ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54685— 2011

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение фумаровой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Некоммерческой организацией «Российский союз производителей соков» (РСПС)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки фруктов, овощей и грибов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 844-ст

4 В настоящем стандарте учтены:

- основные положения международного стандарта CODEX-STAN 247—2005 «Общий стандарт на фруктовые соки и нектары» (CODEX-STAN 247-2005 «Codex general standard for fruit juices and nectars») в части методов анализа и отбора проб соковой продукции;
- основные нормативные положения и метрологические характеристики документа ИФУ 72 (1998) «Метод определения фумаровой кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии» (Международная федерация производителей фруктовых соков) [IFU-Analyses Nr. 72 (1998) «Fumaric acid (HPLC)», (International Federation of Fruit Juice Produces)]

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «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

© Стандартинформ, 2012

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода определения 2
4 Отбор проб 2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы 2
6 Подготовка к проведению измерений 3
7 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 3
8 Обработка и оформление результатов определения 5
9 Требования безопасности 5
Приложение А (справочное) Метрологические характеристики метода 6
Библиография 7

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение фумаровой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products. Determination of fumaric acid by high performance liquid chromatography method (HPLC)

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары, морсы и сокосодержащие напитки, фруктовые и овощные концентрированные соки, пюре и концентрированные пюре, морсы и концентрированные морсы, соковую продукцию из фруктов и овощей обогащенную и для детского питания (далее — соковая продукция) и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения массовой концентрации или массовой доли фумаровой кислоты.

Нижний предел измерений массовой концентрации (массовой доли) фумаровой кислоты составляет 1 мг/дм^3 (млн$^{-1}$) Верхний предел измерений массовой концентрации (массовой доли) фумаровой кислоты — 50 мг/дм^3 (млн$^{-1}$).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ Р 52501—2005 Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 53693—2009 Продукция соковая. Определение аскорбиновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018—93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

Издание официальное

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 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода определения

Метод основан на применении высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Массовую концентрацию или массовую долю фумаровой кислоты в соковой продукции определяют с применением спектрофотометрического детектора в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 210 нм.

4 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26313.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

5.1 Хроматограф жидкостный со спектрофотометрическим детектором (рабочий диапазон длин волн поглощения от 200 до 600 нм) или УФ-детектором, аналитической колонкой и программно-аппаратным комплексом сбора и обработки результатов.

5.2 Колонка аналитическая, длиной 300 мм и внутренним размером диаметра 7,8 мм, заполненная сорбентом на основе сополимера стирола с дивинилбензолом с привитыми сульфокислотными группами, снабженная предколонкой длиной 30 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненной тем же сорбентом.

5.3 Детектор спектрофотометрический, позволяющий производить измерения оптической плотности при длине волны 210 нм с проточной кюветой рабочим объемом не более 10 мм^3 со следующими метрологическими характеристиками:

Относительное среднее квадратичное отклонение, %			
По площади пика	По высоте пика	По времени удерживания	По площади пика за 8 часов непрерывной работы
5	5	1	5

- пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений по шкале длин волн ± 0,2 нм; пределы допускаемой воспроизводимости измерений по шкале длин волн ± 0,08 нм (λ = 656 нм);
- пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений по фотометрической шкале ± 0,002 при оптической плотности 0,3 и ± 0,003 при оптической плотности 1;
- пределы допускаемой воспроизводимости измерений по фотометрической шкале ± 0,0008 при оптической плотности 1.

5.4 Весы по ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность взвешивания с пределами абсолютной допускаемой погрешности ± 0,1 мг.

5.5 Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5 и 1-2-2-10 по ГОСТ 29227.

5.6 Посуда мерная лабораторная стеклянная 2-го класса точности по ГОСТ 1770:

- цилиндры 1-50-2 и 1-1000-2;
- колбы мерные с притертой пробкой 4-50-2, 4-500-2 и 4-1000-2;
- пробирки стеклянные 1-10-0,1 ХС и 1-20-0,1 ХС.

5.7 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

- воронки лабораторные;
- стаканы В-1-50, В-1-100 и В-2-1000.

5.8 Фильтры мембранные с размером диаметра пор 0,45 мкм для фильтрования подвижной фазы и проб.

5.9 Фильтры обеззоленные по [1].

5.10 Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (g-фактор) 1000—4000.

5.11 Баня ультразвуковая.

5.12 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

5.13 Вода для лабораторного анализа по ГОСТ Р 52501 первой степени чистоты.

5.14 Кислота фумаровая, массовой долей основного вещества не менее 99,5 %.

5.15 Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Приготовление подвижной фазы для жидкостной хроматографии

В качестве подвижной фазы используют водный раствор серной кислоты молярной концентрации $c(H_2SO_4)$ = 0,005 моль/дм^3, который необходимо предварительно профильтровать через мембранный фильтр.

Срок хранения раствора в плотно укупоренной посуде при комнатной температуре — не более 7 сут.

6.2 Подготовка проб для измерений

Раствор пробы для хроматографического анализа готовят в соответствии с ГОСТ Р 53693 (подраздел 6.2).

6.3 Приготовление стандартных градуировочных растворов фумаровой кислоты

6.3.1 Приготовление основного стандартного раствора фумаровой кислоты

50 мг фумаровой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 500 см^3, на 2/3 объема наполненную водой для лабораторного анализа по 5.13. Содержимое колбы тщательно перемешивают, после чего доводят до метки водой по 5.13 и вновь тщательно перемешивают. Получают основной стандартный раствор массовой концентрацией фумаровой кислоты 100 мг/дм^3.

Срок хранения раствора в плотно укупоренной емкости при температуре 4 °С — не более 6 мес.

6.3.2 Приготовление градуировочных растворов фумаровой кислоты

Градуировочные растворы фумаровой кислоты готовят непосредственно перед использованием.

Из основного стандартного раствора фумаровой кислоты массовой концентрацией 100 мг/дм^3 готовят пять градуировочных растворов в диапазоне массовых концентраций фумаровой кислоты от 1,0 до 10,0 мг/дм^3 при помощи разведения основного стандартного раствора (0,5; 1,0; 3,0; 4,0; 5,0 см^3) водой по 5.13 в мерных колбах вместимостью по 50 см^3. Аликвоты основного стандартного раствора дозируют с помощью пипеток и далее содержимое колб доводят до метки водой по 5.13. Приготовленные градуировочные растворы фильтруют через мембранные фильтры с размером диаметра пор 0,45 мкм.

7 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

7.1 Условия хроматографического анализа

Колонка аналитическая по 5.2.

Элюент: раствор серной кислоты молярной концентрации 0,005 моль/дм^3 по 6.1.

Температура колонки: 40 °С.

Длина волны детектора: 210 нм.

Скорость потока подачи элюента: 0,6 $см^3$/мин (ориентировочное значение).

Объем вводимой пробы: 15 мкл.

Время удерживания фумаровой кислоты: 14 мин (ориентировочное значение).

Продолжительность анализа: примерно 20 мин.

7.2 Условия проведения измерений

Измерения проводят при следующих лабораторных условиях:

- температура окружающего воздуха . . . . . (25 ± 5) °С;
- атмосферное давление . . . . . (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность . . . . . (65 ± 15) %;
- частота переменного тока . . . . . (50 ± 5) Гц;
- напряжение в сети . . . . . (220 ± 10) В.

7.3 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов. Регистрируют время удерживания и площади пиков фумаровой кислоты и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации фумаровой кислоты в градуировочном растворе.

Процедуры построения градуировочной зависимости выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования и руководством пользователя программным обеспечением.

Площадь пика фумаровой кислоты S, $мм^2$, и ее концентрация в градуировочном растворе c, $мг/дм^3$, находятся в функциональной зависимости вида

$$c = K \cdot S, \tag{1}$$

где K — градуировочный коэффициент, $мг/(дм^3 мм^2)$.

Градуировочный коэффициент K в формуле (1) рассчитывают по результатам анализа градуировочных растворов с помощью системы автоматизированной обработки данных или, при ее отсутствии в составе хроматографа, по методу наименьших квадратов, полагая свободный член в уравнении регрессии равным нулю, по формуле

$$K = \frac{\Sigma(S_i c_i)}{\Sigma S_i^2}, \tag{2}$$

где S_i — площадь пика фумаровой кислоты при анализе i-го градуировочного раствора, $мм^2$;

c_i — массовая концентрация фумаровой кислоты в i-м градуировочном растворе, $мг/дм^3$.

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется значением достоверности аппроксимации (R^2):

$$R^2 \geq 0{,}9997.$$

Градуировочную зависимость строят при замене оборудования, колонок, реактивов, условий хроматографического анализа.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы. В качестве контрольного образца используют раствор фумаровой кислоты в подвижной фазе массовой концентрации 5,0 $мг/дм^3$, приготовленный в соответствии с 6.3.2. Проводят двукратный хроматографический анализ контрольного образца и идентифицируют пик фумаровой кислоты по времени удерживания. По результатам каждого анализа рассчитывают массовую концентрацию фумаровой кислоты в контрольном образце по формуле (1).

Проверяют повторяемость значений массовой концентрации фумаровой кислоты при анализе контрольного образца по формуле

$$|C_{к,1} - C_{к,2}| \leq 0{,}03 \cdot \overline{C}_к, \tag{3}$$

где $C_{к,1}$ и $C_{к,2}$ — массовые концентрации фумаровой кислоты в контрольном образце, полученные по первой и второй хроматограммам, $мг/дм^3$;

$\overline{C}_к$ — среднеарифметическое значений $C_{к,1}$ и $C_{к,2}$, $мг/дм^3$.

Градуировочная зависимость признается стабильной, если выполняется условие

$$|\overline{C}_к - C| \leq 0{,}10 \cdot C, \tag{4}$$

где C — фактическая массовая концентрация фумаровой кислоты в контрольном образце, $мг/дм^3$.

Если условие (4) не выполняется, то процедуру контроля повторяют и при получении неудовлетворительного результата контроля градуировку хроматографа проводят заново.

7.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ двух параллельных проб, подготовленных по 6.2.

Регистрируют площадь пика фумаровой кислоты. В случае если массовая концентрация или массовая доля фумаровой кислоты в пробе настолько велика, что площадь соответствующего пика выходит за верхнюю границу диапазона градуировки хроматографа, то проводят повторный хроматографический анализ раствора пробы с большей степенью разбавления.

8 Обработка и оформление результатов определения

Массовую концентрацию фумаровой кислоты X_1, мг/дм^3, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{S \cdot K \cdot V_1}{V_2}, \quad (5)$$

где S — площадь пика фумаровой кислоты на хроматограмме раствора пробы, мм^2;

K — градуировочный коэффициент, мг/(дм^3 · мм^2);

V_1 — объем, в котором разбавлена проба для анализа, см^3;

V_2 — объем пробы, взятой для анализа, см^3.

При испытании соков с объемной долей мякоти более 10 % результат определения выражают в виде массовой доли фумаровой кислоты X_2, млн$^{-1}$, которую рассчитывают по формуле

$$X_2 = \frac{S \cdot K \cdot V}{m}, \quad (6)$$

где K — градуировочный коэффициент, мг/(дм^3 · мм^2);

V — объем, в котором разбавлена проба для анализа, см^3;

m — масса пробы, взятая для анализа, г.

Вычисления проводят с точностью до второго десятичного знака.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений $X_{ср}$, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-1, округленное до первого десятичного знака.

В справочном приложении А приведены метрологические характеристики метода определения массовой концентрации фумаровой кислоты по данным метода ИФУ 72 «Метод определения фумаровой кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии». Значения характеристик прецизионности, указанные в таблице А.1 приложения А, приведены для конкретных видов соковой продукции.

9 Требования безопасности

9.1 Условия безопасного проведения работ

При работе с химическими реактивами следует соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005 и ГОСТ 12.1.007. При подготовке проб к анализу и выполнению измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила пожаровзрывобезопасности по ГОСТ 12.1.018, по электробезопасности — по ГОСТ Р 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

9.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений, обработке и оформлению результатов допускаются инженер-химик, техник или лаборант, имеющие высшее или среднее специальное образование, опыт работы в химической лаборатории и изучившие методику измерений с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Первое выполнение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в лаборатории следует проводить под руководством специалиста, владеющего теорией метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и имеющего практические навыки в этой области.

Приложение А
(справочное)

Метрологические характеристики метода

А.1 Метрологические характеристики метода приведены в таблице А.1.

Таблица А.1 — Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации или массовой доли фумаровой кислоты*

Наименование показателя	Соковая продукция		
	Вишневый нектар	Яблочный сок	Вишневый нектар
Среднее значение определения, мг/дм^3	14,5	6,8	3,4
Стандартное отклонение повторяемости S_r, мг/дм^3	0,172	0,225	0,165
Предел повторяемости (сходимости) r, мг/дм^3	0,5	0,5	0,5
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R, мг/дм^3	0,674	0,682	0,801
Предел воспроизводимости R, мг/дм^3	1,9	1,9	2,2

* По данным метода ИФУ 72 (1998) «Метод определения фумаровой кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Библиография

[1] ТУ 6-09-1678—95 Фильтры обеззоленные ФЩ-ФС-15 «Белая лента»

УДК 664.863.001.4:006.354 ОКС 67.080, 67.050 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: соковая продукция, фумаровая кислота, сущность метода, высокоэффективная жидкостная хроматография, стандартные градуировочные растворы, массовая концентрация, массовая доля, подготовка к проведению измерения, проведение измерения, обработка и оформление результатов определения, требования безопасности

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 27.08.2012. Подписано в печать 25.09.2012. Формат 60x84 1/8. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,10. Тираж 211 экз. Зак. 827.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru