МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32771— 2014

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение органических кислот методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Некоммерческой организацией «Российский союз производителей соков» (РСПС) при участии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт питания» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИ питания» РАМН) и закрытого акционерного общества «Мултон» (ЗАО «Мултон»)

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 августа 2014 г. № 970-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32771—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2016 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 54684—2011

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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, 2014

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение органических кислот методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products. Determination of organic acids by reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Дата введения — 2016—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 суммы свободных форм и солей следующих органических кислот: щавелевой, винной, хинной, яблочной, изолимонной, лимонной, молочной, шикимовой, янтарной и фумаровой.

Органические кислоты, имеющие оптические изомеры, детектируются в виде суммы их энантиомеров (D- и L- форм). Измерение отдельных форм оптических изомеров не входит в область применения настоящего стандарта.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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. Классификация и общие требования безопасности

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

ГОСТ 12.1.019–79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты*

ГОСТ OIML R 76-1–2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ 2493–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3652–69 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ ISO 3696–2013 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний**

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

ГОСТ ИСО 5725-6–2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

ГОСТ 5817–77 Реактивы. Кислота винная. Технические условия

* На территории Российской федерации действует ГОСТ Р 12.1.019–2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

** На территории Российской федерации действует ГОСТ Р 52501-2005 «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

Издание официальное

ГОСТ 6341–75 Реактивы. Кислота янтарная. Технические условия

ГОСТ 6552–80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 9245–79 Потенциометры постоянного тока измерительные. Общие технические условия

ГОСТ ИСО/МЭК 17025–2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

ГОСТ 17567–81 Хроматография газовая. Термины и определения

ГОСТ 22180–76 Реактивы. Кислота щавелевая. Технические условия

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные. Типы. Основные параметры и размеры.

ГОСТ 26313–84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб.

ГОСТ 26671–85 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов.

ГОСТ 28311–89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний.

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

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 ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. 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

Метод основан на определении индивидуальных органических кислот путем их разделения на твердом носителе C_{18} по обращенно-фазовому механизму.

Идентификацию и количественный расчет пиков кислот проводят при индивидуальных максимумах их светопоглощения в ультрафиолетовой области спектра сопоставлением со временем удерживания их в градуировочных растворах.

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

4.1 Хроматограф жидкостный, оснащенный спектрофотометрическим или диодноматричным детектором (рабочий диапазон длин волн поглощения от 200 до 600 нм), хроматографической колонкой и программно-аппаратным комплексом сбора и обработки результатов.

4.2 Детектор спектрофотометрический, позволяющий проводить измерения оптической плотности при длине волны 210 нм с проточной кюветой рабочим объемом не более 20 мм^3 с характеристиками, указанными в таблице 1 или диодноматричный детектор с характеристиками, указанными в таблице 2.

Таблица 1 – Рекомендуемые технические и метрологические характеристики для спектрофотометрического детектора

Технические характеристики при 254 нм			Метрологические характеристики			
			Относительное среднеквадратическое отклонение, %			
Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, не более	Дрейф нулевого сигнала, не более	Предел детектирования по фенолу, не более	по площади пика, не более	по высоте пика, не более	по времени удерживания, не более	по площади пика за 8 ч непрерывной работы, не более
$1{,}5 \cdot 10^{-5}$ е. о. п.	$5 \cdot 10^{-4}$ е. о. п./ч	$7 \cdot 10^{-10}$ г/см^3	5	5	1	4

Таблица 2 – Рекомендуемые технические и метрологические характеристики для диодноматричного детектора

Технические характеристики при 254 нм			Метрологические характеристики			
			Относительное среднеквадрати-ческое отклонение выходного сигнала, %		Относительное изменение выходного сигнала за 8 ч непрерывной работы, %	
Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, не более	Дрейф нулевого сигнала, не более	Предел детектиро-вания по антрацену, не более	по времени удерживания, не более	по площади пика, не более	по времени удерживания, не более	по площади пика, не более
$3 \cdot 10^{-5}$ е. о. п.	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$ е. о. п./ч	$2 \cdot 10^{-9}$ г/см^3	2	2	4	4

4.3 Колонки хроматографические для ВЭЖХ:

- длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом (RP или C_{18}), с размером частиц 5 мкм,*
- длиной 300 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем, с привитыми группами C_{18}, с блокированными остаточными силанольными группами (энд-кэппинг), привитыми дополнительно полярными группами С3 (замещенный аминопропил), с размером частиц 5 мкм**.

4.4 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 1-10-0,1 и 1-20-0,1.

4.5 Емкости для жидких проб (виалы) вместимостью от 2 до 6 см^3.

4.6 Установка для дегазации растворителей и подвижной фазы (элюента).

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

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

4.9 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

- колбы плоскодонные П-2-1000;
- колбы конические Кн-2-1000;
- стаканы В-1-50, В-1-100 и Н-1-1000;
- воронки лабораторные.

4.10 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.11 Шприц медицинский вместимостью 5 см^3.

4.12 Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения не менее 1000 g и ротором с соответствующим адаптером для пробирок подходящей вместимости.

4.13 Мешалка магнитная лабораторная.

4.14 pH-метр по ГОСТ 9245 с диапазоном измерений от 2 до 14 ед. pH, погрешностью измерений не более 0,05 ед. pH, снабженный комбинированным стеклянным электродом.

4.15 Вода по ГОСТ ISO 3696, 2-й степени чистоты.

4.16 Калий фосфорнокислый двузамещенный (дигидрофосфат) KH_2PO_4 безводный, массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.17 Калий фосфорнокислый двузамещенный (дигидрофосфат) 3-водный $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ по ГОСТ 2493, ч. д. а.

4.18 Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552, ч. д. а.

4.19 Ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ, с содержанием основного вещества не менее 99,9 %.

4.20 Моногидрат лимонной кислоты по ГОСТ 3652, ч. д. а.

4.21 Кислоты органические:

- кислота винная по ГОСТ 5817, ч. д. а.;
- кислота хинная, массовой долей основного вещества не менее 98,0 %;
- кислота шикимовая, массовой долей основного вещества не менее 97,0 %;
- кислота L-молочная, массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;

---

* Колонки марок Phenomenex C18 (LUNA), Atlantis C18 (WATERS) обеспечивают требуемую эффективность хроматографического разделения. Данная информация не является рекламой указанных колонок и не исключает возможность применения колонок других марок.

** Колонка марки Restek Allure Organic Acids обеспечивает требуемую эффективность хроматографического разделения. Данная информация не является рекламой указанной колонки и не исключает возможность применения колонок других марок.

- соль тринатриевая D-, L-изолимонной кислоты, массовой долей основного вещества не менее 93,0 %;
- кислота фумаровая, массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;
- кислота яблочная, массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;
- кислота щавелевая по ГОСТ 22180, 2-х водная, ч. д. а.;
- кислота янтарная ГОСТ 6341, ч. д. а.

4.22 Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания не более 150 г со значением среднеквадратического отклонения (СКО), не превышающим 0,05 мг и пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,005 г.

4.23 Микродозаторы переменного объема 5-50, 50-200, 200-1000 мм^3 и с пределом допускаемой погрешности измерения ± 5 % по ГОСТ 28311.

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

5 Отбор и подготовка проб

5.1 Отбор проб – по ГОСТ 26313, подготовка проб – по ГОСТ 26671, ГОСТ 31643 (раздел 6.2).

6 Подготовка к проведению измерений

При подготовке к проведению и проведении измерений соблюдают следующие условия:
- температура окружающего воздуха, °С – 25 ± 5;
- атмосферное давление, кПа – 97 ± 10;
- относительная влажность, % – от 40 до 90;
- напряжение в питающей сети, В – 220 ± 20;
- частота тока в питающей сети, Гц – 50 ± 1.

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

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

6.1 Приготовление фосфатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 (подвижной фазы)

Для приготовления раствора 13,6 г безводного дигидрофосфата калия (см. 4.16) или 3-водного дигидрофосфата калия (см. 4.17), в пересчете на безводный, помещают в коническую колбу вместимостью 1000 см^3 и растворяют в воде при перемешивании на магнитной мешалке. Затем доводят кислотность полученного раствора до значения (2,4 ± 0,2) ед. pH, прибавляя по каплям концентрированную ортофосфорную кислоту при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке.

Готовый буферный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доводят до метки и тщательно перемешивают. Полученный раствор отфильтровывают и дегазируют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – не более 3 сут.

6.2 Приготовление градуировочных растворов органических кислот

Приготовление градуировочных растворов ряда органических кислот делят на три группы, в соответствии с диапазоном содержания определяемых кислот в соковой продукции, приведенных в таблице 3.

Таблица 3 – Группы градуировочных растворов органических кислот

Группы органических кислот	Наименование органической кислоты	Массовая концентрация (массовая доля) в градуировочных растворах, г/дм^3 (‰)
Группа А	Винная	0,10–15,00
	Хинная	0,10–10,00
	Яблочная	0,10–25,00
	Лимонная	0,10–50,00
Группа Б	Щавелевая	0,05–1,00
	Изолимонная	0,05–0,50
	Молочная	0,05–1,00
	Янтарная	0,05–1,00
Группа В	Шикимовая	0,05–10,00
	Фумаровая	0,005–0,50

6.2.1 Приготовление основных градуировочных растворов органических кислот группы А

6.2.1.1 Приготовление основного раствора № 1А

Взвешивают на лабораторных весах по (1,25 ± 0,001) г лимонной, яблочной, хинной и винной кислот в мерной колбе вместимостью 250 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Массовая концентрация лимонной, яблочной, хинной и винной кислот в полученном основном растворе 1А составляет 5,0 г/дм^3 каждой соответственно.

6.2.2 Приготовление основных градуировочных растворов органических кислот групп Б и В

6.2.2.1 Приготовление основных растворов № 1Б и № 1В

Взвешивают на лабораторных весах по (0,025 ± 0,001) г щавелевой, изолимонной, молочной и янтарной кислот по (0,25 ± 0,001) г и по (0,025 ± 0,001) г шикимовой и фумаровой кислот в мерной колбе вместимостью 250 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Массовая концентрация щавелевой, изолимонной, молочной и янтарной кислот в основном растворе № 1Б составляет по 1,0 г/дм^3 каждой, шикимовой и фумаровой кислот в основном растворе № 1В – по 0,1 г/дм^3 каждой соответственно.

Срок хранения основных градуировочных растворов № 1Б и № 1В при температуре от 2 °С до 6 °С – в течение одного месяца.

6.2.3 Приготовление рабочих градуировочных растворов органических кислот

Рабочие градуировочные растворы органических кислот готовят для одновременного построения четырех градуировочных зависимостей по четырем точкам от меньшей массовой концентрации (массовой доли) определяемой кислоты к большей из основных растворов по 6.2.1.1 и 6.2.2.1 в соответствии с таблицами 4–6.

Рабочие градуировочные растворы органических кислот готовят непосредственно перед проведением измерений.

Таблица 4 – Приготовление градуировочных растворов группы А

№ п/п	Обозначение градуировочного раствора	Наименование органической кислоты группы А	Способ приготовления	Массовая концентрация (массовая доля), г/дм^3 (‰)
1	№ 1А – основной	Хинная, винная, лимонная, яблочная	1,25 г органической кислоты растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	5,0
2	№ 2А	Хинная, винная, лимонная, яблочная	125 см^3 раствора № 1А помещают в мерную колбу вместимостью 250 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	2,5

Окончание таблицы 4

№ п/п	Обозначение градуировочного раствора	Наименование органической кислоты группы А	Способ приготовления	Массовая концентрация (массовая доля), г/дм^3 (‰)
3	№ 3А	Хинная, винная, лимонная, яблочная	40 см^3 раствора № 2А помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	1,0
4	№ 4А	Хинная, винная, лимонная, яблочная	20 см^3 раствора № 3А помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	0,2

Таблица 5 – Приготовление градуировочных растворов группы Б

№ п/п	Обозначение раствора	Наименование органической кислоты группы Б	Способ приготовления	Массовая концентрация (массовая доля), г/дм^3 (‰)
1	№ 1Б – основной	Щавелевая, молочная, изолимонная, янтарная	0,25 г кислоты растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	1,0
2	№ 2Б	Щавелевая, молочная, изолимонная, янтарная	125 см^3 раствора № 1Б помещают в мерную колбу вместимостью 250 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	0,5
3	№ 3Б	Щавелевая, молочная, изолимонная, янтарная	50 см^3 раствора № 2Б помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	0,25
4	№ 4Б	Щавелевая, молочная, олимонная, янтарная	20 см^3 раствора № 3Б помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	0,05

Таблица 6 – Приготовление градуировочных растворов группы В

№ п/п	Обозначение раствора	Наименование органической кислоты группы В	Способ приготовления	Массовая концентрация, (массовая доля), г/дм^3 (‰)
1	№ 1В – основной	Шикимовая, фумаровая,	0,025 г кислоты растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	0,1
2	№ 2В	Шикимовая, фумаровая,	125 см^3 раствора № 1Б помещают в мерную колбу вместимостью 250 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	0,05
3	№ 3В	Шикимовая, фумаровая,	20 см^3 раствора № 2Б помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают	0,01

Окончание таблицы 6

№ п/п	Обозначение раствора	Наименование органической кислоты группы В	Способ приготовления	Массовая концентрация, (массовая доля), г/дм^3 (‰)
4	№ 4В	Шикимовая, фумаровая,	20 см^3 раствора № 3Б помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки водой и тщатель-но перемешивают	0,002

6.3 Построение градуировочной характеристики

Построение градуировочной характеристики и обработку хроматограмм выполняют в соответствии с руководством пользователя программным обеспечением.

Для установления градуировочной характеристики в инжектор хроматографа вводят с помощью микрошприца по 10 мм^3 каждого градуировочного раствора в соответствии с таблицами 4–6.

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

Регистрируют площадь пиков соответствующих кислот. Площадь пиков органических кислот и их массовая концентрация или массовая доля[1] в градуировочных растворах находятся в соответствующей функциональной зависимости вида

$$C_{гр,i} = \frac{S_i}{k_{гр,i}} \text{ или } X_{гр,i} = \frac{S_i}{k_{гр,i}}, \quad (1)$$

где S_i – площадь пика соответствующей органической кислоты в *i*-ом градуировочном растворе, е. о. п·с

$k_{гр,i}$ – градуировочный коэффициент, е. о. п.с.(г/дм^3)$^{-1}$ или е. о. п.с.(г/кг)$^{-1}$.

Градуировочный коэффициент $k_{гр,i}$ для каждой органической кислоты рассчитывают по результатам измерений градуировочных растворов с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных или при его отсутствии в составе хроматографа по методу наименьших квадратов, полагая свободный член в уравнении регрессии равным нулю

$$k_{гр,i} = \frac{\sum(S_i \cdot C_{гр,i})}{\sum C^2_{гр,i}} \text{ или } k_{гр,i} = \frac{\sum(S_i \cdot X_{гр,i})}{\sum X^2_{гр,i}} \quad (2)$$

где S_i – площадь пика соответствующей органической кислоты в *i*-ом градуировочном растворе, е. о. п·с;

$C_{гр,i}$ – массовая концентрация соответствующей органической кислоты в *i*-ом градуировочном растворе, г/дм^3;

$X_{гр,i}$ – массовая доля соответствующей органической кислоты в *i*-ом градуировочном растворе, ‰.

Градуировочную характеристику, вычисленную методом наименьших квадратов, считают приемлемой, если значение квадрата коэффициента корреляции для каждой кислоты составляет не менее 0,990.

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

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работ по двум градуировочным растворам в соответствии с приложением А. В случае обнаружения отклонения результатов измерения массовой концентрации (массовой доли) кислот в градуировочных растворах более чем на 3,5 % градуировочную характеристики строят заново.

[1] Плотность градуировочного раствора и плотность воды в данных условиях приняты одинаковыми.

7 Проведение измерений

7.1 Условия проведения хроматографических измерений

Элюент – фосфатный буферный раствор по 6.1.
Режим элюирования – изократический.
Температура колонки, °С – (25 ± 5).
Длина волны спектрофотометрического детектора, нм – 210.
Скорость потока подачи элюента, $см^3$/мин – 0,8–1 (ориентировочное значение).
Объем пробы, $мм^3$[1] – 5–10.

Примечание – В зависимости от типа применяемого хроматографа и хроматографической колонки допускается изменение условий измерений, обеспечивающих необходимое разделение компонентов пробы.

7.2 Проведение измерений

Перед проведением измерений хроматографическую систему кондиционируют подвижной фазой до установления стабильной базовой линии.

Проводят два параллельных измерения проб, подготовленных по разделу 5, при соблюдении условий повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-1 (подраздел 3.14).

Регистрируют площадь пиков соответствующих органических кислот. В случае, если массовая концентрация (массовая доля) органической кислоты в пробе настолько максимальна, что площадь соответствующего пика выходит за верхнюю границу диапазона градуировки хроматографа, то подготавливают новую пробу с другим разбавлением и измерение повторяют.

В случае взаимного влияния отдельных кислот друг на друга для более эффективного разделения допускается последовательное соединение двух колонок (см. 4.3) для хроматографического разделения всего перечня органических кислот (см. 4.21). В этом случае требуется построение дополнительной градуировочной зависимости для данной системы последовательно соединенных колонок.

Примеры хроматограмм модельной смеси органических кислот для различных типов колонок приведены в приложении Б.

Время выхода органических кислот характеризуется величиной коэффициента емкости K', который не зависит от скорости подачи элюента.

Коэффициент емкости вычисляют по формуле

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \quad (3)$$

где t_R – время удерживания органической кислоты, мин;

t_0 – время удерживания несорбирующегося вещества, мин, вычисляют по ГОСТ 17567.

Типичные значения коэффициентов емкости трех групп органических кислот в соковой продукции представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Типичные значения коэффициентов емкости органических кислот

Наименование группы органических кислот	Наименование кислоты	Коэффициент емкости K'
Группа А	Винная	0,20
	Хинная	0,30
	Яблочная	0,71
	Лимонная	2,68
Группа Б	Щавелевая	0,14
	Изолимонная	0,81
	Молочная	1,20
	Янтарная	2,92
Группа В	Шикимовая	0,96
	Фумаровая	3,04
Примечание – Оценку эффективности хроматографических колонок проводят в соответствии с приложением В.		

[1] Вводимые объемы градуировочного раствора и пробы должны быть одинаковыми.

8 Обработка и оформление результатов измерений

В соответствии с данными, полученными при измерениях градуировочных растворов органических кислот, оформляют таблицу пиков с использованием программного обеспечения хроматографа.

Обработку хроматограмм и определение массовой концентрации C, г/дм^3 или массовой доли X, ‰, органических кислот проводят методом абсолютной градуировки с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения пробы по формулам:

$$C = \frac{S_i \cdot V_2}{k_{гр,i} \cdot V_1} \quad (4)$$

или

$$X = \frac{S_i \cdot m_2}{k_{гр,i} \cdot m_1} \ ; \quad (5)$$

где S_i – площадь пика органической кислоты в пробе, е. о. п. с;

V_2 – вместимость мерной колбы, взятой для разбавления, см^3;

$K_{гр,i}$ – градуировочный коэффициент, е. о. п·с·(г/дм^3)$^{-1}$ или е. о. п·с·(г/кг)$^{-1}$;

V_1 – объем аликвоты пробы, см^3;

m_2 – масса пробы концентрированного продукта после разбавления, г;

m_1 – масса концентрированного продукта, г.

или по формулам с использованием градуировочного раствора с массовой концентрацией (массовой долей) определяемой органической кислоты, наиболее близкой к ожидаемой

$$C = \frac{C_{гр,j} \cdot S_i \cdot V_2}{S_{гр,i} \cdot V_1} \quad (6)$$

или

$$X = \frac{X_{гр,j} \cdot S_i \cdot m_2}{S_{гр,j} \cdot m_1} \ , \quad (7)$$

где $C_{гр,i}$ – массовая концентрация органической кислоты в градуировочном растворе, г/дм^3;

$X_{гр,i}$ – массовая доля органической кислоты в градуировочном растворе, ‰;

S_i – площадь пика органической кислоты в пробе, е. о. п·с;

$S_{гр,i}$ – площадь пика органической кислоты в градуировочном растворе, е. о. п.·с;

m_2 – масса пробы концентрированного продукта после разбавления, г;

m_1 – масса концентрированного продукта, г.

Все результаты обработки (с помощью программно-аппаратного комплекса или расчетные) должны сходиться.

Вычисления массовой концентрации или массовой доли проводят до третьего десятичного знака.

Расхождение результатов между двумя параллельными измерениями (в процентах от среднего значения), выполненными в условиях повторяемости, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) $r_{отн}$ (см. таблицы 9–11) при доверительной вероятности P = 0,95.

При соблюдении этого условия за окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до второго десятичного знака, при определении фумаровой кислоты в диапазоне измерений от 0,001 до 0,010 г/дм^3 за окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, округленное до третьего десятичного знака.

Диапазоны измерения массовой концентрации (массовой доли) органических кислот в соковой продукции приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Диапазоны измерений массовой концентрации (массовой доли) органических кислот в соковой продукции

Наименование органической кислоты	Массовая концентрация (массовая доля), г/дм^3 (‰)	Наименование органической кислоты	Массовая концентрация (массовая доля), г/дм^3 (‰)
Щавелевая	0,05–1,00	Лимонная	0,10–50,00
Винная	0,10–15,00	Шикимовая	0,05–10,00
Хинная	0,10–10,00	Молочная	0,05–1,00

Окончание таблицы 8

Наименование органической кислоты	Массовая концентрация (массовая доля), г/дм^3 (‰)	Наименование органической кислоты	Массовая концентрация (массовая доля), г/дм^3 (‰)
Яблочная	0,10–25,00	Янтарная	0,05–1,00
Изолимонная*	0,05–0,50	Фумаровая	0,005–0,50

* При массовой концентрации (массовой доли) изолимонной кислоты в соковой продукции менее 0,2 г/дм^3 (‰) для более точного определения соотношения содержания лимонной и изолимонной кислоты могут применяться другие (в том числе ферментативные) методы.

9 Метрологические характеристики

Границы относительной погрешности определения массовой концентрации (массовой доли) органических кислот при соблюдении условий, регламентированных настоящим методом, при доверительной вероятности $P = 0,95$, не должны превышать значений, приведенных в таблицах 9–11.

Расхождение между двумя результатами параллельных определений (в процентах от среднего значения), полученными в условиях воспроизводимости, не должно превышать предела воспроизводимости $R_{отн}$, приведенного в таблицах 9–11 при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Таблица 9 – Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации (массовой доли) яблочной, лимонной, винной, хинной кислот

Наименование показателя	Значение показателя при диапазонах измерений массовой концентрации (массовой доли), г/дм^3 (‰)		
	От 0,10 до 0,50 включ.	Свыше 0,50 до 5,00 включ.	Свыше 5,00 до 50,00 включ.
Предел повторяе-мости (сходимости) $r_{отн}$, %	12	10	7
Предел воспроиз-водимости $R_{отн}$, %	18	17	13
Границы относи-тельной погрешности $\pm\delta$, %	13	12	10

Таблица 10 – Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации (массовой доли) щавелевой, изолимонной, молочной, янтарной кислот

Наименование показателя	Значение показателя при диапазонах измерений массовой концентрации (массовой доли) г/дм^3 (‰)		
	От 0,05 до 0,10 включ.	Свыше 0,10 до 0,50 включ.	Свыше 0,50 до 1,00 включ.
Предел повто-ряемости (сходи-мости) $r_{отн}$, %	15	12	10
Предел воспроиз-водимости $R_{отн}$, %	26	18	17
Границы относи-тельной погрешности $\pm\delta$, %	19	13	12

Таблица 11 – Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации или массовой доли шикимовой, фумаровой кислот

Наименование показателя	Значение показателя при диапазонах измерений массовой концентрации (массовой доли), г/дм^3 (‰)		
	От 0,005 до 0,010 включ.	Свыше 0,01 до 0,50 включ.	Свыше 0,50 до 10,00 включ.
Предел повторяе-мости (сходимости) $r_{отн}$, %	20	13	10
Предел воспроиз-водимости $R_{отн}$, %	33	21	17
Границы относи-тельной погрешности $\pm\delta$, %	25	15	12

Окончательный результат определения массовой концентрации (массовой доли) органической кислоты представляют в виде

$$\overline{C} \pm 0,01 \cdot \delta \cdot \overline{C} \text{ или } \overline{X} \pm 0,01 \cdot \delta \cdot \overline{X},\ P = 0,95 \qquad (8)$$

где $\overline{C}$, $\overline{X}$ – среднеарифметические значения результатов двух параллельных определений массовой концентрации или массовой доли органической кислоты, выполненных в условиях повторяемости, г/дм^3 или ‰;

$\pm\delta$ – границы относительной погрешности определения, %, в соответствии с таблицами 9–11.

Числовое значение результата определения должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение границы абсолютной погрешности. Значение границ абсолютной погрешности выражают числом, содержащим не более трех значащих цифр.

Результаты определений регистрируют в протоколе испытаний согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025 с указанием настоящего стандарта.

10 Контроль качества результатов измерений при реализации метода в лаборатории

10.1 Контроль повторяемости результатов измерений

Контроль повторяемости результатов измерений массовой концентрации или массовой доли органических кислот проводят при получении каждого результата путем сравнения расхождения между результатами двух параллельных определений с пределом повторяемости (сходимости), приведенным в таблицах 8–10.

Повторяемость результатов признают удовлетворительной при условии

$$2 \cdot \frac{|C_1 - C_2|}{C_1 + C_2} \le 0{,}01 \cdot r_{отн} \quad \text{или} \quad 2 \cdot \frac{|X_1 - X_2|}{X_1 + X_2} \le 0{,}01 \cdot r_{отн}, \qquad (9)$$

где C_1, C_2 – результаты параллельных определений массовой концентрации органических кислот, г/дм^3;

X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли органических кислот, ‰;

$r_{отн}$ – значение предела повторяемости (см. таблицы 9–11), %.

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

10.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

10.2.1 Проверку приемлемости результатов параллельных определений в условиях воспроизводимости проводят:

- при возникновении спорных ситуаций между двумя лабораториями;
- проверке совместимости результатов измерений, полученных при сличительных испытаниях.

10.2.2 Для проверки приемлемости результатов параллельных определений в условиях воспроизводимости каждая лаборатория использует контрольные пробы, оставленные на хранение.

Приемлемость результатов параллельных определений, полученных в двух лабораториях, оценивают сравнением разности этих результатов с критической разностью $CD_{0,95}$ по формуле

$$\frac{2 \cdot |\overline{C}_1 - \overline{C}_2| \cdot 100}{\overline{C}_1 + \overline{C}_2} \le CD_{0,95} \text{ или } \frac{2 \cdot |\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \cdot 100}{\overline{X}_1 + \overline{X}_2} \le CD_{0,95}, \qquad (10)$$

где $\overline{C}_1, \overline{C}_2$ – среднеарифметические значения массовой концентрации органических кислот, полученные в первой и второй лабораториях, г/дм^3;

$\overline{X}_1, \overline{X}_2$ – среднеарифметические значения массовой доли органических кислот, полученные в первой и второй лабораториях, ‰;

$CD_{0,95}$ – значение критической разности, вычисляемое по формулам:

$$CD_{0,95} = 2{,}77 \cdot 0{,}01 \cdot \overline{C} \cdot \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{}{}\right)} \qquad (11)$$

$$CD_{0,95} = 2{,}77 \cdot 0{,}01 \cdot \overline{X} \cdot \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{}{}\right)} \qquad (12)$$

где 2,77 – коэффициент критического диапазона для двух параллельных определений, полученных в условиях воспроизводимости по ГОСТ ИСО 5725-6;

0,01 – множитель для перехода от процентов к абсолютным значениям;

$\overline{C}$ – среднеарифметическое значение результатов определений, полученных в первой и второй лабораториях, г/дм^3;

$\overline{X}$ – среднеарифметическое значение результатов определений, полученных в первой и второй лабораториях, ‰;

σ_R – показатель воспроизводимости, %, (см. таблицы 9–11);

σ_r – показатель повторяемости, %, (см. таблицы 9–11);

n – число параллельных определений.

10.2.3 Если критическая разность не превышена, то приемлемы оба результата определений, проводимых двумя лабораториями, и в качестве окончательного результата используют их среднеарифметическое значение. Если критическая разность превышена, то выполняют процедуры в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

При разногласиях руководствуются ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

10.3 Оперативный контроль погрешности (точности) результатов измерений

Оперативный контроль погрешности (точности) результатов измерений осуществляют методом добавок.

Организацию и оценку результатов контроля осуществляют в соответствии с рекомендациями [1].

10.3.1 Для проведения оперативного контроля погрешности (точности) определение проводят в пробах, объем или масса которых должны соответствовать удвоенному их количеству, необходимому для проведения определения. Пробу делят на две равные части. В одну из них добавляют одну или несколько органических кислот в таком количестве, чтобы величина добавки в 0,5–1,5 раза отличалась от исходного содержания компонента в пробе, но не превышала верхней границы диапазона определения массовой концентрации (массовой доли) компонента с учетом границ погрешности определения (см. таблицы 9–11). В обеих частях пробы проводят определение в соответствии с требованиями настоящего стандарта.

10.3.2 Результаты контрольных определений признают удовлетворительными, если погрешность определения массовой концентрации (массовой доли) органической кислоты в добавке не превышает норматива оперативного контроля погрешности (точности), то есть выполняется условие

$$\left|\overline{C}_{доб} - \overline{C} - C_{доб}\right| \le K_{доб} \text{ или } \left|\overline{X}_{доб} - \overline{X} - X_{доб}\right| \le K_{доб}, \quad (13)$$

где $\overline{C}_{доб}$, $\overline{X}_{доб}$ – среднеарифметические значения параллельных определений массовой концентрации (массовой доли) органической кислоты в пробе с добавкой, г/дм^3 (‰);

$\overline{C}$, $\overline{X}$ – среднеарифметические значения параллельных определений массовой концентрации (массовой доли) органической кислоты в пробе без добавки, г/дм^3 (‰);

$C_{доб}$, $X_{доб}$ – величина добавки, г/дм^3 (‰);

$K_{доб}$ – норматив контроля погрешности, г/дм^3 (‰).

При проведении внутрилабораторного контроля (P = 0,90) значение $K_{доб}$ вычисляют по формулам:

$$K_{доб} = 0{,}84 \cdot 0{,}01 \cdot \delta \cdot \sqrt{C_{доб}^2 + \overline{C}^2} \quad (14)$$

или

$$K_{доб} = 0{,}84 \cdot 0{,}01 \cdot \delta \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + \overline{X}^2}, \quad (15)$$

где 0,84 – коэффициент, учитывающий вид контроля;

$\pm\,\delta$ – границы относительной погрешности измерений массовой концентрации (массовой доли) органической кислоты (см. таблицы 9–11), %.

При проведении внешнего контроля (P = 0,95) значение $K_{доб}$ вычисляют по формулам:

$$K_{доб} = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \sqrt{C_{доб}^2 + \overline{C}^2} \quad (16)$$

или

$$K_{доб} = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + \overline{X}^2}. \quad (17)$$

При превышении норматива оперативного контроля погрешности проводят повторные контрольные определения. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Периодичность контроля погрешности (точности) устанавливает сама лаборатория с учетом фактического состояния работ. При замене оборудования, колонок, реактивов или при построении новой градуировочной зависимости проведение оперативного контроля погрешности обязательно.

10.4 Контроль стабильности результатов измерений при реализации метода в лаборатории

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории при реализации метода осуществляют по ГОСТ ИСО 5725-6, используя метод контроля стабильности стандартного отклонения промежуточной прецизионности по ГОСТ ИСО 5725-6 с применением контрольных карт Шухарта.

При неудовлетворительных результатах контроля (превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения) выясняют и устраняют причины этих отклонений.

Периодичность контроля и процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируют в руководстве по качеству лаборатории в соответствии с ГОСТ ИСО/МЭК 17025 (пункт 4.2).

11 Требования, обеспечивающие безопасность

11.1 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 определению и выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила пожаровзрывобезопасности по ГОСТ 12.1.018, по электробезопасности – по ГОСТ 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

11.2 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 инструкцию по эксплуатации метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Первое применение 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
(обязательное)

Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом измерений с применением двух градуировочных растворов (см. таблицы 4–6 настоящего стандарта) в соответствии с условиями, приведенными в 7.1.

Градуировочная зависимость признается стабильной, если выполняется условие

$$\frac{\left|C_{изм} - C_{гр,i}\right|}{C_{гр,i}} \cdot 100 \le 0{,}5 \cdot \delta, \qquad (А.1)$$

где $C_{изм}$, $C_{гр,i}$ – измеренное по градуировочной характеристике и установленное значения массовой концентрации органической кислоты в i-ом градуировочном растворе соответственно, г/дм^3;

$\pm\ \delta$ – границы относительной погрешности измерений (показатель точности), %, (см. таблицы 9–11 настоящего стандарта).

Если условие (А.1) не выполняется, то процедуру контроля повторяют. В случае повторного невыполнения указанного условия градуировку хроматографа проводят заново.

Приложение Б
(справочное)

Примеры хроматограмм органических кислот

Б.1 Примеры хроматограмм органических кислот приведены на рисунках Б.1–Б.3.

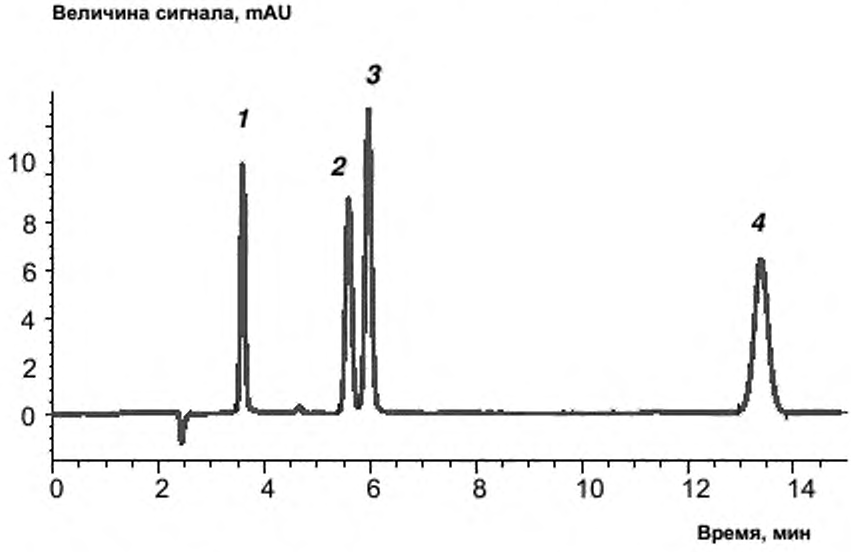

Рисунок Б.1 – Пример хроматограммы модельной смеси органических кислот

1 – хинная кислота, *2* – изолимонная кислота, *3* – молочная кислота, *4* – лимонная кислота
Условия хроматографирования:
элюент – 0,1 моль/дм^3 фосфатный буфер, pH 2,4;
скорость элюирования, см^3/мин – 1,0;
колонка Phenomenex C18 (LUNA).

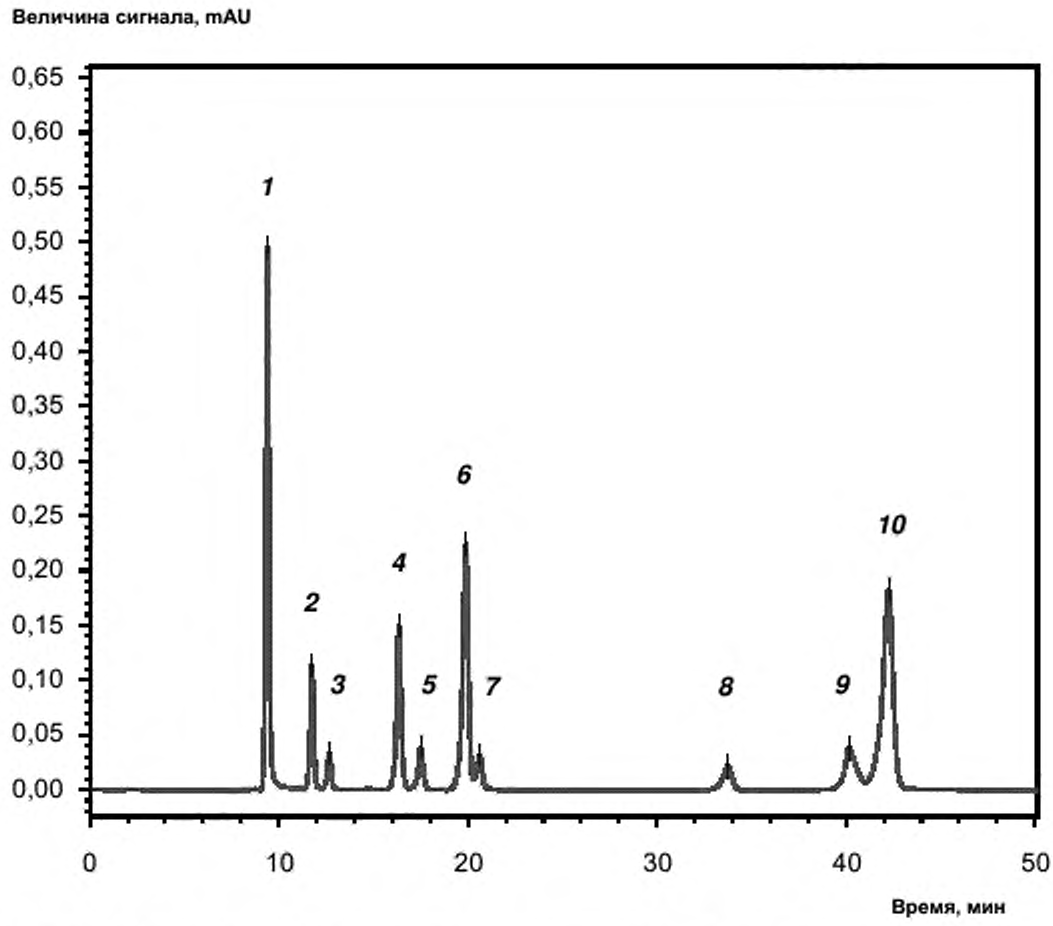

Рисунок Б.2 – Пример хроматограммы модельной смеси органических кислот при последовательном соединении колонок

1 – щавелевая, *2* – винная, *3* – лимонная, *4* – яблочная, *5* – изолимонная, *6* – шикимовая, *7* – молочная, *8* – хинная, *9* – янтарная, *10* – фумаровая

Условия хроматографирования:
элюент – 0,1 моль/дм^3 фосфатный буфер, pH 2,2;
скорость элюирования, см^3/мин – 1,0;
колонки Wakosil II 5C18RS и Restek Allure Organic Acids, соединенные последовательно.

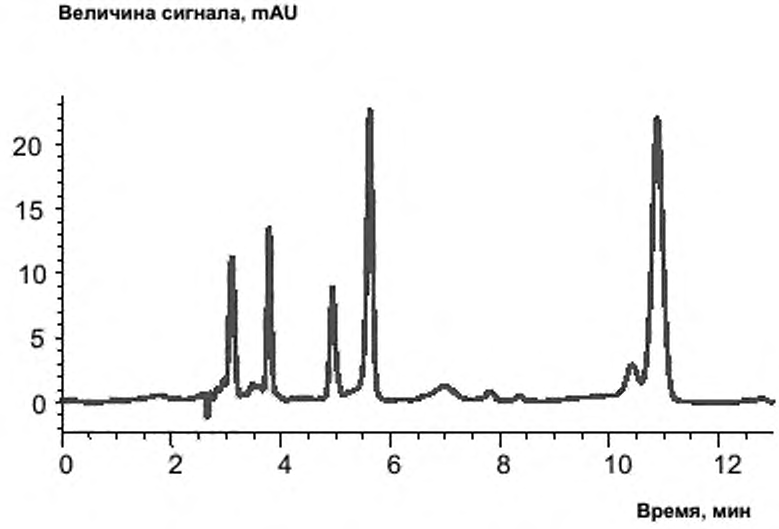

Рисунок Б.3 – Хроматограмма сока черники
Массовая концентрация кислот на хроматограмме:

1 – хинная – 1,2 г/дм^3, *2* – яблочная – 0,8 г/дм^3, *3* – шикимовая – 1,8 г/дм^3, *4* – лимонная – 2,1 г/дм^3.

Условия хроматографирования:
элюент – 0,1 моль/дм^3 фосфатный буфер, pH 2,4;
скорость элюирования, см^3/мин – 1,0;
колонка Phenomenex C18 (LUNA).

Приложение В
(рекомендуемое)

Определение эффективности хроматографической колонки

В.1 Разрешение пиков проверяют для каждой новой колонки при ее установке по пробной хроматограмме одного из градуировочных растворов (см. таблицы 4–6).

Степень разделения компонентов вычисляют по ГОСТ 17567.

Разрешение двух соседних пиков для каждой из указанных кислот должно быть не менее 1,2.

В.2 Для получения необходимой степени разделения эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 700. Эффективность хроматографической колонки определяют в соответствии с ГОСТ 17567.

В дальнейшем подготовку и кондиционирование колонки проводят в случае снижения разделительной способности колонки.

В.3 Критерием готовности аналитической системы является отсутствие на контрольной хроматограмме пиков посторонних веществ. В случае наличия пиков посторонних веществ проводят кондиционирование колонки или заменяют колонку на новую.

Библиография

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

УДК 664.863.001.4:006.354

МКС 67.080
67.050

Ключевые слова: соковая продукция, органические кислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография, градуировочные растворы, массовая концентрация, массовая доля, подготовка к проведению измерения, проведение измерения, предел повторяемости, граница относительной погрешности, требования, обеспечивающие безопасность

Подписано в печать 01.12.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 2,79. Тираж 41 экз. Зак. 4951

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru