица 1

Номер градуировочного раствора	Концентрация сорбиновой кислоты в градуировочном растворе, мкг/см ³	Аликовотная часть стандартного раствора сорбиновой кислоты, см ³	Концентрация бензойной кислоты в градуировочном растворе, мкг/см ³	Аликовотная 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/см³ для бензойной кислоты и от 0,25 до 20,0 мкг/см³ 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 b прямой $Y = a + bX$ 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

$$Y = a + bX, \quad (3)$$

где Y – площадь пика бензойной (сорбиновой) кислоты;

X – концентрация бензойной (сорбиновой) кислоты;

a и b – 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 – $(5,000 \pm 0,005)$ г;
- плодовоощные консервы – $(2,000 \pm 0,005)$ г.

Навеску переносят в мерную колбу вместимостью 200 см³, 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 таблице 1 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 $\text{мкг}/\text{см}^3$, найденная по градуировочному графику или рассчитанная по регрессионной зависимости уравнения градуировочного графика $Y = a + bX$, откуда

$$X = (Y - a) / b, \quad (5)$$

где X – искомая концентрация C ;

Y – площадь пика бензойной (сорбиновой) кислоты;

a и b – 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

$$X = \bar{X} \pm \Delta MVI, \quad (6)$$

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

ΔMVI – 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 $\Delta 50 \%$.

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.

Микрошиприцы 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 см³ по ГОСТ 25336.

Колбы остродонные с взаимозаменяемым конусом 14/23, вместимостью 100, 50 и 25 см³ по ГОСТ 25336.

Стаканы по ГОСТ 25336.

Пробирки с притертыми пробками, вместимостью 10 см³ по ГОСТ 25336.

Пипетки типа 3 исполнения 1, 1-го класса точности, вместимостью 1, 10, 20, 25 см³ по ГОСТ 29227.

Бюретка исполнения 1, 2 и 3, вместимостью 25 см³ 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/дм³.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166, ч.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч.д.а., раствор с концентрацией 1 моль/дм³.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, ч.д.а.

Допускается использование другой аппаратуры, материалов и реагентов 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 ($0,1 \pm 0,00015$) г бензойной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят до метки этилацетатом (концентрация полученного раствора 4 мг/см³).

Раствор 2. Взвешивают ($0,04 \pm 0,00015$) г сорбиновой кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки этилацетатом (концентрация полученного раствора 0,4 мг/см³).

Раствор 3. Смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Концентрация бензойной кислоты в полученном растворе 2,0 мг/см³, сорбиновой кислоты – 0,2 мг/см³.

Растворы хранят при температуре не выше 5 °C 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 см³ раствора гидроокиси натрия с концентрацией 1 моль/дм³. Если пробы 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 см³ 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 см³ 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 см³ этилацетата, которые тоже фильтруют в отгонную колбу. Экстракт упаривают на ротационном испарителе досуха. Остаток в отгонной колбе растворяют в 1 см³ 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 см³ 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 см³ 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 °C. Остаток в отгонной колбе растворяют в 1 см³ этилацетата.

6.4.2 Хроматографирование

В хроматографическую камеру заливают смесь подвижных растворителей: петролейный эфир, хлороформ, дистилловый 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.

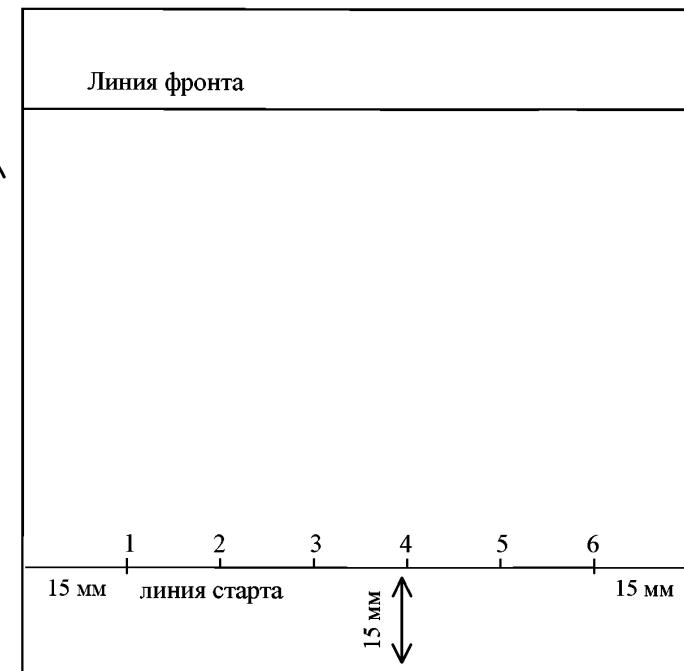


Рисунок 2 – Схема нанесения пробы и стандартных растворов на хроматографическую пластинку

6.5 Обработка результатов

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

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

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.

СТБ 1181-99

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 высокоеффективной 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 "Сорб菲尔"
- [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