

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Аналитического комплекта Пищевые
добавки 1

Подсластители и консерванты

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении подсластителей и консервантов 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 *Подсластители и консерванты*

I.1. Цель выпуска комплекта ПК

Целью выпуска Аналитического комплекта *Подсластители и консерванты* является обеспечение идентификации и количественного определения методом ВЭЖХ важнейших консервантов и подсластителей, предельно-допустимые уровни содержания которых в продуктах переработки плодов и овощей, безалкогольных напитках и БАД регламентированы основным документом - СанПиН 2.3.2.1293-03 "Гигиенические требования по применению пищевых добавок".

I.2. Назначение комплекта ПК

Аналитический комплект предназначен для подготовки проб продуктов переработки плодов и овощей, натуральных и синтетических безалкогольных напитков, водорастворимых твердых и жидких БАД и их

количественного анализа методом жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Основой разработки послужили методики подготовки проб и ВЭЖХ-анализа, приведенные в Межгосударственном стандарте: ГОСТ 30059-93 (ГОСТ 50502-93) “Напитки безалкогольные. Методы определения аспартама, сахарина, кофеина и бензоата натрия” и Руководстве 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 ПК

Описанная в “Руководстве” процедура предварительной очистки проб от синтетических пищевых красителей - селективная твердофазная экстракция красителей на полиамидном сорбенте, была реализована в комплекте ПК на патроне Диапак ПА-3, поскольку проведение ВЭЖХ-анализа без предварительной подготовки проб ошибочно, т.к. это приводит к быстрому выходу из строя ВЭЖХ-колонок (предколонок) и возможному появлению на текущих хроматограммах подсластителей и консервантов пиков ароматических веществ из предыдущего анализа.

Метод ВЭЖХ анализа, реализованный в Аналитическом комплекте ПК, обладает следующими характерными особенностями:

- Подготовка проб продуктов переработки плодов и овощей экстракцией целевых компонентов смесью ацетонитрил-буферный раствор ацетата аммония;
- Подготовка проб методом твёрдофазной экстракции (ТФЭ) на регенерируемых патронах ДИАПАК ПА-3;
- ВЭЖХ-анализ целевых компонентов проб в градиентном режиме, позволяющем использовать различные жидкостные хроматографы, снабжённые спектрофотометрическими детекторами;
- Детектирование ПК во всех случаях в УФ области спектра на 210-280 нм (*210 нм для цикламата и аспартама!*).

II. Состав комплекта¹ ПК

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 добавок по 0,5 г:
 - Цикламовая кислота
 - Ацесульфам калия
 - Аспартам
 - Сахарин
 - Бензоат натрия
 - Сорбат калия
3. Аналитическая колонка ДИАСФЕР-110-С10СН (ТУ 4215-001-05451931-94), 5-7 мкм, для ВЭЖХ-анализа:

¹ Примечание.

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

- 4×150 мм - для любых моделей импортных жидкостных хроматографов;

4. Инструкция по применению Аналитического комплекта *Подсластители и консерванты*.

II.1.1. Порядок проведения пробоподготовки

II.2. Подготовка к проведению определения

II.2.1. Приготовление экстрагента

- Приготовить водный раствор ацетата аммония в воде с концентрацией 800 мг/л;
- Довести значение рН раствора до 4,2-4,3 путем добавления по каплям уксусной кислоты;

- Приготовить смесь буферного раствора ацетата аммония с ацетонитрилом в объемном соотношении 3:2. Срок годности *раствора экстрагента* – 1 неделя при хранении в плотно закупоренной посуде.

II.2.2. Приготовление элюентов для пробоподготовки

- *Аммиачно-спиртовая смесь*: смешать 25% водный раствор аммиака с этиловым спиртом в объемном соотношении 5:95;
- *Глициновый буфер*: навески 7,507 г глицина и 5,85 г хлористого натрия растворить в мерной колбе в 950 мл бидистиллированной воды, довести рН раствора до 7,5 при помощи уксусной кислоты и добавить воды до метки.

II.2.3. Приготовление элюентов для хроматографического анализа

- Приготовить раствор 0,5 мл трифторуксусной кислоты в 1000 мл бидистиллированной воды в мерной колбе и тщательно перемешать (*элюент А*);
- Приготовить смесь *элюента А* с ацетонитрилом в объемном соотношении 3:1 (*элюент Б*).
- Элюенты профильтровать через мембранные фильтры с размером пор около 0,5 мкм.

II.2.4. Подготовка к работе патрона ДИАПАК ПА-3

- Снять с патрона верхнюю крышку, смочить сорбент 7-10 мл *аммиачно-спиртовой смеси*, закрыть крышкой и суспендировать сорбент

переворачиванием патрона, после чего закрепить его в вертикальном положении и дать сорбенту отстояться. Зафиксировать поверхность сорбента небольшим ватным тампоном;

- Пропустить через патрон в общей сложности 10 мл *аммиачно-спиртовой смеси* со скоростью 2-3 мл/мин при вакуумировании;
- Пропустить через патрон 20 мл бидистиллированной воды, подкисленной уксусной кислотой до pH 4,0;
- Самотеком или при слабом вакуумировании прокачать избыток элюента, оставив около 1 см над слоем сорбента.

II.3. Отбор и предварительная подготовка проб

- Пробы натуральных и синтетических напитков объемом около 50 мл профильтровать через плотный бумажный фильтр и подкорректировать pH до 4,0 концентрированной уксусной кислотой или водным аммиаком;

- Пробы концентратов напитков разбавить бидистиллированной водой в соответствии с действующей на них НТД (инструкцией по применению) и подготовить, как описано выше;
- Навеску пробы продукта переработки плодов и овощей массой 10 г перенести в мерную колбу вместимостью 250 мл. Внести 100 мл *раствора экстрагента* и выдержать на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Внести последовательно по 5 мл растворов Карреза 1 и Карреза 2, каждый раз тщательно перемешивая содержимое колбы. Довести объем в колбе бидистиллированной водой до метки и после перемешивания профильтровать через бумажный фильтр. Аликвоту фильтрата объемом 5 мл перенести в мерную колбу объемом 50 мл и довести объем до метки подкисленной до рН 4,0 бидистиллированной водой;
- Навеску 2,5 г твердого водорастворимого образца БАД 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). Охладить и подкислить уксусной кислотой до рН 4,0.

- 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 выше.
- 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 рН (величина рН 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. Далее действуют, как описано выше.

II.4. Очистка пробы

- Нанести количественно на подготовленный патрон ДИАПАК ПА-3 25 мл подготовленной пробы, прокачивая ее со скоростью 2-3 капли в секунду;
- Элюировать целевую фракцию ПК 18 мл *глицинового буфера (ровно!)*. Довести объем подготовленной пробы до 40 мл *элюентом А*.

II.5. Регенерация патрона ДИАПАК ПА-3

После проведения очистки каждой единичной пробы патрон ДИАПАК ПА-3 должен быть регенерирован в порядке, указанном в п. II.2.4.

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. Такое явление характерно для БАД, содержащих наряду с красителями растительные экстракты, т.н., чая, орехов колы или листьев матэ. Хемосорбция полифенолов является основным фактором снижения емкости патронов Диапак ПА-3, приводящим к необходимости их замены.

III. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

III.1. Условия хроматографического анализа

.Для систем непрерывного градиента (импортные хроматографы, а также отечественный “Стайер”):

- *элюенты А и Б* - линейный градиент от 15 до 90 % *элюента Б* за 15 минут и отмывка от 90 до 100% *элюента Б* 5 мин при скорости 800 мкл/мин;

- детектирование при 210-280 нм (см. табл.), цикламат и ацесульфам при 210 нм. Дополнительную информацию об условиях детектирования см. Руководство Р 4.1.1672-03 (стр.172-176).

III.2. Подготовка хроматографа

- Установить в хроматограф колонку ДиАСФЕР-110–С10СN и стабилизировать её в условиях холостого градиента, контролируя уровни шума и дрейфа нулевой линии на базовой длине волны.
- Хроматограф со спектрофотометрическим детектором можно использовать для уточнения идентификации ПК при детектировании на специфических для каждого соединения длинах волн, соответствующих максимальному поглощению.
- Идентификация ПК, а также количественное определение в смесях существенно облегчаются при использовании детекторов, допускающих многоволновое детектирование. Такую возможность обеспечивают диодно-матричные детекторы. Важно, чтобы приборы были оснащены

программами обработки многоканальной хроматографической информации, например, “Мультихром-Спектр”.

III.3. Проведение градуировки хроматографа

⇒ Градуировку подготовленного по п. IV.2. хроматографа осуществляют последовательным (не менее 3 раз) вводом 20-50 мкл градуировочных смесей ПК, приготовленных в соответствии с уровнями концентраций (мг/л), приведенными в нижеследующей таблице:

	Смесь 1	Смесь 2	Смесь 3	λ_{\max} (nm)
Циклакат	400	200	100	210
Ацесульфам калия	80	40	20	225
Аспартам	100	45	20	215
Сахарин	80	40	20	269
Бензоат натрия	180	90	40	230
Сорбат калия	180	90	40	260

После записи градуировочных хроматограмм проводят их математическую обработку с фиксацией времён удерживания и площадей пиков пищевых добавок. 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.

III.4. Проведение ВЭЖХ-анализа

⇒ Ввести в хроматограф нужное для статистической достоверности число раз *пробу ПК* в условиях элюирования. При необходимости анализа цикламата объем пробы следует увеличить до 50 мкл (петля на 50 мл). Идентифицировать пищевые добавки по временам удерживания и зафиксировать площади пиков на оптимальных длинах волн в УФ области спектра. При зашкале пиков на хроматограмме необходимо разведение образцов в 2-5 раз.

⇒ Рассчитать концентрацию идентифицированных пищевых добавок в пробах с учетом градуировочных зависимостей, полученных по п. III.3.. Сравнить полученные значения с предельно-допустимыми по нормативам СанПиН 2.3.2.1293-03 и использовать эти данные для целей сертификации

ПК-содержащих напитков, продуктов питания и БАД, указанных в п. I.2. и III.2.

Разработал: _____ /Васияров Г.Г./

_____ /Алексеева Г.С./

“ ___ “ _____ 2006 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.