

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Аналитического комплекта Пищевые
добавки 2

Синтетические пищевые красители

Ошибка! Используйте вкладку "Главная" для применения Heading 1 к тексту, который должен здесь отображаться.

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении пищевых красителей в биологически активных добавках к пище. В Инструкции также изложены рекомендации по работе с анализируемыми пробами, соблюдение которых повышает степень извлечения определяемых компонентов.

Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям, относящимся к работе с Аналитическими комплектами.

I. Цель и назначение Аналитического комплекта *Синтетические пищевые красители*

I.1. Цель выпуска комплекта СПК

Целью выпуска Аналитического комплекта *Синтетические пищевые красители (СПК)* является обеспечение идентификации и количественного определения методами ТСХ и ВЭЖХ важнейших пищевых красителей, предельно-допустимые уровни содержания которых в качестве биологически активных добавок к пище (БАД) регламентированы основным документом СанПиН 2.3.2.1293-03 “Гигиенические требования по применению пищевых добавок”.

I.2. Назначение комплекта СПК

Аналитический комплект предназначен для подготовки проб водорастворимых твердых и жидких БАД, БАД с высоким содержанием жира; с высоким содержанием крахмала и белка, а также их качественного и количественного анализа методами жидкостной хроматографии (ТСХ со спектрофотометрией или ВЭЖХ) в полном соответствии с нормативным документом (далее, “Руководство”):

– Руководство Р 4.1.1672-03 “Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище”, МЗ России, 2004 г.

1.3. Особенности комплекта СПК

В основу подготовки проб положена приведенная в “Руководстве” селективная твердофазная экстракция СПК на полиамидном сорбенте, реализованная на патроне Диапак ПА-3. Проведение ВЭЖХ-анализа без предварительной подготовки проб следует признать ошибочным, т.к. это приводит к быстрому выходу из строя ВЭЖХ-колонки (предколонки), а также к непредсказуемому появлению на текущих хроматограммах пиков окрашенных веществ от предыдущего анализа. Метод изократического ВЭЖХ-анализа пищевых красителей, кратко описанный в “Руководстве” (с.184), рассчитан на применение обращенно-фазовой колонки, работающей в ион-парном режиме элюирования в системе ацетонитрил-фосфатный буфер с pH 4.2 = (45:55) и присутствии солей тетрабутиламония. Но реализация метода контроля качества продуктов питания, содержащих смеси красителей, затруднена из-за недостаточного разрешения отдельных пиков красителей – “критических пар”.

Метод ВЭЖХ-анализа пищевых красителей, реализованный в Аналитическом комплекте, обладает следующими характерными особенностями:

- ⇒ Подготовка проб методом твёрдофазной экстракции (ТФЭ) на регенерируемых патронах Диапак ПА-3;
- ⇒ Подготовленные пробы идеально подходят для определения качественного состава СПК методом ТСХ на пластинах с силикагелем (с.181), а также для количественного определения методом ТСХ на пластинах с целлюлозой и с последующей спектрофотометрией элюатов зон (с.184);

-
- ⇒ ВЭЖХ-анализ целевых компонентов проб в градиентном режиме, позволяющем использовать различные жидкостные хроматографы, снабжённые спектрофотометрическими детекторами на видимую область спектра, включая также и отечественные: “Милихром-5” и “Орлант”;
- ⇒ Детектирование СПК во всех случаях осуществляется в видимой области спектра на длинах волн ~420 (тартазин и др. желтые), ~520 (амарант и др. красные) и ~620 нм (индигокармин и др. синие).

II. Состав комплекта¹ СПК

1. Концентрирующие патроны ДИАПАК ПА-3 (5 шт.) для пробоподготовки методом твердофазной экстракции (ТУ 4215-002-05451931-94), обеспечивающие подготовку 100 единичных проб.
2. Набор стандартных образцов пищевых красителей по 0,2 г:
 - Тартазин (Е 102);
 - Хинолиновый желтый (Е 104);
 - Желтый “Солнечный закат” (Е 110);
 - Амарант (Е 123);
 - Эритрозин (Е 127);

¹ Примечание.

Общелабораторное оборудование и растворители в состав аналитического комплекта не входят, их варианты приведены в Руководстве Р 4.1.1672-03.

- Красный “Очаровательный” (Е 129);
 - Синий патентованный (Е 131);
 - Индигокармин (Е 132);
 - Синий блестящий (Е 133).
3. Ион-парный реагент – ТВАНС (тетрабутиламмоний гидросульфат), 10 г;
4. Аналитическая колонка ДИАСФЕР-110 С16 (ТУ 4215-001-05451931-94), 5-7 мкм, для ВЭЖХ-анализа, одного из двух типоразмеров:
- 4×150 мм - для любых моделей импортных жидкостных хроматографов;
 - 2×80 мм - для микроколоночных отечественных хроматографов “Милихром-5” и “Орлант”.
5. Инструкция по применению комплекта *Синтетические пищевые красители*.

III. Порядок проведения пробоподготовки

III.1. Подготовка к проведению определения

III.1.1. Приготовление элюентов для хроматографического анализа

⇒ Приготовить 0,01М водный раствор ТВАНС, для чего навеску 3,4 г ион-парного реагента растворить в 1000 мл бидистиллированной воды в мерной колбе и тщательно перемешать (*элюент А*);

- ⇒ Приготовить 0,01М водно-ацетонитрильный (75:25) раствор ТВАНС, для чего навеску 3,4 г ион-парного реагента растворить в 1000 мл смеси (3:1) вода-ацетонитрил (*элюент В*);
- ⇒ Приготовить 0,01М водно-ацетонитрильный (50:50) раствор ТВАНС, для чего навеску 3,4 г ион-парного реагента растворить в 1000 мл смеси (1:1) вода-ацетонитрил (*элюент С*);
- ⇒ Все элюенты профильтровать через мембранные фильтры с размером пор около 0,5 мкм.

III.1.2. Подготовка патрона Диапак ПА-3

- ⇒ Снять с патрона заглушки, смочить сорбент 7-10 мл дистиллированной воды, подкисленной уксусной кислотой до pH 4,0, закрыть верхней крышкой и суспендировать сорбент легким переворачиванием патрона, после чего закрепить его в вертикальном положении и дать сорбенту отстояться;
- ⇒ Самотеком или при слабом вакуумировании прокачать избыток элюента, оставив около 1 см над слоем сорбента.

III.2. Отбор и предварительная подготовка проб

- ⇒ Навеску 2,5 г твердого водорастворимого образца перенести в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл, добавить примерно 25 мл кипящей воды и встряхивать до полного растворения образца (в случае жидкого образца отобрать 25,0 мл), а затем перенести на патрон Диапак ПА-3;

⇒ БАД с высоким содержанием жира обезжирить при помощи петролейного эфира: навеску 2,5 г образца перенести в центрифужную пробирку, добавить около 10 мл петролейного эфира и перемешивать при помощи стеклянной палочки. Декантировать петролейный эфир, повторить процедуру до полного обезжиривания. Если образец не содержит жира, его следует перенести в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл, добавить 25 мл кипящей воды и далее действовать, как описано в п. III.3;

⇒ Навеску 2,5 г БАД с высоким содержанием крахмала и белка перенести в центрифужную пробирку, добавить 10 мл смеси метанол-5%-ный аммиак (95:5) и проверить pH (величина pH должна составлять приблизительно 9). После тщательного перемешивания оставить образец в холодильнике примерно на 15 мин. Центрифугировать при 2000 об/мин в течение 10 мин., а затем декантировать чистый раствор в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл. Добавить в пробирку 2,5 мл воды, перемешать и внести 5 мл смеси метанол-25%-ный аммиак (95:5). Перемешать и центрифугировать, как описано выше. Повторить указанную процедуру до полной экстракции окрашенных соединений. Объединить все экстракты и упарить на водяной бане приблизительно до объема 10 мл (для удаления метанола). Добавить воду до общего объема 25 мл и нагреть раствор. Далее действуют, как описано в п. III.3.

III.3. Очистка пробы

⇒ Используя раствор уксусной кислоты в метаноле (1:1 по объему) или водный аммиак, довести pH образца до 4-5.

⇒ Нанести количественно на подготовленный патрон ДИАПАК ПА-3 25 мл подготовленной пробы, прокачивая ее со скоростью не более 1 капли в секунду, промыть сорбент последовательно

20 мл горячей (60-70°C) воды, затем 10 мл метанола (или 95%-ного этанола), собирая все смывы в приемник на слив;

⇒ Элюировать целевую фракцию СПК 5-10 мл смеси метанол (95% этанол)-25-ный аммиак=(95:5) до обесцвечивания сорбента, собирая элюат в отгонную колбу, упарить пробу досуха на ротационном испарителе при температуре 40-50°C и растворить в 1-2 мл растворителя, соответствующего конечному варианту ЖХ-определения;

⇒ Для разделения красителей методом ТСХ (“Руководство” с.183) конечным растворителем является смесь метанол-25%-ный аммиак=(95:5), а при ВЭЖХ-определении – элюент В.

III.4. Регенерация патрона ДИАПАК ПА-3

После проведения очистки каждой единичной пробы патрон ДИАПАК ПА-3 должен быть регенерирован в порядке, указанном в п. III.1.2.

Не рекомендуется использовать каждый из патронов ДИАПАК ПА-3 для подготовке более, чем 20 единичных проб!

Присутствующие в пробах полифенольные соединения (таннины растений) загрязняют верхние слои сорбента и регенерация патрона проходит лишь частично. Такая ситуация характерна для БАД, содержащих наряду с СПК растительные экстракты, например, чая, орехов колы или листьев матэ. Хемосорбция полифенолов является основным фактором снижения емкости патронов Диапак ПА-3, приводящим к необходимости их замены.

IV. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

IV.1. Условия хроматографического анализа

1. Для систем непрерывного градиента (импортные хроматографы, а также отечественные “Стайер” или “Орлант”):

- элюенты В и С - линейный градиент от 40 до 90 % элюента С за 15 минут при скорости 800 мкл/мин (колонка 4x150 мм) и 200 мкл/мин (колонка 2x80 мм);

2. Для систем ступенчатого градиента (хроматографы Милихром-5):

- линейный 4-х ступенчатый градиент при скорости потока 150-200 мкл/мин со следующими составами и объемами ступеней:

	Сосуд				Из них на регенерацию
	1	2	3	4	
Элюент А	0	8	6	5	
Элюент С	10	2	4	5	
Объем (мкл)	600	500	500	900	500

% ACN	50	40	30	25	25
-------	----	----	----	----	----

3. Для систем изократического разделения (импортные хроматографы и отечественный “Стайер”):

- смеси элюентов В и С (2:3) или (1:4), то есть 40 или 45% ACN, подбираются в зависимости от требуемой степени разделения конкретной смеси СПК при скорости потока 800-900 мкл/мин (см. “Руководство” с.184).

IV.2. Подготовка хроматографа

⇒ Установить в хроматограф колонку ДИАСФЕР- 110 -С16 соответствующего типоразмера и стабилизировать её в условиях холостого градиента или изократического элюирования, контролируя уровни шума и дрейфа нулевой линии на базовых длинах волн по “Руководству” (с.184): 450 (желтые), 500 (красные) и 600 (синие) нм.

⇒ Хроматограф со спектрофотометрическим детектором на видимую область спектра можно использовать для уточнения идентификации СПК при детектировании на специфических для каждого красителя длинах волн, соответствующих максимальному поглощению (приведены далее в градуировочной таблице).

⇒ Идентификация СПК, а также количественное определение в смесях существенно облегчаются при использовании детекторов, допускающих многоволновое детектирование. Такую возможность обеспечивают диодно-матричные детекторы, а также доступные в РФ хроматографы “Милихром-5”. Важно, чтобы приборы были оснащены программами обработки многоканальной хроматографической информации, например, “Мультихром-Спектр”.

IV.3. Проведение градуировки хроматографа

⇒ Градуировку подготовленного по п. IV.2. хроматографа осуществляют последовательным (не менее 3 раз) вводом 2-20 мкл (в зависимости от типа хроматографа) градуировочных смесей СПК, приготовленных в соответствии с “Руководством” (с.186), с уровнями концентраций (мг/л), приведенными в нижеследующей таблице:

	Смесь 1	Смесь 2	Смесь 3	λ_{\max} (nm)
Е 102	25	10	5	425
Е 104	25	10	5	412
Е 110	25	10	5	482
Е 123	25	10	5	521
Е 127	25	10	5	525
Е 129	25	10	5	504
Е 131	20	8	4	639
Е 132	20	8	4	620
Е 133	20	8	4	600

Для определения возможности анализа пищевых красителей тщательно изучите технические характеристики имеющегося в Вашем распоряжении зарубежного жидкостного хроматографа. Для работы в видимой области спектра на отечественных хроматографах “Милихром-5” поставляется сменный детектор на диапазон 380-720 нм, обеспечивающий, к тому же, возможность многоволнового детектирования во всём диапазоне, что облегчает идентификацию и одновременное количественное определение разных по цветности нормируемых пищевых красителей.

После записи градуировочных хроматограмм проводят их математическую обработку с фиксацией времён удерживания и площадей пиков пищевых красителей. При необходимости, проводят их статистическую обработку и строят градуировочные зависимости. Необходимо убедиться в линейности градуировочных зависимостей в выбранном диапазоне концентраций. В противном случае следует увеличить степень разбавления пробы *элюентом А* в 2-4 раза.

IV.4. Проведение ВЭЖХ-анализа

⇒ Ввести в хроматограф нужное для статистической достоверности число раз *пробу СПК* в условиях элюирования. Идентифицировать пищевые красители по временам удерживания и зафиксировать площади пиков на оптимальных длинах волн в видимой области спектра (400-640 нм для красителей);

⇒ Рассчитать концентрацию идентифицированных пищевых красителей в пробах пищевых продуктов, содержащих БАД, с учётом градуировочных зависимостей, полученных по п. IV.3.. Сравнить полученные значения с предельно-допустимыми по нормативам СанПиН 2.3.2.1293-03 и

Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

использовать эти данные для целей сертификации СПК-содержащих БАД и продуктов питания, указанных в п. I.2. и III.2.

Разработал: _____ /Васияров Г.Г./

“ ____ “ _____ 2005 г

Закрытое Акционерное Общество “БиоХимМак”

Отдел хроматографии

Россия, 119899, Москва, Воробьевы горы

тел. (095) 939-59-67 /офис/, 939-36-66 /лаборатория/

факс (095) 939-59-67.