МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34230— 2017

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Некоммерческой организацией «Российский союз производителей соков» (РСПС) при участии Акционерного общества «Мултон» (АО «Мултон») и Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 ноября 2017 г. № 52—2017)

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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
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 12 декабря 2017 г. № 1903-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34230—2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2019 г.

5 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 (www.gost.ru)

© Стандартинформ, 2018

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, реактивы и материалы . . . 3
5 Отбор проб . . . 4
6 Подготовка к проведению измерений . . . 4
7 Проведение измерений . . . 8
8 Обработка и оформление результатов измерений . . . 9
9 Контроль качества результатов измерений . . . 11
10 Требования безопасности . . . 11
Приложение А (справочное) Мониторинг хроматографических характеристик колонки . . . 12
Приложение Б (справочное) Примеры хроматограмм аминокислот . . . 15

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products. Determination of free amino acids by high performance liquid chromatography method

Дата введения — 2019—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на соковую продукцию из фруктов и овощей и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной обращенно-фазовой хроматографии для определения массовой концентрации (массовой доли) свободных аминокислот:

- L-Аспарагиновой кислоты;
- L-Глутамина;
- L-Глутаминовой кислоты;
- L-Серина;
- L-Гистидина;
- L-Треонина;
- L-Аспарагина;
- L-Аланина;
- L-Аргинина;
- L-Тирозина;
- γ-Аминомасляной кислоты;
- L-Метионина;
- L-Валина;
- L-Изолейцина;
- L-бета-Фенилаланина;
- L-Лейцина;
- L-Лизина;
- Глицина;
- L-Пролина;
- L(+)-Орнитина.

Диапазон измерений массовой концентрации (массовой доли) свободных аминокислот составляет от 5,0 до 20,0 мг/дм^3 (млн$^{-1}$) без учета разбавления и концентрирования проб.

Примечание — 1 млн$^{-1}$ соответствует 1 мг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

Издание официальное

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

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

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

ГОСТ 199—78 Реактивы. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия

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

ГОСТ ISO 3696—2013** Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

ГОСТ 4199—76 Реактивы. Натрий тетраборнокислый 10-водный. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 5962—2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ISO 7886-1—2011 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

ГОСТ 21400—75 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 22967—90 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26313—2014 Продукты переработки фруктов и овощей. Правила приемки и методы отбора проб

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

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 ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя 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 переводе свободных аминокислот во флуоресцирующие соединения предколоночной дериватизацией и количественном анализе полученных производных с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенно-фазовых хроматографических колонках, заполненных сорбентом С18 с размером частиц менее 5 мкм с использованием флуориметрического детектора.

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

*** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

4.1 Хроматограф жидкостный с флуориметрическим детектором (диапазон длин волн возбуждения 200—890 нм, эмиссии 210—900 нм), относительным среднеквадратическим отклонением выходного сигнала, не более:

- по площади пика — 1 %;
- по времени удерживания — 0,3 %;
- по площади пика за 8 ч непрерывной работы — 2 %;
- по времени удерживания за 8 ч непрерывной работы — 2 %.

4.2 Колонка хроматографическая С18* длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом С18 с энд-кэпингом с размером частиц менее 5 мкм.

4.3 Колонка защитная (предколонка), размеры защитной колонки — 10 × 4,6 мм, заполненная тем же обращенно-фазовым сорбентом.

4.4 Весы неавтоматического действия специального класса точности по ГОСТ OIML R 76-1, пределом допускаемой абсолютной погрешности измерения массы ± 0,001 г.

4.5 Иономер (pH-метр) с пределом абсолютной погрешности измерения ± 0,1 ед. pH.

4.6 Пипетки градуированные лабораторные стеклянные 1-1-2-1, 1-1-2-2, 1-1-2-5 и 1-1-2-10 по ГОСТ 29227.

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

- цилиндр 1-1000-2;
- колбы мерные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1000-2.

4.8 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

- воронки В-56-80 ХС, В-75-80 ХС, В-75-110 ХС, В-100-150 ХС;
- стаканы любого типа исполнения 1 вместимостью 50, 100, 1000 см^3;
- пробирки вместимостью 10 и 20 см^3.

4.9 Пробирки полимерные центрифужные конические с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 см^3.

4.10 Палочки стеклянные длиной 220 мм и диаметром 5 мм, выполненные из химически стойкого стекла любого класса по ГОСТ 21400.

4.11 Фильтры мембранные с насадкой на шприц с размером пор 0,20 и 0,45 мкм.

4.12 Фильтры мембранные диаметром 47 мм с размером диаметра пор мембраны 0,20 и 0,45 мкм.

4.13 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.14 Установка для фильтрации и дегазации жидкостей.

4.15 Виалы вместимостью 2 см^3 для автоматического ввода проб и вставки в виалы для микроколичеств проб.

4.16 Микрошприц вместимостью 250 мм^3.

4.17 Шприц медицинский вместимостью 5 см^3 многократного применения по ГОСТ 22967 или однократного применения по ГОСТ ISO 7886-1.

4.18 Микродозаторы пипеточные одноканальные переменного объема от 20 до 200 мм^3 с соответствующими наконечниками (без воздушного промежутка) по ГОСТ 28311.

4.19 Склянки из темного стекла с завинчивающейся крышкой.

4.20 Центрифуга, обеспечивающая фактор разделения (*g*-фактор) не менее 800.

4.21 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода по ГОСТ ISO 3696 1-й степени чистоты.

4.22 Ацетонитрил, ос. ч., имеющий оптическую плотность не более 0,02 при 200 нм.

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

4.24 Тетрагидрофуран (далее — ТГФ) для хроматографии, с массовой долей основного вещества не менее 99,9 % и показателем преломления n_D в пределах от 1,3439 до 1,3440.

4.25 Спирт этиловый по ГОСТ 5962.

4.26 о-Фталевый альдегид с массовой долей основного вещества не менее 97 %.

4.27 3-Меркаптопропионовая кислота с массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.28 9-Флуоренилметоксикарбонилхлорид с массовой долей основного вещества не менее 97 %.

---

* Примером является хроматографическая колонка Zorbax SB C18 компании Agilent. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой указанного продукта.

4.29 Натрий тетраборнокислый 10-водный по ГОСТ 4199, х. ч.
4.30 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.
4.31 Натрий уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 199, ч. д. а.
4.32 Аминокислоты:
- L-Аспарагиновая кислота, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-Глутамин, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %;
- L-Глутаминовая кислота, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %;
- L-Серин, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %;
- L-Гистидин, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %;
- L-Треонин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-Аспарагин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-Аланин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-Аргинин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-Тирозин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- γ-Аминомасляная кислота, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %;
- L-Метионин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-Валин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-изо-Лейцин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-бета-Фенилаланин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-Лейцин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- L-Лизин, массовая доля основного вещества не менее 98,0 %;
- Глицин, массовая доля основного вещества не менее 98,5 %;
- L-Пролин, массовая доля основного вещества не менее 99,0 %;
- L-Орнитин моногидрохлорид, массовая доля основного вещества ≥ 99,0 %.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками не ниже вышеуказанных, вспомогательного оборудования, материалов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных и химических реактивов аналогичной или более высокой квалификации.

5 Отбор проб

Отбор проб соковой продукции проводят по ГОСТ 26313.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка хроматографа к работе

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

6.2 Общие положения

Для дериватизации аминокислот используют смесь реагентов: о-фталевого альдегида (далее — OPA) в присутствии нуклеофильного реагента (3-меркаптопропионовой кислоты) и 9-флуоренилметоксикарбонилхлорида (далее — FMOC).

Разделение аминокислот происходит при температуре 40 °С в градиентном режиме с использованием следующих подвижных фаз:
- ацетатный буфер с pH 7,2 ед. pH с добавкой тетрагидрофурана;
- смесь: ацетатный буфер/ацетонитрил/этанол.

Для продления срока службы и более эффективной работы колонки используют систему защиты (in-line фильтры на выходе из насоса и предколонку), периодическую промывку (не реже одного-двух раз в неделю) колонки с ацетонитрилом (в зависимости от числа проведенных анализов и концентрации органических веществ, прошедших через колонку) в течение 1—3 ч со скоростью 1,0 $см^3$/мин с предварительной промывкой всей системы водой. После проведения анализа и промывки колонки во избежание образования кристаллов соли вся система также промывается водой.

Операции заполнения системы растворителями и промывка отдельных частей и системы в целом выполняют в соответствии с соответствующими руководствами по эксплуатации оборудования.

Детектирование разделенных производных аминокислот осуществляют с помощью флуориметрического детектора:

- при длине волны возбуждения 266 нм и длине волны испускания 305 нм — для производных о-фталевого альдегида;
- длине волны возбуждения 340 нм и длине волны ислускания 420 нм — для производных пролина и орнитина с FMOC.

Идентификацию разделенных производных аминокислот проводят путем сравнения времен удерживания и коэффициентов удерживания со стандартной смесью аминокислот (см. приложение А).

6.3 Приготовление вспомогательных растворов

6.3.1 Приготовление раствора уксусной кислоты с массовой долей 2 %

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 приливают ориентировочно 20 см^3 воды, затем приливают 0,95 см^3 ледяной уксусной кислоты и доводят водой до метки.

Раствор используют свежеприготовленным.

6.3.2 Приготовление подвижной фазы А

(4,080 ± 0,001) г уксуснокислого 3-водного натрия взвешивают в стакане вместимостью 100 см^3, растворяют в приблизительно 80 см^3 воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доводят водой до метки и перемешивают. Раствор переносят в мерный стакан вместимостью 1000 см^3 и доводят pH до значения 7,2 ед. pH раствором уксусной кислоты, приготовленным по 6.3.1, регистрируя показания pH-метром. К полученному раствору добавляют 2 см^3 тетрагидрофурана. Полученный раствор дегазируют на установке для фильтрации и дегазации жидкостей (см. 4.15) под вакуумом в течение 15 мин с одновременной фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок хранения раствора — не более трех дней при температуре 4 °С.

6.3.3 Приготовление подвижной фазы В

В цилиндр вместимостью 1000 см^3 приливают 200 см^3 ацетатного буфера (подвижной фазы А), приготовленного по 6.3.2, 640 см^3 ацетонитрила и 160 см^3 этилового спирта. Полученную смесь перемешивают и дегазируют на установке для фильтрации и дегазации жидкостей (см. 4.15) под вакуумом в течение 15 мин с одновременной фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок хранения смеси — не более трех дней при комнатной температуре.

6.3.4 Приготовление смеси дериватизирующих реагентов о-фталевого альдегида (OPA) и 3-меркаптопропионовой кислоты

(0,025 ± 0,001) г о-фталевого альдегида растворяют в 2 см^3 этанола и добавляют 20 мм^3 3-меркаптопропионовой кислоты.

Срок хранения смеси — не более 1 мес при температуре от 2 до 8 °С в склянке из темного стекла.

6.3.5 Приготовление раствора дериватизирующего реагента 9-метилхлороформиатфлуорена (FMOC)

(0,05 ± 0,001) г 9-флуоренилметоксикарбонилхлорида растворяют в 10 см^3 ацетонитрила.

Срок хранения раствора — не более 1 мес при температуре от 2 до 8 °С в склянке из темного стекла.

6.3.6 Приготовление раствора гидроксида натрия молярной концентрации 5 моль/дм^3

20,0 г гидроксида натрия растворяют в 50 см^3 воды, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят водой до метки.

Срок хранения раствора — не более 1 мес в сосуде из полимерного материала.

6.3.7 Приготовление боратного буферного раствора молярной концентрации 0,05 моль/дм^3

4,77 г тетраборнокислого десятиводного натрия растворяют в 150 см^3 воды, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 250 см^3 и доводят водой до метки. Приготовленный раствор переносят в стакан вместимостью 1000 см^3 и доводят до 10,4 ед. pH раствором гидроксида натрия, приготовленного по 6.3.6, регистрируя показания pH-метром.

Срок хранения раствора — не более 1 мес.

6.4 Приготовление градуировочных растворов

6.4.1 Приготовление исходных градуировочных растворов аминокислот

Основной (раствор № 6), промежуточный (раствор № 5) и градуировочные растворы аминокислот (растворы № 1—4) готовят в соответствии с таблицей 2.

Примечание — При использовании в качестве солей аминокислот (например, лизина) для приготовления основного раствора необходимо пересчитывать массу навески на свободную аминокислоту.

Таблица 1

№ раствора	Компонент	Вместимость мерной колбы, $см^3$	Способ приготовления	Массовая концентрация, $мг/дм^3$
6	L-Аспарагиновая кислота	100	(0,100 ± 0,001) г каждой аминокислоты взвешивают в одном стакане вместимостью 50 $см^3$. Содержимое стакана растворяют приблизительно в 30 $см^3$ воды, количественно переносят в мерную колбу и доводят до метки водой	1000
	L-Глутамин			
	L-Глутаминовая кислота			
	L-Серин			
	L-Гистидин			
	L-Треонин			
	L-Аспарагин			
	L-Аланин			
	L-Аргинин			
	L-Тирозин			
	γ-Аминомасляная кислота			
	L-Метионин			
	L-Валин			
	L-*изо*-Лейцин			
	L-бета-Фенилаланин			
	L-Лейцин			
	L-Лизин			
	Глицин			
	L-Пролин			
	L-Орнитин			
5	Все компоненты, что и в растворе № 6	100	В мерную колбу отбирают 10,0 $см^3$ основного раствора № 6, доводят до метки водой и перемешивают	100
4	Все компоненты, что и в растворе № 6	50	В мерную колбу отбирают 10,0 $см^3$ промежуточного раствора № 5, доводят до метки водой и перемешивают	20,0
3	Все компоненты, что и в растворе № 6	50	В мерную колбу отбирают 7,5 $см^3$ промежуточного раствора № 5, доводят до метки водой и перемешивают	15,0
2	Все компоненты, что и в растворе № 6	50	В мерную колбу отбирают 5,0 $см^3$ промежуточного раствора № 5, доводят до метки водой и перемешивают	10,0
1	Все компоненты, что и в растворе № 6	50	В мерную колбу отбирают 2,5 $см^3$ промежуточного раствора № 5, доводят до метки водой и перемешивают	5,0

Раствор № 4 используют в качестве одного из контрольных растворов при ежедневных анализах. Срок хранения основного раствора № 6 — не более 5 сут при температуре от 2 до 6 °С.

Промежуточный раствор № 5 и градуировочные растворы используют свежеприготовленными.

6.4.2 Приготовление дериватизированных градуировочных растворов аминокислот

Во вставку для микроколичеств пипеточным дозатором помещают 10 мм^3 градуировочного раствора (№ 1—4 по таблице 1), 5 мм^3 смеси OPA и 3-меркаптопропионовой кислоты (см. 6.3.4), 5 мм^3 раствора FMOC (см. 6.3.5) и 50 мм^3 боратного буферного раствора (см. 6.3.7). Смесь перемешивают и сразу же проводят хроматографический анализ аминокислот. Операцию повторяют для каждого градуировочного раствора (№ 1—4 по таблице 1).

К массовой концентрации аминокислот в полученном дериватизированном градуировочном растворе дополняют значение, равное массовой концентрации аминокислот в соответствующем градуировочном растворе, приведенной в таблице 1.

6.5 Условия проведения измерений

При подготовке к проведению измерений и проведении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность не более 80 %;
- напряжение в питающей сети (220 ± 22) В;
- частота тока в питающей сети (50 ± 1) Гц.

6.6 Условия хроматографического анализа

При проведении хроматографического анализа создают и поддерживают следующие условия:

- температура колонки — 40 °С;
- рабочие длины волн флуориметрического детектора:
  266 нм (возбуждение)/305 нм (регистрация) — для производных о-фталевого альдегида,
  340 нм (возбуждение)/420 нм (регистрация) — для производных пролина и орнитина с FMOC;
- объем вводимой пробы — 10 мм^3;
- режим элюирования — градиентный, скорость потока 0,75 см^3/мин (ориентировочное значение).

Параметры градиентного режима приведены в таблице 2.

Таблица 2

Время, мин	Объемная доля элюента А (см. 6.3.2), %	Объемная доля элюента В (см. 6.3.3), %
0	0	100
7	25	75
9	25	75
10	36	64
12	43	57
14	51	49
15	60	40
17	60	40
18	100	0
25	0	100

6.7 Градуировка хроматографа

Градуировку хроматографа проводят в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования и руководством пользователя программным обеспечением.

Дозируют в хроматограф дериватизированные градуировочные растворы (см. 6.4.2) после дериватизации и регистрируют площадь пиков производных соответствующих аминокислот. Площадь пиков производных аминокислот S, е. о. п.·с* и их массовая концентрация в градуировочных растворах c, мг/дм^3, находятся в линейной зависимости

$$c = k \cdot S, \qquad (1)$$

где k — градуировочный коэффициент (угол наклона), мг·дм$^{-3}$·(е. о. п.·с)$^{-1}$.

* е. о. п. — единицы оптической плотности.

Коэффициенты k вычисляют по результатам анализа градуировочных растворов с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных или при его отсутствии в составе хроматографа по методу наименьших квадратов

$$k = \frac{\sum_{i=1}^{m} c_i S_i}{\sum_{i=1}^{m} S_i^2}, \quad (2)$$

где c_i — массовая концентрация аминокислоты в i-м градуировочном растворе, мг/дм^3;

S_i — площадь пика соответствующей аминокислоты при анализе i-го градуировочного раствора, е. о. п. · с;

Градуировочную характеристику устанавливают при смене оборудования, колонок, условий хроматографического анализа или при выявлении несоответствий по результатам оперативного контроля или внутреннего аудита.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят, используя в качестве контрольных заново приготовленные по 6.4.2 дериватизированные градуировочные растворы из растворов № 3 и № 4 (см. таблицу 2) перед выполнением измерений.

Результаты контроля стабильности градуировочной характеристики признаются удовлетворительными при выполнении для каждого контрольного раствора следующего условия

$$|X_{изм} - C_{ст}| \le 0{,}01 \cdot G \cdot C_{ст}, \quad (3)$$

где $X_{изм}$ — результат измерения массовой концентрации аминокислоты в контрольных растворах, мг/дм^3;

$C_{ст}$ — фактическое значение массовой концентрации аминокислоты в контрольных растворах, мг/дм^3;

G — норматив контроля стабильности градуировочной характеристики, %.

Во всем диапазоне градуировочной характеристики G принимают равным $0{,}7 \cdot \delta$, где δ — границы относительной погрешности измерений массовой концентрации аминокислот (см. таблицу 3), %.

Если условие (3) не выполняется хотя бы для одного контрольного раствора, то градуировочную характеристику устанавливают заново во всем диапазоне измерений.

6.8 Мониторинг характеристик хроматографических колонок проводят в соответствии с приложением А.

7 Проведение измерений

7.1 Подготовка проб для измерений

7.1.1 При анализе каждой пробы проводят два параллельных измерения.

7.1.2 Осветленные соки, нектары и сокосодержащие напитки, не содержащие нерастворимые в воде вещества, разбавляют в 100 раз. Для этого 1 см^3 пробы сока (см. раздел 5) помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят водой до метки. Далее проводят дериватизацию аминокислот. Для этого во вставку для микроколичеств пипеточным дозатором помещают 10 мм^3 разбавленной пробы, 5 мм^3 смеси ОРА и 3-меркаптопропионовой кислоты (см. 6.3.4), 5 мм^3 раствора FMOC (см. 6.3.5) и 50 мм^3 боратного буферного раствора (см. 6.3.7). Смесь перемешивают и сразу же проводят хроматографический анализ по 7.2.3.

7.1.3 Соки, нектары и сокосодержащие напитки с мякотью или содержащие нерастворимые в воде вещества разбавляют объемным методом в 100 раз. Для этого 1 см^3 пробы сока (см. раздел 5) помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят водой до метки. Далее разбавленную пробу центрифугируют со скоростью не менее 9000 об/мин в течение 10 мин и проводят все операции, предусмотренные 7.1.2, начиная с отбора аликвоты пробы во вставку для микроколичеств.

7.1.4 Концентрированные соки и пюре различных фруктов, ягод и овощей разбавляют водой в 500 раз весовым методом. Для этого взвешивают ориентировочно 0,15 г концентрированного сока в стакане вместимостью 100 см^3 с погрешностью ± 0,001 г и доводят водой до 75 г, проводя взвешивание также с погрешностью ± 0,001 г. Далее проводят все операции, описанные в 7.1.2.

7.1.5 При подготовке пробы по 7.1.4 результат измерений выражают в единицах массовой доли (млн$^{-1}$), по 7.1.2, 7.1.3 — в единицах массовой концентрации (мг/дм^3).

7.2 Порядок проведения измерений

7.2.1 Включение и вывод хроматографической системы на рабочий режим, включая кондиционирование колонки, проводят в соответствии с руководствами по эксплуатации оборудования, колонки, и 6.2, 6.5.

7.2.2 Выключение хроматографической системы после выполнения анализов проводят в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования и руководством пользователя программно-аппаратным комплексом сбора и обработки данных.

7.2.3 Подготовленную по 7.1.2—7.1.4 пробу вводят в хроматограф и анализируют в тех же условиях, что и дериватизированные градуировочные растворы (см. 6.6). Идентифицируют пики аминокислот по временам удерживания, используя при этом программное обеспечение к хроматографу. Для всех идентифицированных аминокислот вычисляют массовую концентрацию $c_{изм}$, мг/дм^3, используя градуировочные характеристики по 6.7.

Примеры хроматограмм приведены в приложении Б.

8 Обработка и оформление результатов измерений

8.1 Если подготовку пробы проводили по 7.1.2 или 7.1.3, то массовую концентрацию аминокислот в пробе C, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$C = \frac{c_{изм} \cdot V_2}{V_1}, \quad (4)$$

где $c_{изм}$ — измеренное по 7.2.3 значение массовой концентрации соответствующей аминокислоты в подготовленной пробе, мг/дм^3;

V_2 — объем мерной колбы, взятой для разбавления пробы, см^3;

V_1 — объем пробы, отобранный для анализа, см^3.

За результат измерений массовой концентрации аминокислот в пробе принимают среднеарифметическое значение $\overline{C}$, мг/дм^3, результатов двух параллельных измерений C_1 и C_2, мг/дм^3, при выполнении условия

$$100 \cdot \frac{|C_1 - C_2|}{\overline{C}} \le r_{отн}, \quad (5)$$

где $r_{отн}$ — предел повторяемости (см. таблицу 3), %.

8.2 Если подготовку пробы проводили по 7.1.4, то массовую долю аминокислот в пробе X, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{X_{изм} \cdot m_{общ}}{m_X}, \quad (6)$$

где $X_{изм}$ — значение массовой доли аминокислоты в растворе, подготовленном по 7.1.4, принимаемое численно равным измеренному по 7.2.3 значению массовой концентрации, млн$^{-1}$;

$m_{общ}$ — масса пробы анализируемой пробы с добавкой воды (см. 7.1.3), г;

m_X — масса анализируемой пробы, г.

8.3 За результат измерений массовой доли аминокислот в пробе принимают среднеарифметическое значение $\overline{X}$, млн$^{-1}$, результатов двух параллельных измерений X_1 и X_2, млн$^{-1}$, при выполнении условия

$$100 \cdot \frac{|X_1 - X_2|}{\overline{X}} \le r_{отн}, \quad (7)$$

где $r_{отн}$ — предел повторяемости (см. таблицу 3), %.

При невыполнении условий (5) и (7) получают еще два результата измерений в соответствии с разделом 7 и затем используют методы проверки приемлемости четырех результатов параллельных измерений и установления результата измерений согласно ГОСТ ИСО 5725-6 (подраздел 5.2).

Таблица 3 — Метрологические характеристики метода

Диапазон измерения массовой концентрации (массовой доли) аминокислот, мг/дм^3 (млн$^{-1}$)	Предел повторяемости (относительное расхождение результатов двух параллельных измерений) $r_{отн}$, %	Предел воспроизводимости (допускаемое относительное расхождение результатов двух единичных измерений, полученных в двух лабораториях) $R_{отн}$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности) ± δ, %
L-Пролин, L(+)-Орнитин			
От 5,0 до 20,0 включ.	1,4	8	7
L-Аспарагиновая кислота, L-Глутаминовая кислота, L-Гистидин, L-Аспарагин, L-Аланин, L-Аргинин, L-Метионин, L-бета-Фенилаланин, L-Лизин, Глицин			
От 5,0 до 20,0 включ.	2,2	9	8
L-Глутамин, L-Серин, L-Треонин, L-Тирозин, γ-Аминомасляная кислота, L-Валин, L-Изолейцин, L-Лейцин			
От 5,0 до 20,0 включ.	2,8	14	13

8.4 Относительное расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела значения критической разности $CD_{0,95}$

$$2 \cdot \frac{|\bar{C}_1 - \bar{C}_2|}{\bar{C}_1 + \bar{C}_2} \le 0{,}01 \cdot CD_{0,95}, \quad (8)$$

или

$$2 \cdot \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\bar{X}_1 + \bar{X}_2} \le 0{,}01 \cdot CD_{0,95}, \quad (9)$$

где $\bar{C}_1$ и $\bar{C}_2$ ($\bar{X}_1$ и $\bar{X}_2$) — результаты измерений массовой концентрации (массовой доли) аминокислот, полученные в первой и второй лабораториях соответственно, мг/дм^3 (млн$^{-1}$);

0,01 — коэффициент пересчета от процентов к абсолютным величинам;

$CD_{0,95}$ — критическая разность, %.

Значение критической разности вычисляют по формуле

$$CD_{0,95} = \sqrt{R_{отн}^2 - r_{отн}^2 \cdot (1 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2})}, \quad (10)$$

где $R_{отн}$ — предел воспроизводимости (см. таблицу 3), %;

$r_{отн}$ — предел повторяемости (см. таблицу 3), %;

n_1 и n_2 — число параллельных измерений в первой и второй лабораториях соответственно.

При выполнении условий (8) или (9) приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного результата используют их среднеарифметическое значение. При невыполнении этого условия рекомендуется провести мероприятия, предусмотренные ГОСТ ИСО 5725-6 (пункты 5.3.3 и 5.3.4).

8.5 Результаты измерений регистрируют в протоколе испытаний согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025 с указанием настоящего стандарта в следующем виде

$$(\overline{C} \pm \Delta_C),\ \text{мг/дм}^3\ (P = 0{,}95) \tag{11}$$

или

$$(\overline{X} \pm \Delta_X),\ \text{млн}^{-1}\ (P = 0{,}95), \tag{12}$$

где $\overline{C}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений массовой концентрации аминокислот, мг/дм^3;

Δ_C — значение границ абсолютной погрешности измерений массовой концентрации аминокислот для доверительной вероятности $P = 0{,}95$, мг/дм^3, вычисленное по формуле

$$\Delta_C = \frac{\delta \cdot \overline{C}}{100}, \tag{13}$$

где δ — значение границ относительной погрешности измерений массовой концентрации (массовой доли) аминокислот для доверительной вероятности $P = 0{,}95$ (см. таблицу 3), %;

$\overline{X}$ — среднеарифметическое результатов двух параллельных измерений массовой доли аминокислот, млн$^{-1}$;

Δ_X — значение границ абсолютной погрешности измерений массовой доли аминокислот для доверительной вероятности $P = 0{,}95$, млн$^{-1}$, вычисленное по формуле

$$\Delta_X = \frac{\delta \cdot \overline{X}}{100}. \tag{14}$$

9 Контроль качества результатов измерений

Контроль качества результатов измерений осуществляют, используя методы контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости и контроля стабильности среднеквадратического отклонения промежуточной прецизионности с применением контрольных карт Шухарта по ГОСТ ИСО 5725-6 (пункты 6.2.2, 6.2.3).

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

10 Требования безопасности

10.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

Требования электробезопасности при работе с приборами — по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с руководством по эксплуатации используемого оборудования.

10.2 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке результатов допускаются инженер-химик, техник или лаборант, имеющие высшее или специальное образование, опыт работы в химической лаборатории и изучившие инструкцию по эксплуатации жидкостного хроматографа. Первое применение метода в лаборатории должно проводиться под руководством специалиста, владеющего теорией высокоэффективной жидкостной хроматографии и имеющего практические навыки в этой области.

Приложение А
(справочное)

Мониторинг хроматографических характеристик колонки

А.1 Проверку оптимальности хроматографических условий (хроматографических характеристик колонки) проводят по хроматограмме стандартного раствора № 4 с помощью программного обеспечения или вручную по показателям в соответствии с таблицами А.1 и А.2.

Таблица А.1 — Время удерживания, коэффициент удерживания, число теоретических тарелок и коэффициент асимметрии хроматографических пиков*

Компонент	Время удерживания, мин	Коэффициент удерживания	Число теоретических тарелок N	Коэффициент ассиметрии A_s
L-Аспарагиновая кислота	3,54 ± 0,18	0,40	7165	1,16
L-Глутаминовая кислота	6,37 ± 0,32	1,64	30 690	1,07
L-Аспарагин	7,72 ± 0,39	2,02	39 442	0,91
L-Треонин	7,97 ± 0,40	2,21	38 459	0,91
L-Серин	8,09 ± 0,40	2,31	38 685	0,80
L-Гистидин	8,13 ± 0,41	2,75	6482	0,30
L-Глутамин	8,59 ± 0,43	3,20	59 911	1,19
Глицин	9,15 ± 0,46	3,56	70 633	1,12
L-бета-Фенилаланин	9,85 ± 0,49	3,75	58 876	1,10
L-Аланин	10,07 ± 0,50	3,88	75 665	1,14
L-Аргинин	10,36 ± 0,52	4,02	60 735	0,56
γ-Аминомасляная кислота	10,49 ± 0,52	4,19	45 263	1,05
L-Тирозин	11,02 ± 0,55	4,61	112 150	0,31
L-Валин	12,21 ± 0,61	4,66	98 930	0,30
L-Метионин	12,90 ± 0,65	4,79	161 106	1,08
L-Изолейцин	14,10 ± 0,71	5,63	76 388	0,81
L-Лейцин	14,62 ± 0,73	5,93	184 516	1,08
L-Лизин	14,91 ± 0,75	6,35	63 459	0,85
L-Пролин	17,87 ± 0,89	6,40	70 436	0,34
L(+)-Орнитин	21,9 ± 1,10	7,75	242 978	1,67

* Данные значения получены при использовании хроматографической колонки Zorbax SB C18 фирмы Agilent. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой указанного продукта.

Таблица А.2 — Разрешение хроматографических пиков аминокислот

Компонент	Разрешение R_s
L-Аспарагиновая кислота / L-Глутаминовая кислота	0,21
L-Глутаминовая кислота / L-Аспарагин	1,99
L-Аспарагин / L-Треонин	6,67
L-Треонин / L-Серин	2,98
L-Серин / L-Гистидин	1,25
L-Гистидин / L-Глутамин	1,40
L-Глутамин / Глицин	1,30
Глицин / L-бета-Фенилаланин	7,20
L-бета-Фенилаланин / L-Аланин	5,20
L-Аланин / L-Аргинин	2,70
L-Аргинин / γ-Аминомасляная кислота	1,80
γ-Аминомасляная кислота / L-Тирозин	1,80
L-Тирозин / L-Валин	1,90
L-Валин / L-Метионин	1,60
L-Метионин / L-Изолейцин	5,70
L-Изолейцин / L-Лейцин	1,90
L-Лейцин / L-Лизин	8,60
L-Лизин / L-Пролин	6,40
L-Пролин / L(+)-Орнитин	2,01

А.2 Время удерживания (абсолютное) аминокислот определяют непосредственно из хроматограмм двух параллельных измерений одной пробы. В случае обнаружения отклонения времени удерживания более чем на 5 % от стандартного значения заново устанавливают градуировочную характеристику во всем диапазоне измерений. В случае выполнения условий неравенства (4) допускается программное изменение времен удерживания компонентов.

А.3 Коэффициент удерживания (емкости) k' вычисляют по формуле

$$k' = \frac{t'_R}{t_M}, \tag{А.1}$$

где t'_R — приведенное время удерживания, мин;

t_M — время выхода неудерживаемого компонента, мин.

Колонка считается удовлетворительной при значении коэффициента емкости, не превышающем 10 % от указанного в таблице А.1.

А.4 Число теоретических тарелок вычисляют по формуле

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 = 5{,}545 \cdot \left(\frac{t_R}{W_h}\right)^2, \tag{А.2}$$

где 16 и 5,545 — множители, вытекающие из свойств нормального распределения;

t_R — время удерживания пика, мин;

W_b — ширина пика у основания, мин;

W_h — ширина пика на его полувысоте, мин.

Колонка считается удовлетворительной при значении числа теоретических тарелок не ниже 10 % от указанного в таблице.

А.5 Коэффициент асимметрии вычисляют по формуле

$$A_s = \frac{A}{B}, \qquad (A.3)$$

где A — «левый» отрезок, образованный на горизонтальной линии, проведенной на высоте 10 % от основания пика и разделенной вертикалью, опущенной из вершины пика;

B — «правый» отрезок, образованный на горизонтальной линии, проведенной на высоте 10 % от основания пика и разделенной вертикалью, опущенной из вершины пика.

Колонка считается удовлетворительной при значении коэффициента асимметрии, не превышающем 1,75.

А.6 Разрешение R_s вычисляют по формуле

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})}, \qquad (A.4)$$

где t_{R2}, t_{R1} — значения времени удерживания разделяемых полностью или критически (не полностью) компонентов, мин;

W_{b1}, W_{b2} — ширина пиков у основания, мин.

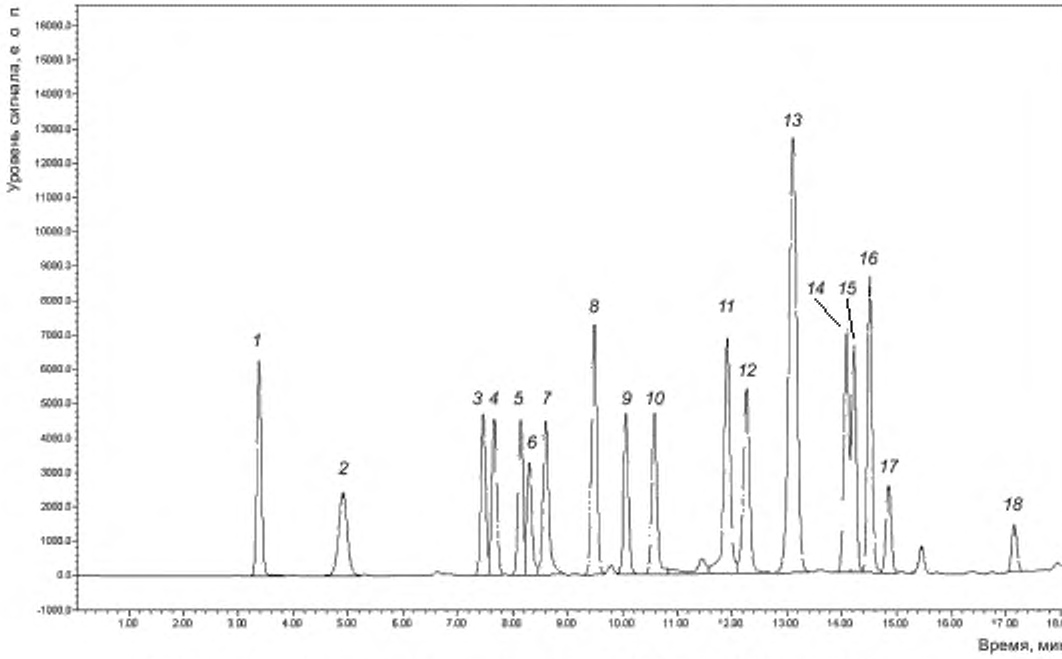
А.7 По результатам двух параллельных измерений вычисляют средние значения R_s для пары разделяемых полностью или критически (не полностью) компонентов (n, n + 1). Колонка считается удовлетворительной при значениях $R_{s\,n,\,n+1} \geq 1{,}25$.

Контроль стабильности хроматографической колонки в процессе эксплуатации проводят не реже одного раза в две недели.

Приложение Б
(справочное)

Примеры хроматограмм аминокислот

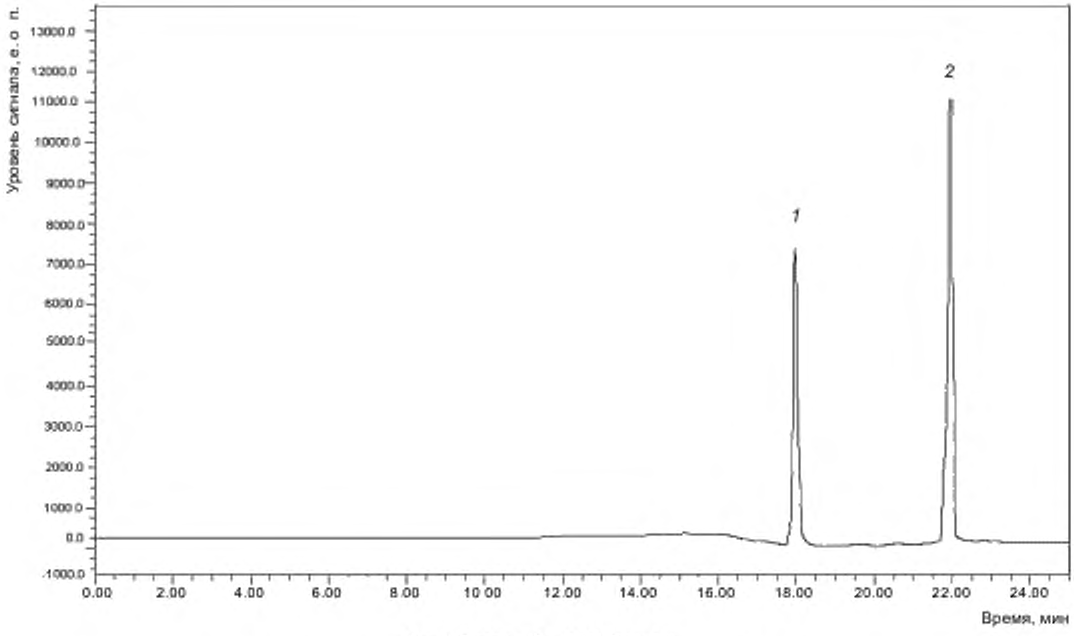
Б.1 Примеры хроматограмм аминокислот приведены на рисунках Б.1, Б.2.



1 — L-Аспарагиновая кислота; *2* — L-Глутаминовая кислота; *3* — L-Аспарагин; *4* — L-Треонин; *5* — L-Серин; *6* — L-Гистидин; *7* — L-Глутамин; *8* — Глицин; *9* — L-бета-Фенилаланин; *10* — L-Аланин, *11* — L-Аргинин; *12* — γ-Аминомасляная кислота; *13* — L-Тирозин; *14* — L-Валин; *15* — L-Метионин; *16* — L-Изолейцин, *17* — L-Лейцин; *18* — L-Лизин

Длина волны возбуждения 266 нм, длина волны регистрации 305 нм.

Рисунок Б.1 — Хроматограмма дериватизированного градуировочного раствора аминокислот № 4



1 — L-Пролин, *2* — L(+)-Орнитин
Длина волны возбуждения 340 нм, длина волны регистрации 420 нм.

Рисунок Б.2 — Хроматограмма градуировочного раствора аминокислот № 4

УДК 543.544.52:664.863:006.35 МКС 67.080.01 Н69

Ключевые слова: продукция соковая из фруктов и овощей, свободные аминокислоты, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, массовая концентрация, массовая доля

БЗ 9—2017/62

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *В.Г. Курочкин*

Сдано в набор 13.12.2017. Подписано в печать 15.01.2018. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,33. Уч.-изд. л. 2,11. Тираж 30 экз. Зак. 2703.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
www.jurisizdat.ru gost.e-ecolog.ru

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001, Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru