ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54743— 2011

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение свободных аминокислот методом ионообменной 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» (НО «РСПС»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 093 «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. № 918-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 (раздел 5) документа ИФУ 57:1989 (Rev. 2005) «Определение свободных аминокислот» (Международная федерация производителей фруктовых соков) [IFU-Analyses No. 57:1989 (Rev. 2005) «Determination of free amino acids» (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 2
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы 2
5 Отбор проб 4
6 Подготовка к проведению измерений 4
7 Проведение измерений 5
8 Обработка и оформление результатов измерений 6
9 Контроль прецизионности результатов определения 7
10 Требования, обеспечивающие безопасность 7
Приложение А (справочное) Схема работы автоматического анализатора аминокислот 9
Приложение Б (справочное) Хроматограмма свободных аминокислот в свежеотжатом яблочном соке 10
Приложение В (справочное) Значения массовой (молярной) концентрации свободных аминокислот в яблочном соке по данным AIJN 12
Приложение Г (справочное) Основные метрологические характеристики метода 13
Библиография 14

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение свободных аминокислот методом ионообменной хроматографии

Juice products. Determination of free amino acids by ion-exchange chromatography method

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 ионообменной хроматографии для определения массовой концентрации (массовой доли) свободных аминокислот: аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аланина, изолейцина, фенилаланина, глутамина, лизина, треонина, пролина, валина, лейцина, серина, глицина, метионина, тирозина, аминомасляной кислоты, орнитина, аргинина, гистидина, аспарагина.

Стандарт также применим для определения массовой концентрации (массовой доли) этаноламина и аммиака в соковой продукции.

Нижний предел измерений массовой концентрации (массовой доли) каждого из определяемых компонентов составляет 1 мг/дм^3 (1 млн$^{-1}$). Верхний предел измерений массовой концентрации (массовой доли) каждого из определяемых компонентов — 5000 мг/дм^3 (5000 млн$^{-1}$).

Настоящий стандарт может применяться для целей идентификации.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы 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 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

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

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 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 244—76 Натрия тиосульфат кристаллический. Технические условия

Издание официальное

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

ГОСТ 2222—95 Метанол технический. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 5820—78 Реактивы. Калий уксуснокислый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8595—83 Лития гидроокись техническая. Технические условия

ГОСТ 9656—75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 19234—87 Моноэтиламин технический. Технические условия

ГОСТ 19710—83 Этиленгликоль. Технические условия

ГОСТ 22280—76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23519—79 Фенол синтетический технический. 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 29169—91 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

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 информационному 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

Свободные аминокислоты, этаноламин и аммиак в соковой продукции определяют методом ионообменной хроматографии при помощи автоматического анализатора аминокислот, включающего в себя буферную систему и систему послеколоночной дериватизации с нингидрином. После хроматографического разделения на колонке с катионообменным сорбентом ступенчатым элюированием буферными растворами свободные аминокислоты, этаноламин и аммиак вступают в реакцию с нингидрином при температуре 100 °С—135 °С, после чего окрашенный элюат, содержащий компоненты анализируемой смеси свободных аминокислот, а также этаноламин и аммиак детектируют с использованием фотометрического детектора при длинах волн 570 и 440 нм.

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

4.1 Анализатор аминокислот автоматический[1)], состоящий из системы градиентного элюирования, системы послеколоночной дериватизации с нингидрином (послеколоночного реактора), фотометрического детектора, пригодного для одновременного измерения оптической плотности при длинах волн 570 и 440 нм с проточной кюветой объемом не более 15 мм^3, обеспечивающего предел детектирования аминокислот, этаноламина и аммиака не более 10 пмоль, и программно-аппаратного комплекса сбора и обработки результатов измерений, укомплектованный буферными растворами и аналитической колонкой следующих размеров (внутренний размер диаметра × длина): 9 × 500, 6 × 200, 4,6 × 200 или 270, 4 × 200, 3,2 × 140 мм, заполненной катионообменной смолой с привитыми сульфогруппами, пригодной для работы в диапазоне от 2,0 до 7,0 ед. pH и обеспечивающей хроматографическое разделение аминокислот, этаноламина и аммиака при использовании ступенчатого градиента pH подвижной фазы.

[1)] Анализатор аминокислот автоматический «Биохром» обеспечивает требуемую эффективность хроматографического разделения. Данная информация не является рекламой указанного прибора и не исключает возможность применения других анализаторов.

4.2 Смолы катионообменные хроматографические[1)].

4.3 Весы по ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность однократного взвешивания с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,1 мг.

4.4 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

колбы К-2-1000;

воронки лабораторные;

стаканы В-1-50, В-1-100 и В-2-1000.

4.5 Пипетки градуированные 1-2-1, 1-2-2, 1-2-5, 1-2-10 и 1-2-25 по ГОСТ 29227.

4.6 Микрошприцы для ВЭЖХ вместимостью 25, 100 и 250 мкл.

4.7 Посуда мерная лабораторная стеклянная по ГОСТ 1770:

цилиндры 1-50-2 и 1-1000-2;

колбы мерные 4-25-2, 4-50-2, 4-100-2, 4-500-2 и 4-1000-2;

пробирки 1-10-0,1 ХС и 1-20-0,1 ХС.

4.8 Емкости для жидких проб вместимостью 2—6 $см^3$.

4.9 Фильтры мембранные с размером диаметра пор 0,20 мкм для фильтрования подвижной фазы и проб.

4.10 Фильтры обеззоленные по [1].

4.11 Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения g — 1000.

4.12 Установка для дегазации.

4.13 Мини-насос вакуумный лабораторный (к установке для дегазации элюента).

4.14 Иономер (pH-метр) с погрешностью измерения ± 0,01 ед. pH.

4.15 Баня ультрозвуковая.

4.16 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.17 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.18 Вода для лабораторного анализа по ГОСТ Р 52051, первой степени чистоты.

4.19 Литий лимоннокислый (лития цитрат) 4-х водный — $Li_3C_6H_5O_7 \times 4H_2O$, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

4.20 Хлорид лития, массовой долей не менее 98 %.

4.21 Гидроксид лития по ГОСТ 8595, ч. д. а.

4.22 Фенол кристаллический по ГОСТ 23519, ч. д. а., массовой долей основного вещества не менее 95 %.

4.23 Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор массовой долей 37 %.

4.24 Этиленгликоль по ГОСТ 19710 (или моноэтил по ГОСТ 19234, или метанол по ГОСТ 2222).

4.25 Кислота борная по ГОСТ 9656.

4.26 Детергент «Бридж 35» (неионогенное ПАВ полиоксиэтилена), х. ч., раствор массовой долей 30 %.

4.27 2,2-тиодиэтанол массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.28 Нингидрин, массовой долей основного вещества не менее 95 %.

4.29 Натрий уксуснокислый по ГОСТ 244 (или калий уксуснокислый по ГОСТ 5820), ч. д. а.

4.30 Кислота уксусная ледяная х. ч., по ГОСТ 61.

4.31 Хлорид титана (III), раствор массовой долей 15 %.

4.32 Гидриндантин массовой долей основного вещества не менее 95 %.

4.33 Натрий лимоннокислый трехзамещенный (цитрат натрия) по ГОСТ 22280.

4.34 Норлейцин массовой долей основного вещества не менее 98 %.

4.35 Норвалин массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.36 Набор аминокислот для проведения анализа по [2] или стандартная смесь аминокислот (физиологическая, 42 аминокислоты) в комплекте к анализатору аминокислот по 4.1.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов или комплектов реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

[1)] Смолы Biotronik BTC 3118 и LKB Ultropac 8 обеспечивают требуемую эффективность хроматографического разделения. Данная информация не является рекламой указанных изделий и не исключает возможности применения других сорбентов.

5 Отбор проб

5.1 Отбор проб - по ГОСТ 26313.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка буферных растворов для анализатора аминокислот

Для проведения определения применяют готовые буферные растворы, входящие в комплект анализатора по 4.1, с кислотностью от 2 до 4,8 ед. pH.

Допускается подготовка буферных растворов в лабораторных условиях, для чего используют воду по ГОСТ 52501 первой степени чистоты. Для этого 5—6 буферных растворов цитрата лития готовят из компонентов по 4.19—4.26 в лабораторных условиях в соответствии с инструкцией используемого автоматического анализатора аминокислот с кислотностью от 2,0 до 4,8 ед. pH. pH раствора регулируют с помощью соляной кислоты по 4.23. В качестве консерванта буферов используют фенол по 4.22 или 2,2-тиодиэтанол по 4.27.

Срок хранения буферных растворов — в соответствии с инструкцией к анализатору.

6.2 Подготовка дериватизирующего (красящего) реагента

Для проведения определения применяют готовый нингидриновый реагент, входящий в комплект анализатора по 4.1

Допускается подготовка дериватизирующего реагента в лабораторных условиях. Для этого готовят раствор из компонентов по 4.28—4.33 в лабораторных условиях в соответствии с инструкцией используемого автоматического анализатора аминокислот по 4.1.

Срок хранения дериватизирующего реагента — в соответствии с инструкциями к анализатору.

6.3 Приготовление рабочих растворов

Рабочие растворы включают основные стандартные растворы А, Б, В и градуировочный раствор.

6.3.1 Для приготовления основного стандартного раствора А используют набор аминокислот по 4.36, который должен содержать следующие аминокислоты:

1 Аланин (Ala).
2 Аминомасляная кислота (Abu).
3 Аргинин (Arg).
4 Аспарагиновая кислота (Asp).
5 Валин (Val).
6 Гистидин (His).
7 Глицин (Gly).
8 Глутаминовая кислота (Glu).
9 Изолейцин (Ile).
10 Лейцин (Leu).
11 Лизин (Lys).
12 Орнитин (Orn).
13 Пролин (Pro).
14 Серин (Ser).
15 Тирозин (Tyr).
16 Треонин (Thr)
17 Фенилаланин (Phe).
18 Метионин (Met),

а также этаноламин (MEA или ETA) и аммиак (Ammonia).

6.3.2 Для приготовления основного стандартного раствора Б используют аминокислоты аспарагин (Asn) и глутамин (Gln) из готового набора аминокислот по 4.36 либо из набора аминокислот, входящего в комплект анализатора.

6.3.3 Для приготовления основного стандартного раствора В (раствора внутреннего стандарта) используют норлейцин по 4.34 или норвалин по 4.35.

6.3.4 Основные стандартные растворы А, Б и В готовят растворением навесок стандартных веществ, указанных в 6.3.1—6.3.3, в буферном растворе цитрата лития по 6.1 с кислотностью 2,0 или 2,2 ед. pH в мерных колбах вместимостью 25, 50 или 100 см^3.

Требуемую массу навески каждого стандартного вещества, используемого для приготовления основных стандартных растворов m, мг, определяют по формуле

$$m = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3}, \quad (1)$$

где C — массовая концентрация стандартного вещества в градуировочном растворе, определяемая исходя из границ установленного диапазона линейности аналитического сигнала детектора, мкг/см^3;

V_1 — объем градуировочного раствора, см^3;

V_2 — объем основного стандартного раствора, см³,

V_3 — объем основного стандартного раствора, взятый для приготовления градуировочного раствора, см³.

Срок хранения основных стандартных растворов при температуре минус 18 °С — не более 1 мес.

6.3.5 Для приготовления градуировочного раствора в мерной колбе вместимостью 25, 50 или 100 см³ с помощью пипеток подходящей вместимости смешивают объемы от 2 до 10 см³ основных стандартных растворов А, Б и В, соблюдая при этом следующее требование: массовая концентрация стандартных веществ в градуировочном растворе должна находиться в границах диапазона линейности аналитического сигнала детектора, установленного в инструкции по эксплуатации анализатора.

Градуировочный раствор готовят непосредственно перед проведением измерений.

6.4 Определение градуировочных характеристик

Проводят хроматографический анализ градуировочного раствора в двукратной повторности и регистрируют площадь пика каждой аминокислоты, этаноламина и аммиака. Градуировочный коэффициент K для каждого анализируемого вещества рассчитывают по методу внутреннего стандарта с использованием формулы

$$K = \frac{C_{am} \quad S_{st}}{C_{st} \cdot S_{am}}, \qquad (2)$$

где C_{am} — массовая концентрация анализируемого вещества в градуировочном растворе, определяемая по 6.3.4, мкг/см³;

S_{st} — площадь пика норлейцина или норвалина (внутреннего стандарта) по результатам единичного анализа градуировочного раствора;

C_{st} — массовая концентрация норлейцина или норвалина (внутреннего стандарта) в градуировочном растворе, мкг/см³;

S_{am} — площадь пика анализируемого вещества по результатам единичного анализа градуировочного раствора.

Результаты определения градуировочного коэффициента считаются приемлемыми, если расхождение между двумя параллельными определениями градуировочного коэффициента не превышает 5 % среднеарифметического значения. При соблюдении этого условия за окончательный результат определения градуировочного коэффициента принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений.

7 Проведение измерений

7.1 Условия проведения измерений

Измерения проводят при следующих лабораторных условиях:

температура окружающего воздуха . . . . . (25 ± 5) °С;

атмосферное давление . . . . . (97 ± 10) кПа;

относительная влажность . . . . . (80 ± 5) %;

частота переменного тока . . . . . (50—60) Гц;

напряжение в сети . . . . . (240 ± 20) В.

7.2 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа

7.2.1 При испытании соковой продукции, в которой объемная доля мякоти не превышает 10 %, пробу для анализа отбирают по объему. Предварительно при наличии в пробе видимой мякоти и нерастворимых частиц их удаляют центрифугированием при факторе разделения не менее 990 g в течение 15 мин и отфильтровывают с помощью фильтра по 4.9.

Пробу для анализа объемом от 5,0 до 25,0 см³ пипеткой подходящей вместимости переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³. Объем пробы для анализа выбирают исходя из ожидаемой массовой концентрации анализируемых компонентов в пробе таким образом, чтобы массовая концентрация каждого из анализируемых компонентов в растворе пробы для хроматографического анализа находилась в границах диапазона линейности детектора, но была не менее трехкратной величины предела детектирования, указанного в инструкции по эксплуатации анализатора. В колбу пипеткой вносят основной стандартный раствор В по 6.3.3 (раствор внутреннего стандарта) в объеме, необходимом для получения массовой концентрации внутреннего стандарта в растворе пробы, максимально приближен-

ной к массовой концентрации внутреннего стандарта в градуировочном растворе. Объем содержимого в колбе доводят до метки буферным раствором цитрата лития с 2,0 или 2,2 ед. pH. Полученный раствор используют для хроматографического анализа.

7.2.2 При испытании соковой продукции с объемной долей мякоти более 10 % пробу массой 10,0 г помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, объем содержимого в колбе доводят до метки дистиллированной водой, содержимое колбы тщательно перемешивают и центрифугируют при факторе разделения не менее 990 g в течение 15 мин. В случае неполного осаждения нерастворимых в дистиллированной воде частиц пробу фильтруют через обеззоленный фильтр по 4.10. Затем подготовленную пробу объемом от 5,0 до 25,0 см³ пипеткой подходящей вместимости переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³. Объем пробы выбирают исходя из ожидаемой массовой концентрации анализируемых компонентов в пробе таким образом, чтобы массовая концентрация каждого из анализируемых компонентов в растворе пробы для хроматографического анализа находилась в границах диапазона линейности аналитического сигнала детектора, но была не менее трехкратной величины предела детектирования, указанного в инструкции по эксплуатации анализатора. В колбу пипеткой вносят основной стандартный раствор В по 6.3.3 (раствор внутреннего стандарта) в объеме, необходимом для получения массовой концентрации внутреннего стандарта в растворе пробы, максимально приближенной к массовой концентрации внутреннего стандарта в градуировочном растворе. Объем содержимого в колбе доводят до метки буферным раствором цитрата лития с 2,0 или 2,2 ед. pH. Полученный раствор используют для хроматографического анализа.

7.3 Проведение хроматографического анализа

7.3.1 Условия хроматографического анализа

Рабочее давление: 90—125 бар.

Температура колонки программируемая — от 36 °С до 87 °С.

Температура послеколоночного реактора — от 110 °С до 135 °С.

Скорость подачи буферных растворов — 35 см³/ч.

Скорость подачи нингидрина — 25 см³/ч.

Объем вводимой пробы: 10—30 мкл.

Длина волны детектора 570 или 440 нм (для аминокислот, аналогичных пролину).

Элюирование проводят с 5—6 буферными растворами с различными значениями pH, начиная с 2,6 и увеличивая до 4,0 ед. pH. Температура колонки поддерживается между 36 °С и 80 °С и обычно программируемо повышается по ходу анализа. Значение pH буферного раствора и температура колонки выбираются таким образом, чтобы условия разделения были оптимальны и лишь незначительно различались по лабораториям.

Примечание — Колонку анализатора восстанавливают раствором гидроксида лития по 4.21 молярной концентрации 0,2—0,4 моль/дм³ с добавлением органического растворителя по 4.24 (этиленгликоль, моноэтил, метанол).

Пример схемы работы аминокислотного анализатора приведен в справочном приложении А.

7.3.2 Хроматографический анализ раствора пробы

Проводят хроматографический анализ растворов проб, подготовленных по 7.2. Регистрируют площадь пика каждой аминокислоты, этаноламина и аммиака.

8 Обработка и оформление результатов измерений

Массовую концентрацию каждой аминокислоты, этаноламина и аммиака X_1, мг/дм³, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{K \cdot C_{st} \cdot S_{am} \cdot V_1}{S_{st} \cdot V_2}, \quad (3)$$

где K — градуировочный коэффициент по 6.4;

C_{st} — массовая концентрация норлейцина или норвалина (внутреннего стандарта), мкг/см³;

S_{am} — площадь пика аминокислоты, этаноламина или аммиака;

V_1 — объем разбавленной анализируемой пробы (V_1 = 50 см³), см³;

S_{st} — площадь пика норлейцина или норвалина (внутреннего стандарта);

V_2 — объем анализируемой пробы, см³.

При испытании соковой продукции с объемной долей мякоти более 10 % массовую долю каждой аминокислоты этаноламина и аммиака X_2, млн$^{-1}$, рассчитывают по формуле

$$X_2 = \frac{K \cdot C_{st} \cdot S_{am} \cdot V_1 \ V_2}{S_{st} \cdot V_3 \cdot m}, \quad (4)$$

где K — градуировочный коэффициент по 6.4;

C_{st} — массовая концентрация норлейцина или норвалина (внутреннего стандарта), мкг/см^3;

S_{am} — площадь пика аминокислоты, этаноламина или аммиака;

V_1 — объем, в котором разбавлена аликвота центрифугата (V_1 = 50 см^3), см^3;

V_2 — объем разбавленной пробы перед центрифугированием (V_2 = 50 см^3), см^3;

S_{st} — площадь пика норлейцина или норвалина (внутреннего стандарта);

V_3 — объем аликвоты центрифугата, см^3;

m — масса анализируемой пробы, г.

При необходимости пересчета массовой концентрации (массовой доли) аминокислот, этаноламина и аммиака в соковой продукции в молярную концентрацию в ммоль/дм^3 (молярной доли в ммоль/кг) значения, полученные по формулам (3) и (4), делят на их молярную массу М, значения которых приведены в таблице Г.1 приложения Г.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений $X_{ср}$, округленное до второго десятичного знака, если абсолютная величина разности между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-1, не превышает предела повторяемости (сходимости) r, приведенного в таблице Г.1 приложения Г.

Пример хроматограммы свободных аминокислот, этаноламина и аммиака в анализируемой пробе свежеотжатого яблочного сока и значения молярных концентраций свободных аминокислот в свежеотжатом яблочном соке приведены в справочном приложении Б.

9 Контроль прецизионности результатов определения

9.1 Контроль повторяемости (сходимости)

Контроль повторяемости результатов определения массовой концентрации (массовой доли) свободных аминокислот, этаноламина и аммиака проводят при получении каждого результата определения путем сравнения расхождения между результатами двух параллельных определений с пределом повторяемости (сходимости), приведенным в таблице Г.1 приложения Г.

Повторяемость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le r. \quad (5)$$

При превышении предела повторяемости (сходимости) определение повторяют. При повторном превышении указанного предела выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

9.2 Контроль воспроизводимости результатов измерений

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых определений, которые получены в условиях воспроизводимости (одна и та же методика, идентичный объект, разные лаборатории, разные операторы, различное оборудование), не должно превышать предела воспроизводимости, приведенного в таблице Г.1 приложения Г.

При превышении указанного предела воспроизводимости контрольное определение повторяют. При повторном превышении указанного предела воспроизводимости выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

10 Требования, обеспечивающие безопасность

10.1 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 выполнении 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.

10.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке результатов допускается инженер-химик, техник или лаборант, имеющий высшее или среднее специальное образование, опыт работы в химической лаборатории и изучивший инструкцию по эксплуатации аминокислотного анализатора. Первое применение метода в лаборатории должно проводиться под руководством специалиста, владеющего теорией ионообменной хроматографии и имеющего практические навыки в этой области.

Приложение А
(справочное)

Схема работы автоматического анализатора аминокислот

А.1 Пример схемы работы автоматического анализатора аминокислот Biochrom приведен на рисунке А.1.

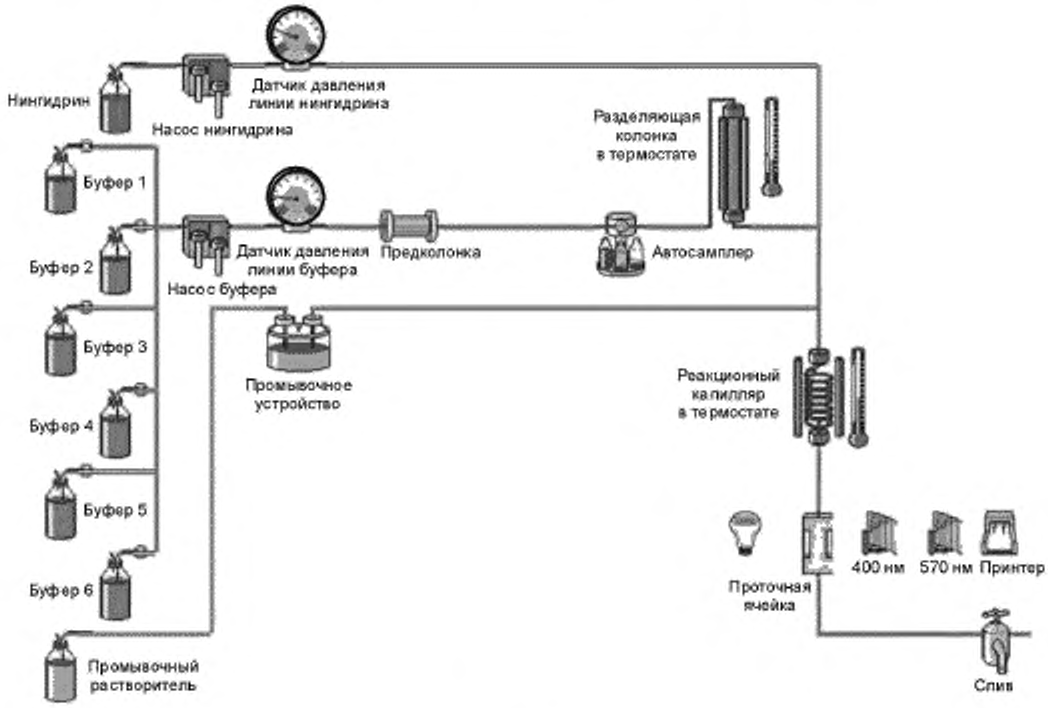

Рисунок А.1

Приложение Б
(справочное)

Хроматограмма свободных аминокислот в свежеотжатом яблочном соке

Б.1 Пример хроматограммы свободных аминокислот в свежеотжатом яблочном соке приведен на рисунке Б.1*

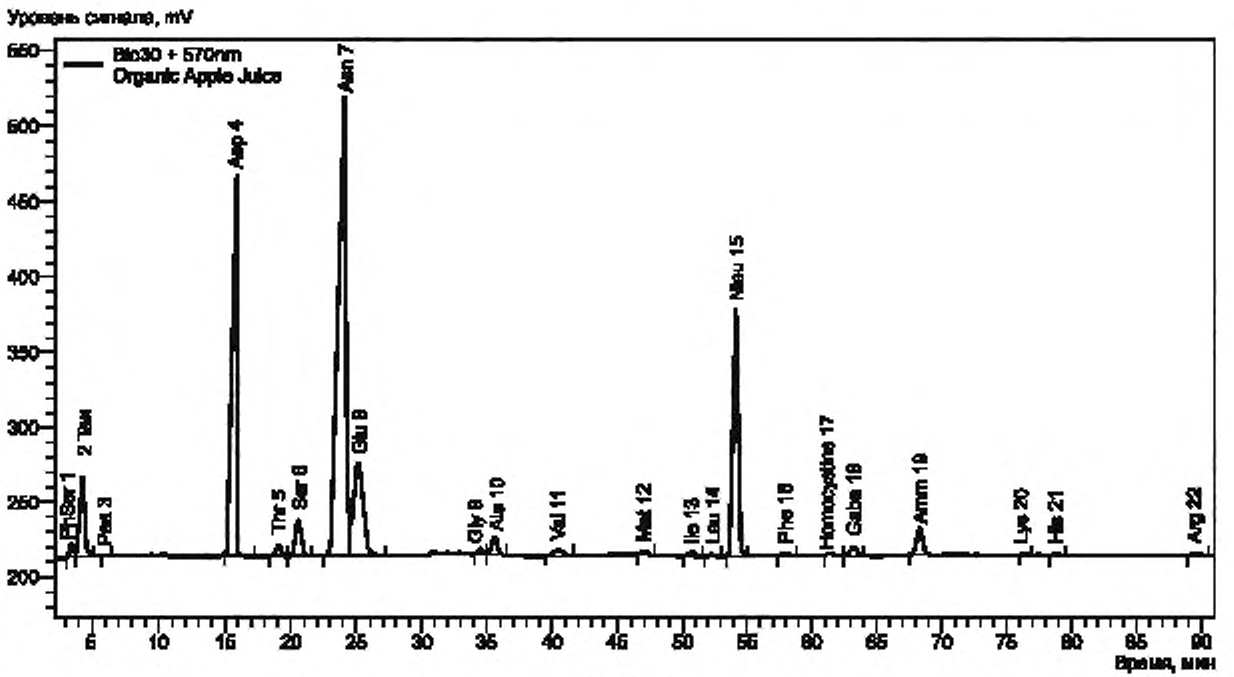

Рисунок Б.1

* Измерение выполнено на автоматическом анализаторе аминокислот Biochrom Время анализа — 90 мин.

Б.2 Молярная концентрация свободных аминокислот в соответствии с параметрами хроматограммы свободных аминокислот в свежеотжатом яблочном соке (рисунок Б.1) приведена в таблице Б.1.

Таблица Б.1 — Молярная концентрация свободных аминокислот (к рис. Б.1)

№№	Сокращенное обозначение аминокислоты	Наименование аминокислоты	Молярная концентрация, ммоль/дм^3	№№	Сокращенное обозначение аминокислоты	Наименование аминокислоты	Молярная концентрация, ммоль/дм^3
1	PhSer	Фосфосерин	0,03	13	Ile	Изолейцин	0,01
2	Tau	Таурин	0,01	14	Leu	Лейцин	0,02
3	PEA	Фосфоэтанол-амин	0,03	15	Nleu	Лецитин N-ацетилтранс-фераза	0,36
4	Asp	Аспарагиновая кислота	0,46	16	Phe	Фенилаланин	0,04
5	Thr	Треонин	0,12	17	HCys	Гомоцистин	0,01
6	Ser	Серин	0,14	18	GABA	Гамма-амино-масляная кислота	0,11
7	Asn	Аспарагин	3,39	19	Amm	Аммоний	0,17
8	Glu	Глутаминовая кислота	0,25	20	Lys	Лизин	0,02
9	Gly	Глицин	0,13	21	His	Гистидин	0,01
10	Ala	Аланин	0,00	22	Arg	Аргинин	0,01
11	Val	Валин	0,02				
12	Met	Метионин	0,04				

Приложение В
(справочное)

Значения массовой (молярной) концентрации свободных аминокислот в яблочном соке по данным AIJN

В.1 Значения показателей массовой (молярной) концентрации свободных аминокислот в яблочном соке, определяемых Сводом правил для оценки качества и аутентичности фруктовых и овощных соков (Code of Practice for evaluation of quality and authenticity of fruit and vegetable juices) ассоциации производителей соков Евросоюза (European Fruit Juice Association — AIJN), приведены в таблице В.1.

Таблица В.1 — Массовая (молярная) концентрация свободных аминокислот в яблочном соке по данным AIJN [3]

Наименование аминокислоты	Массовая концентрация, мг/дм^3	Молярная концентрация, ммоль/ дм^3
Аспарагиновая кислота	30—300	0,23—2,26
Треонин	1—20	0,01—0,17
Серин	5—60	0,05—0,57
Аспарагин	100—1500	0,76—11,36
Глутаминовая кислота	10—200	0,07—1,36
Глутамин	Не более 25	Не более 0,17
Пролин	Не более 20	Не более 0,17
Глицин	Не более 10	Не более 0,13
Аланин	1—50	0,01—0,56
Валин	Не более 40	Не более 0,34
Метионин	Не более 30	Не более 0,20
Изолейцин	Не более 10	Не более 0,08
Лейцин	Не более 10	Не более 0,08
Тирозин	Не более 10	Не более 0,06
Фенилаланин	Не более 15	Не более 0,09
Гамма-аминомасляная кислота	1—30	0,01—0,29
Орнитин	Не более 1	Не более 0,01
Лизин	Не более 10	Не более 0,07
Гистидин	Не более 10	Не более 0,06
Аргинин	Не более 10	Не более 0,06

Приложение Г
(справочное)

Основные метрологические характеристики метода

Таблица Г.1 — Основные метрологические характеристики метода*

Наименование показателя	Диапазон измерений, ммоль/дм^3	
	< 0,1	> 0,1
Стандартное отклонение повторяемости S_r, ммоль/дм^3	0,0047	0,0132X + 0,0026
Предел повторяемости (сходимости) r, ммоль/дм^3	0,013	2,8*S_r
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R, ммоль/дм^3	0,00683	0,0473X + 0,007
Предел воспроизводимости R, ммоль/дм^3	0,019	2,8*S_R

X — результат измерений по разделу 8, ммоль/дм^3.

Примечание — Молярные массы анализируемых компонентов М:
Аланин — 89 г/моль.
Аргинин — 174 г/моль.
Аспарагиновая кислота — 133 г/моль.
Аспарагин — 132 г/моль.
Валин — 117 г/моль.
Гамма-аминомасляная кислота — 103 г/моль.
Гистидин — 155 г/моль.
Глицин — 75 г/моль.
Глутаминовая кислота — 147 г/моль.
Глутамин — 146 г/моль.
Изолейцин — 131 г/моль.
Лейцин — 131 г/моль.
Лизин — 146 г/моль.
Метионин — 149 г/моль.
Орнитин — 132 г/моль.
Пролин — 115 г/моль.
Фенилаланин — 165 г/моль.
Серин — 105 г/моль.
Тирозин — 181 г/моль.
Треонин — 119 г/моль.
Этаноламин — 61 г/моль.
Аммиак — 17 г/моль.

* По данным ИФУ 57:1989 «Определение свободных аминокислот» (в редакции 2005 г.)

Библиография

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

[2] ТУ 6-09-3147-91 Набор аминокислот № 2 (большой)

[3] Справочный стандарт по качеству яблочного сока № 6.3 (май 2011 г.) Свода правил для оценки качества и аутентичности фруктовых и овощных соков Европейской ассоциации производителей соков (COP 6.3 Reference Guideline for Apple Juce — Revision May 2011, AIJN Code of Practice for evaluation of quality and authenticity of fruit and vegetable juices) (http://gost.e-ecolog.ru)

УДК 664.863.001.4:006.354 ОКС 67.050, 67.080 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: соковая продукция, определение, хроматографический анализ, стандартные растворы, градуировочный раствор, массовая концентрация, массовая доля, молярная концентрация аминокислот, глутамин, аспарагин, аргинин, орнитин, аминомасляная кислота, гистидин, лизин, аспарагиновая кислота, фенилаланин, тирозин, метионин, глицин, серин, лейцин, валин, треонин, пролин, изолейцин, аланин, глутаминовая кислота, аммиак, этаноламин, обработка и оформление результатов измерений, контроль погрешности результатов измерений, требования, обеспечивающий безопасность

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

Сдано в набор 04.10.2012. Подписано в печать 12.11.2012. Формат 60x84 1/8. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,50. Тираж 185 экз. Зак. 1018.

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