МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32799— 2014

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение свободных аминокислот методом ионообменной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. № 45-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 1 августа 2014 г. № 854-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32799—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2016 г.

5 В настоящем стандарте учтены основные положения и метрологические характеристики метода Международной федерации производителей фруктовых соков (International Federation of Fruit Juice Produces) IFUMA57 (1989) (Rev. 2005) «Determination of free amino acids» (метод ИФУ 57:1989 (Rev. 2005) «Определение свободных аминокислот»

6 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 54743—2011[1)]

7 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

8 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

[1)] Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 1 августа 2014 г. № 854-ст ГОСТ Р 54743—2011 отменен с 1 января 2016 г.

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

В Российской Федерации 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 и подготовка проб . . . 4
6 Подготовка к проведению измерений . . . 4
7 Порядок проведения измерений . . . 6
8 Обработка и оформление результатов измерений . . . 7
9 Контроль качества результатов измерений и процедуры контроля стабильности результатов измерений при реализации метода в лаборатории . . . 7
10 Требования, обеспечивающие безопасность . . . 8
Приложение А (справочное) Схема работы автоматического анализатора аминокислот . . . 9
Приложение Б (справочное) Хроматограмма свободных аминокислот в пробе свежеотжатого яблочного сока . . . 10
Приложение В (справочное) Массовая (молярная) концентрация свободных аминокислот в яблочном соке по данным AIJN . . . 12
Приложение Г (справочное) Основные метрологические характеристики метода . . . 13
Библиография . . . 14

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение свободных аминокислот методом ионообменной хроматографии

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

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары, 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 определения 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 с применением ионообменной хроматографии.

Метод может быть использован в том числе для определения этаноламина и аммиака.

Нижний предел измерений массовой (молярной) концентрации каждого из указанных выше компонентов составляет 1 мг/дм^3 (1 ммоль/дм^3). Верхний предел измерений массовой (молярной) концентрации каждого из указанных выше компонентов 5000 мг/дм^3 (5000 ммоль/дм^3).

Настоящий стандарт может применяться для целей идентификации.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

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

ГОСТ 61 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 199 Реактивы. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия

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

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 5820 Реактивы. Калий уксуснокислый. Технические условия

ГОСТ 9245 Потенциометры постоянного тока измерительные. Общие технические условия

ГОСТ 9656 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 11311 Фенол каменноугольный. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26313 Продукты переработки фруктов и овощей. Правила приемки и методы отбора проб

Издание официальное

ГОСТ 26671 Продукты переработки фруктов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

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

ГОСТ 31643—2012 Продукция соковая. Определение аскорбиновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ISO 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний[1)]

ГОСТ ИСО 5725-1—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения[2)]

ГОСТ ИСО 5725-6 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике[3)]

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий[4)]

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru казателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Метод основан на хроматографическом разделении смеси аминокислот на колонке с катионообменным сорбентом и последующим ступенчатым элюированием буферными растворами.

Разделенные аминокислоты вступают в реакцию с нингидрином при температуре 100 °С — 135 °С. Окрашенный элюат, содержащий смесь свободных аминокислот, детектируют с помощью фотометрического детектора при длинах волн 570 и 440 нм.

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

4.1 Анализатор аминокислот автоматический[5)], состоящий:

- из системы градиентного элюирования;
- системы постколоночной дериватизации;
- спектрофотометрического детектора для одновременного измерения оптической плотности при длинах волн 570 и 440 нм с проточной кюветой объемом 15 мм^3, обеспечивающего предел детектирования аминокислот не более 1 пмоль;
- программно-аппаратного комплекса сбора и обработки результатов измерений;
- хроматографической колонки следующих размеров (внутренний диаметр × длина): 9 × 500 мм, 6 × 200 мм, 4,6 × 200 или 270 мм, 4 × 200 мм, 3,2 × 140 мм, заполненной катионообменной смолой с

1) В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

2) В Российской Федерации действует также ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002.

3) В Российской Федерации действует также ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

4) Действует ГОСТ ISO 17025—2009.

5) Автоматический анализатор аминокислот фирмы Biochrom 30+ обеспечивает требуемую эффективность хроматографического разделения. Данная информация не является рекламой указанного прибора и не исключает возможности применения других анализаторов.

привитыми сульфогруппами[1)], пригодной для работы в диапазоне от 2,0 до 7,0 ед. pH и обеспечивающей хроматографическое разделение аминокислот при использовании ступенчатого градиента pH подвижной фазы.

4.2 Комплект из семи готовых буферных растворов к анализатору аминокислот.

4.3 Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального (I) класса точности с наибольшим пределом взвешивания не более 150 г и пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,005 г.

4.4 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

- колбы П-2—1000—34;
- воронки лабораторные типа В;
- стаканы В или Н различной вместимости.

4.5 Пипетки градуированные с относительной погрешностью дозирования ± 1 % по ГОСТ 29227 1-го класса точности или дозаторы пипеточные с аналогичными или изменяемыми объемами доз с относительной погрешностью дозирования не более ± 1 % по технической документации изготовителя.

4.6 Микрошприцы для ВЭЖХ вместимостью 25, 100 и 250 мм^3 с относительной погрешностью дозирования не более 1 %.

4.7 Посуда мерная лабораторная стеклянная по ГОСТ 1770:

- цилиндры 1—50—2 и 1—1000—2;
- колбы мерные 2—25—2, 2—50—2, 2—100—2, 2—500—2 и 2—1000—2;
- пробирки 1—25—0,1.

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

4.9 Фильтры мембранные с диаметром пор 0,22 и 0,45 мкм для фильтрования подвижной фазы и проб.

4.10 Фильтры обеззоленные.

4.11 Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения не менее 1000 g с адаптером для пробирок подходящей вместимости.

4.12 Установка лабораторная для вакуумной мембранной фильтрации с мини-насосом.

4.13 Иономер (pH-метр) по ГОСТ 9245 с погрешностью измерения не более 0,05 ед. pH, снабженный комбинированным стеклянным электродом.

4.14 Баня ультразвуковая.

4.15 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.16 Цитрат лития[2)] 4-х водный $Li_3C_6H_5O_7 \cdot 4H_2O$, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

4.17 Хлорид лития[1)], массовой долей не менее 98 %.

4.18 Гидроксид лития[1)] массовой долей не менее 98 %.

4.19 Фенол кристаллический по ГОСТ 11311, массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.20 Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

4.21 Этилцеллозольв (моноэтиловый эфир этиленгликоля), $C_4H_{10}O_2$ для хроматографии, с массовой долей основного вещества не менее 99,8 % и показателем преломления n_D в пределах 1,407—1,408.

4.22 Кислота борная, х. ч. по ГОСТ 9656.

4.23 Полиэтиленгликольмонолауриловый эфир $C_{58}H_{118}O_{24}$, плотностью 1,03 г/см^3 (CAS No 9002-92-0), водный раствор с массовой долей 30 %.

4.24 2,2-Тиодиэтанол, массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.25 Нингидрин (2,2-дигидрокси-1,3-индандион), массовой долей основного вещества не менее 95 %.

4.26 Натрий уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 199 (или калий уксуснокислый по ГОСТ 5820), ч. д. а.

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

4.28 Хлорид титана (III) 6-водный $TiCl_3 \cdot 6H_2O$, 15 % раствор в соляной кислоте, ч.

4.29 Гидриндантин 2-водный $C_{18}H_{10}O_6$, с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

4.30 Натрий лимоннокислый трехзамещенный (цитрат натрия) по ГОСТ 22280, ч. д. а.

4.31 Норлейцин, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

4.32 Норвалин, массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.33 Вода по ГОСТ ISO 3696, 1-й степени чистоты.

4.34 Стандартная смесь аминокислот в комплекте к анализатору аминокислот или индивидуальные аминокислоты (в форме DL- или L-оптических изомеров): α-аминомасляная, аспарагиновая,

---

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

[2)] Соли лития токсичны и влияют на центральную нервную систему.

глутаминовая, аланин, изолейцин, фенилаланин, глутамин, лизин, треонин, пролин, валин, лейцин, серин, глицин, метионин, тирозин, орнитин, аргинин, гистидин, аспарагин, с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам, а также посуды, реактивов, в том числе готовых наборов реактивов, по качеству не ниже перечисленных в настоящем разделе и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

5 Отбор и подготовка проб

Отбор проб — по ГОСТ 26313, подготовка проб — по ГОСТ 26671. Подготовка проб концентрированной соковой продукции и пюре — по ГОСТ 31643—2012 (раздел 6.2).

6 Подготовка к проведению измерений

Включение и подготовку анализатора к работе, вывод его на режим и выключение по окончании работы осуществляют в соответствии с руководством по эксплуатации.

6.1 Подготовка буферных растворов для анализатора аминокислот

При проведении определений применяют семь готовых буферных растворов, входящих в комплект анализатора по 4.2, с кислотностью 2,2, 2,8, 3,0, 3,15, 3,50, 3,55 и 6 ед. pH.

Допускается приготовление буферных растворов с кислотностью 2.2, 2,8, 3,0, 3,15, 3,50, 3,55 и 6 ед. pH в лабораторных условиях из компонентов по 4.16—4.18 и воды в соответствии с инструкцией по использованию автоматического анализатора аминокислот.

Кислотность буферных растворов регулируют с помощью соляной кислоты, регистрируя показания pH-метра. Растворы консервируют добавлением 0,01 % по массе фенола (см. 4.19) или 2,2-тиодиэтанола (см. 4.24).

Условия и срок хранения буферных растворов — в соответствии с рекомендациями производителя анализатора.

6.2 Подготовка дериватизирующего (красящего) реагента

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

Допускается приготовление дериватизирующего реагента в лабораторных условиях из компонентов по 4.25—4.30 и воды в соответствии с инструкцией по использованию автоматического анализатора аминокислот.

Условия и срок хранения дериватизирующего реагента — в соответствии с рекомендациями производителя анализатора.

6.3 Приготовление рабочих растворов

Рабочие растворы включают исходные растворы А, Б, В и градуировочный раствор из смеси аминокислот.

6.3.1 Для приготовления исходного раствора А используют отдельные аминокислоты, указанные в таблице 1, либо стандартную смесь аминокислот, входящую в комплект анализатора, а также этаноламин и аммиак.

Таблица 1

№ пп	Наименование аминокислоты	№ пп	Наименование аминокислоты
1	Аланин (Ala)	5	Валин (Val)
2	η-Аминомасляная кислота (Abu)	6	Гистидин (His)
3	Аргинин (Arg)	7	Глицин (Gly)
4	Аспарагиновая кислота (Asp)	8	Глутаминовая кислота (Glu)

Окончание таблицы 1

№ пп	Наименование аминокислоты	№ пп	Наименование аминокислоты
9	Изолейцин (Ile)	14	Серин (Ser)
10	Лейцин (Leu)	15	Тирозин (Tyr)
11	Лизин (Lys)	16	Треонин (Thr)
12	Орнитин (Orn)	17	Фенилаланин (Phe)
13	Пролин (Pro)	18	Метионин (Met)

6.3.2 Для приготовления исходного раствора Б используют аминокислоты аспарагин (Asn) и глутамин (Gln) (см. 4.34).

6.3.3 Для приготовления исходного раствора В (раствора внутреннего стандарта) используют норлейцин (см. 4.31) или норвалин (см. 4.32).

6.3.4 Исходные растворы А, Б и В готовят путем растворения веществ, указанных в 6.3.1—6.3.3, в буферном растворе цитрата лития с кислотностью 2,0 ед. pH в мерных колбах вместимостью 25, 50 или 100 $см^3$.

Требуемую массу каждого вещества, используемого для приготовления исходных растворов m, мг, вычисляют по формуле

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

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

V_1 — объем градуировочного раствора, $см^3$;

V_2 — объем исходного раствора, $см^3$;

V_3 — объем исходного раствора, взятый для приготовления градуировочного раствора, $см^3$.

Срок хранения исходных градуировочных растворов при температуре минус 18 °С — не более 6 мес.

6.3.5 Для приготовления рабочего градуировочного раствора в мерной колбе вместимостью 100 $см^3$ с помощью пипеток подходящей вместимости смешивают объемы от 2 до 10 $см^3$ исходных растворов А, Б и В, соблюдая при этом следующее требование: массовая концентрация каждой аминокислоты, этаноламина или аммиака в градуировочном растворе должна находиться в границах диапазона линейности аналитического сигнала детектора, указанного в инструкции по эксплуатации анализатора.

Градуировочный раствор готовят непосредственно перед проведением измерений.

6.4 Построение градуировочной характеристики

Процедуры построения градуировочной характеристики и обработку хроматограмм выполняют в соответствии с руководством пользователя программным обеспечением анализатора.

Для каждого градуировочного раствора выполняют два параллельных измерения в условиях повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1—2003 (подраздел 3.14). Компоненты идентифицируют по абсолютным значениям времени удерживания.

Регистрируют площадь пика каждой аминокислоты, этаноламина и аммиака.

Градуировочный коэффициент k_i для каждой аминокислоты, этаноламина и аммиака, вычисляют по результатам измерений градуировочных растворов с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных или при его отсутствии в составе хроматографа вручную методом внутреннего стандарта по формуле

$$k_i = \frac{C_i \cdot S_{ст}}{C_{ст} \cdot S_i}, \quad (2)$$

где C_i — массовая концентрация i-й аминокислоты, этаноламина или амиака в градуировочном растворе, определяемая по 6.3.4, мг/$см^3$;

$S_{ст}$ — площадь пика норлейцина или норвалина (внутреннего стандарта) по результатам измерения градуировочного раствора, мВ · с;

$C_{ст}$ — массовая концентрация норлейцина или норвалина (внутреннего стандарта) в градуировочном растворе, мг/$см^3$;

S_i — площадь пика i-й аминокислоты, этаноламина или аммиака по результатам измерений градуировочного раствора, мВ · с.

Результаты вычисления градуировочного коэффициента считаются приемлемыми, если значение коэффициента корреляции составляет не менее 0,995 для каждого компонента градуировочного раствора.

Градуировочную характеристику строят каждый раз при смене оборудования, колонок, условий измерений или при выявлении несоответствия метрологическим требованиям результатов оперативного контроля или внутреннего аудита.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работ с применением одного рабочего градуировочного раствора по одной из аминокислот, чередуя их. В случае обнаружения отклонения результатов измерения массовой концентрации аминокислоты в градуировочном растворе более чем на 3,5 % проводят его повторное измерение.

В случае повторного отклонения градуировочную характеристику строят заново во всем диапазоне измерений.

7 Порядок проведения измерений

7.1 Условия проведения измерений

При подготовке к проведению и проведении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха — (25 ± 5) °С;
- атмосферное давление — (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность — не более 85 %;
- напряжение в питающей сети — (220 ± 20) В;
- частота тока в питающей сети — (50 ± 1) Гц.

Помещение, в котором проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

7.2 Приготовление растворов проб для хроматографического измерения

7.2.1 При испытании соковой продукции, в которой объемная доля мякоти не превышает 10 %, пробу для измерения отбирают по объему. Предварительно, при наличии в пробе видимой мякоти или нерастворимых частиц, их удаляют центрифугированием при факторе разделения не менее 990 g в течение 15 мин или фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм или обеззоленный фильтр.

Фильтрат объемом от 5 до 25 $см^3$ пипеткой подходящей вместимости переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$. Объем пробы для измерения выбирают, исходя из ожидаемой массовой концентрации компонентов в пробе таким образом, чтобы массовая концентрация каждого из компонентов в растворе пробы для хроматографического измерения находилась в границах диапазона линейности детектора, но была не менее трехкратной величины предела детектирования, указанного в инструкции по эксплуатации анализатора. В колбу пипеткой вносят исходный раствор В (см. 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 ед. pH.

Полученный раствор используют для хроматографического определения.

7.2.2 При испытании соковой продукции с объемной долей мякоти 10 % и более пробу массой 10,0 г помещают в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, объем содержимого в колбе доводят до метки водой, содержимое колбы тщательно перемешивают и центрифугируют при факторе разделения не менее 990 g в течение 15 мин. В случае неполного осаждения нерастворимых в воде частиц пробу фильтруют в пробирку через мембранный или обеззоленный фильтр. Затем подготовленную пробу объемом от 5,0 до 25,0 $см^3$ пипеткой подходящей вместимости переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$.

Объем пробы выбирают, исходя из ожидаемой массовой концентрации аминокислот в пробе таким образом, чтобы массовая концентрация каждого из компонентов в растворе пробы для хроматографического измерения 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 исходный раствор В (см. 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 ед. pH.

Полученный раствор используют для хроматографического определения.

8 Обработка и оформление результатов измерений

Обработку хроматограмм и определение массовой концентрации аминокислот проводят с использованием программного обеспечения анализатора.

8.1 Массовую концентрацию каждой аминокислоты, этаноламина и аммиака C, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$C = \frac{k_i \cdot C_{ст} \cdot S_i \cdot V_1}{S_{ст} \cdot V_2 \cdot 1000}, \quad (3)$$

где k_i — градуировочный коэффициент, мг/см^3 · (мВ · с)$^{-1}$;

$C_{ст}$ — массовая концентрация внутреннего стандарта (норлейцина или норвалина) в градуировочном растворе, мг/см^3;

S_i — площадь пика i-й аминокислоты, этаноламина или аммиака на хроматограмме, мВ · с;

V_1 — вместимость мерной колбы, взятой для разбавления пробы, см^3;

$S_{ст}$ — площадь пика внутреннего стандарта (норлейцина или норвалина) на хроматограмме, мВ · с;

V_2 — объем пробы, см^3.

8.2 Молярную концентрацию X, ммоль/дм^3, каждой аминокислоты, этаноламина и аммиака вычисляют по формуле

$$X = \frac{C}{M}, \quad (4)$$

где M — молярная масса i-й аминокислоты, г/моль (см. приложение Г, таблицу Г.1).

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 ИСО 5725-1, не превышает предела повторяемости (сходимости) r, приведенного в таблице Г.1 приложения Г.

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

Метрологические характеристики метода приведены в справочном приложении Г.

Окончательный результат измерений регистрируют в протоколе испытаний согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025 с указанием метода определения и настоящего стандарта.

9 Контроль качества результатов измерений и процедуры контроля стабильности результатов измерений при реализации метода в лаборатории

9.1 Контроль качества результатов измерений при реализации метода в лаборатории предусматривает:

- контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки внутрилабораторной прецизионности и погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, среднеквадратического отклонения внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности, погрешности).

9.2 Оперативный контроль погрешности (точности) результатов измерений осуществляют в соответствии с рекомендациями [1].

9.3 Контроль стабильности результатов измерений при реализации метода в лаборатории осуществляют по ГОСТ ИСО 5725-6 и [1], используя методы контроля стабильности стандартного отклонения промежуточной прецизонности и погрешности по ГОСТ ИСО 5725-6 с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля результатов измерений регламентируют в руководстве по качеству лаборатории в соответствии с ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 (подраздел 4.2).

10 Требования, обеспечивающие безопасность

10.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007. При подготовке проб и выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила по электробезопасности — по ГОСТ 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

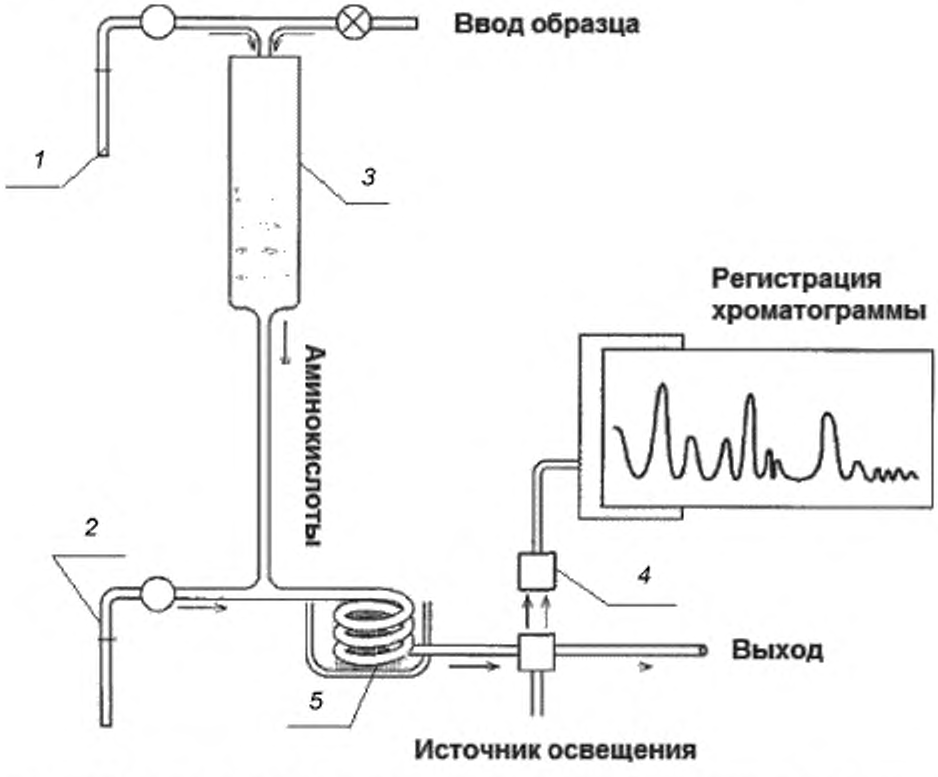
10.2 Требования к квалификации оператора

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)

Схема работы автоматического анализатора аминокислот

А.1 Приниципиальная схема работы автоматического анализатора аминокислот Biochrom приведена на рисунке А.1.



1 — линия подачи буферных растворов; *2* — линия подачи дериватизирующего реагента (нингидрина); *3* — ионообменная колонка; *4* — фотоэлектрический умножитель (детектор); *5* — реакционная петля

Рисунок А.1 — Принципиальная схема работы аминокислотного анализатора

Приложение Б
(справочное)

Хроматограмма свободных аминокислот в пробе свежеотжатого яблочного сока

Б.1 Пример хроматограммы свободных аминокислот в пробе свежеотжатого яблочного сока приведен на рисунке Б.1[1)].

Б.2 Молярная концентрация свободных аминокислот в соответствии с параметрами хроматограммы свободных аминокислот в пробе свежеотжатого яблочного сока (рисунок Б.1) приведена в таблице Б.1.

Таблица Б.1 — Молярная концентрация свободных аминокислот

№ п/п	Сокращенное обозначение	Наименование аминокислоты	Молярная концентрация, ммоль/дм^3	№ п/п	Сокращенное обозначение	Наименование аминокислоты	Молярная концентрация, ммоль/дм^3
1	PhSer	Фосфосерин	0,03	19	Ile	Изолейцин	0,01
2	Tau	Таурин	0,01	20	Leu	Лейцин	0,02
3	PEA	Фосфоэтаноламин	0,03	21	Tyr	Тирозин	0,01
4	Urea	Мочевина	0,12	22	bAla	Бета-аланин	0,07
5	Asp	Аспарагиновая кислота	0,46	23	Phe	Фенилаланин	0,04
6	Thr	Треонин	0,12	24	HCys	Гомоцистин	0,01
7	Ser	Серин	0,14	25	GABA	Гамма-аминомасляная кислота	0,11
8	Asn	Аспарагин	3,39	26	EA	Этаноламин	0,09
9	Glu	Глутаминовая кислота	0,25	27	Amm	Аммиак	0,17
10	Gin	Глутамин	0,01	28	Om	Орнитин	0,00
11	Sarc	Саркозин	0,08	29	Lys	Лизин	0,02
12	AAAA	Альфа-аминоадипиновая кислота	0,01	30	His	Гистидин	0,01
13	Gly	Глицин	0,13	31	Ans	Ансерин	0,06
14	Ala	Аланин	0,00	32	Car	Карнитин	0,11
15	AABA	Альфа-аминомасляная кислота	0,01	33	Arg	Аргинин	0,01
16	Val	Валин	0,02	34	HyPro	Гидроксипролин	0,10
17	Cys	Цистин	0,01	35	Pro	Пролин	0,02
18	Met	Метионин	0,04				

[1)] Измерение выполнено на аминокислотном анализаторе Biochrom 30+ производства компании Biochrom (Великобритания).

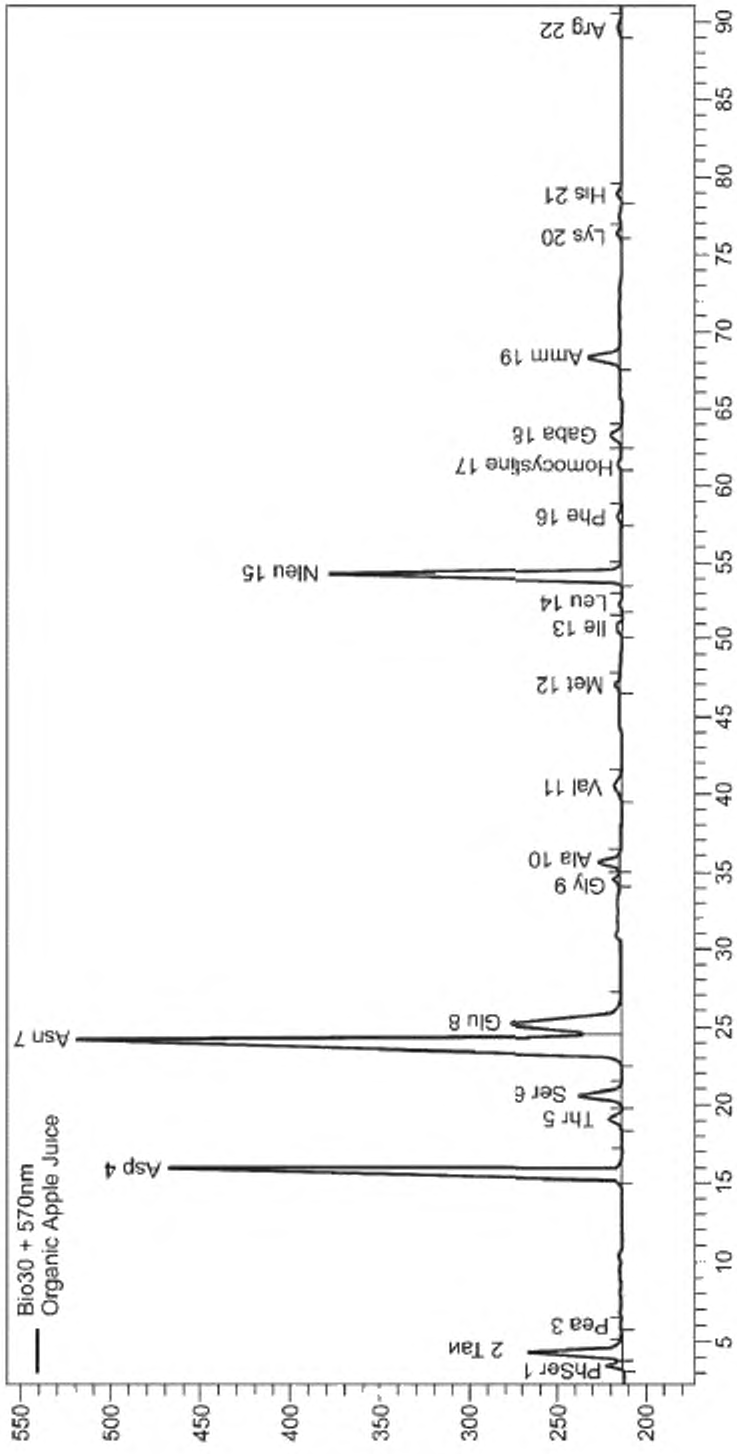


Рисунок Б.1 — Хроматограмма свободных аминокислот в образце свежеотжатого яблочного сока

Приложение В
(справочное)

Массовая (молярная) концентрация свободных аминокислот в яблочном соке по данным AIJN

В.1 Значения показателей, определяемых Сводом правил для оценки качества фруктовых и овощных соков Ассоциации производителей соков Евросоюза (AIJN) приведены в таблице В.1.

Таблица В.1 — Массовая (молярная) концентрация свободных аминокислот в яблочном соке по данным [2]

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 0,2
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
η-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 ИФУ 57:1989 (Rev. 2005) «Определение свободных аминокислот»

Наименование показателя	Диапазон измерений, ммоль/дм^3	
	Менее 0,1	От 0,1 и выше
Стандартное отклонение повторяемости S_r, ммоль/дм^3	0,005	$0,0132X + 0,0026$
Предел повторяемости (сходимости) r, ммоль/дм^3	0,013	$2,8S_r$
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R, ммоль/дм^3	0,007	$0,0473X + 0,007$
Предел воспроизводимости R, ммоль/дм^3	0,019	$2,8S_R$

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

Молярные массы анализируемых компонентов (M):

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

Библиография

[1] РМГ 76—2004 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

[2] 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)

УДК 664.863.001.4:006.354

МКС 67.050
67.080

Ключевые слова: продукция соковая, 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 *Н.Е. Рагузина*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Ю.В. Половой*

Сдано в набор 05.11.2019. Подписано в печать 27.11.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,33. Уч.-изд. л. 2,10.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,

117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru