МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33332— 2015

ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ФРУКТОВ И ОВОЩЕЙ

Определение массовой доли сорбиновой и бензойной кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

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 РАЗРАБОТАН 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 18 июня 2015 г. № 47)

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
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 3 августа 2015 г. № 1049-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33332–2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 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

© Стандартинформ, 2015

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 Условия проведения измерений 2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы 3
6 Отбор и подготовка проб 3
7 Подготовка к проведению измерений 4
8 Порядок проведения измерений 5
9 Обработка и оформление результатов измерений 7
10 Контроль качества результатов измерений при реализации метода 9
11 Требования безопасности 9
Приложение А (справочное) Расчетный метод определения массовых долей водорастворимых солей (сорбатов и бензоатов) 10
Приложение Б (обязательное) Определение эффективности хроматографической колонки 11
Приложение В (обязательное) Методика приготовления аттестованной смеси сорбиновой и бензойной кислот 12
Приложение Г (справочное) Типовые хроматограммы сорбиновой и бензойной кислот в продуктах переработки фруктов и овощей 14
Библиография 15

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ФРУКТОВ И ОВОЩЕЙ

Определение массовой доли сорбиновой и бензойной кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Fruit and vegetable products. Determination of sorbic and benzoic acids by high performance liquid chromatography

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продукты переработки фруктов и овощей, в том числе на соковую продукцию, компоты и кисели (включая изготовленные из сушеных фруктов), джемы, повидло, варенья (далее – продукты) и устанавливает метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии определения (измерения) массовой доли сорбиновой и бензойной кислот*.

Диапазон измерения массовой доли сорбиновой и бензойной кислот от 10 до 1500 млн$^{-1}$ включительно.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 8.315–97 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения

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

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

ГОСТ 12.1.007–88 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 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3117–78 Реактивы. Аммоний уксуснокислый. Технические условия

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

ГОСТ 4207–75 Реактивы. Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия

---

* Допускается определение массовых долей водорастворимых солей (сорбатов и бензоатов) путем пересчета полученных результатов измерений массовых долей соответствующих кислот (см. приложение А).

** 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 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 5823–78 Реактивы. Цинк уксуснокислый 2-водный. Технические условия

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

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

ГОСТ 10521–78 Кислота бензойная. Технические условия

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

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

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

ГОСТ 26671–2014 Продукты переработки фруктов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

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

ГОСТ 29169–91 (ИСО 648–77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

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

Определение сорбиновой и бензойной кислот в продуктах основано на их извлечении из пробы продукта буферным раствором ацетата аммония, содержащим метанол, очистке полученного экстракта и последующем количественном определении сорбиновой и бензойной кислот в экстракте методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Разделение сорбиновой и бензойной кислот происходит при температуре окружающей среды в изократическом режиме с использованием в качестве подвижной фазы раствора метанола и ацетатного буферного раствора.

Детектирование осуществляется с помощью спектрофотометрического детектора в ультрафиолетовой области спектра.

Длительность измерения не превышает 30 мин.

4 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха ..... (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление..... (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность..... от 40 % до 80 %;
- напряжение в электросети ..... (220 ± 10) В;
- частота тока в электросети..... (50 ± 1) Гц.

В помещениях, предназначенных для проведения измерений, не допускается загрязненность воздуха рабочей зоны пылью, агрессивными веществами, должны отсутствовать вибрация и другие факторы, влияющие на измерения массы, объема и температуры.

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-1–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения».

** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

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

5.1 Хроматограф жидкостный, снабженный насосом высокого давления с верхним рабочим пределом не менее 25 МПа, петлевым дозатором с рабочим объемом петли от 0,01 до 0,04 $см^3$, со спектрофотометрическим или диодноматричным детектором, позволяющим проводить измерения в диапазоне длин волн от 200 до 300 нм и обеспечивающим относительное стандартное отклонение выходного сигнала по площади пика не более 2,0 %, с программным обеспечением для сбора и обработки хроматографических данных.

5.2 Колонка хроматографическая* с защитной предколонкой длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем с привитыми октадецильными группами (С18) с размером частиц 5 мкм.

5.3 Весы неавтоматического действия, специального класса точности с максимальной нагрузкой 210 г и ценой поверочного деления $e \le 0{,}001$ г по ГОСТ OIML R 76-1.

5.4 Пипетки мерные 2-2-2-5, 2-2-2-10, 2-2-2-25 по ГОСТ 29169.

5.5 Емкости для жидких проб (виалы) подходящей вместимости и с завинчивающимися крышками.

5.6 Фильтр мембранный с диаметром пор 0,45 мкм с насадкой на шприц.

5.7 Микрошприцы вместимостью 0,025 или 0,050 $см^3$ с ценой деления не менее 0,2 $мм^3$.

5.8 Дозаторы пипеточные с наконечниками одноканальные по ГОСТ 28311, переменного объема от 100 до 1000 $мм^3$, с пределом допускаемого относительного отклонения среднеарифметического значения фактического объема дозы от номинального 3,0 % и пределом допускаемого относительного среднеквадратичного отклонения фактического объема дозы 3,0 %.

5.9 pH-метр по ГОСТ 9245 с погрешностью измерения ± 0,05 ед. pH в диапазоне измерения от 4 до 9 ед. pH, снабженный комбинированным стеклянным электродом.

5.10 Центрифуга настольная со скоростью вращения ротора не менее 4000 об/мин и адаптером для пробирок.

5.11 Пробирки полимерные центрифужные подходящей вместимости с завинчивающейся крышкой.

5.12 Картриджи (колонки) для твердофазной экстракции, заполненные обращенно-фазовым сорбентом С18.

5.13 Установка лабораторная для вакуумной фильтрации с насосом.

5.14 Метанол для жидкостной хроматографии, ос. ч.

5.15 Аммоний уксуснокислый по ГОСТ 3117, ч. д. а.

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

5.17 Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207, х. ч.

5.18 Цинк уксуснокислый 2-водный по ГОСТ 5823, ч. д. а.

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

5.20 Цилиндры мерные 1-1000-2 или других исполнений по ГОСТ 1770.

5.21 Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

5.22 Шприц из полимерного материала одноразовый по ГОСТ ISO 7886-1.

5.23 Стаканы В-1-100 по ГОСТ 25336.

5.24 Баня водяная, оснащенная терморегулятором для поддержания и контроля температуры в диапазоне от 25 °С до 100 °С с погрешностью ± 2 °С.

Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования с техническими характеристиками, а также посуды, реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

6 Отбор и подготовка проб

6.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 26313, подготовку проб – по ГОСТ 26671.

6.2 Подготовку проб осветленной соковой продукции – по ГОСТ 31643 (пункт 6.2.1).

Подготовку проб соковой продукции с объемной долей мякоти до 10,0 % включительно или содержащих нерастворимые в воде вещества – по ГОСТ 31643 (пункт 6.2.2).

---

* Например, колонки Кромасил С18, Waters SPHERISORB S100DS2. Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования хроматографических колонок иных типоразмеров при условии соблюдения требований к эффективности разделения (см. приложение Б).

Концентрированную соковую продукцию разбавляют водой в пять раз весовым методом и далее проводят подготовку по ГОСТ 31643 (пункты 6.2.1, 6.2.2).

7 Подготовка к проведению измерений

7.1 Подготовка хроматографа к работе

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

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

7.2 Приготовление раствора ацетата аммония молярной концентрации 0,01 моль/дм^3

Взвешивают (0,77 ± 0,01) г уксуснокислого аммония, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доводят водой до метки и перемешивают.

Раствор хранят в герметичной емкости в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более одной недели.

7.3 Приготовление ацетатного буферного раствора

Взвешивают на весах (0,80 ± 0,01) г уксуснокислого аммония, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доводят водой до метки и перемешивают. Доводят pH раствора до (4,5 ± 0,1) ед. pH путем добавления уксусной кислоты, регистрируя показания pH-метра.

Раствор хранят в герметичной емкости в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более одной недели.

7.4 Приготовление экстрагирующего раствора

Смешивают 60 частей по объему ацетатного буферного раствора, приготовленного по 7.3, с 40 частями метанола.

Раствор хранят в герметичной емкости в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более одной недели.

7.5 Приготовление подвижной фазы

Смешивают 50 частей по объему раствора ацетата аммония с 40 частями по объему метанола и при перемешивании доводят до значения (4,5 ± 0,1) ед. pH путем добавления уксусной кислоты, регистрируя показания pH-метра.

Раствор хранят в течение семи дней в холодильнике при температуре не выше 10 °С при условии визуального отсутствия нерастворимых веществ. Перед использованием подвижную фазу дегазируют путем фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм на ультразвуковой бане или иным способом.

7.6 Приготовление раствора железистосинеродистого калия 3-водного массовой концентрации 150 г/дм^3 (реактив Карреза I)

Взвешивают (150,00 ± 0,01) г железистосинеродистого калия 3-водного, растворяют в небольшом количестве воды и переносят, смывая несколькими порциями воды, в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Раствор хранят при комнатной температуре не более одного месяца.

7.7 Приготовление раствора уксуснокислого цинка 2-водного массовой концентрации 300 г/дм^3 (реактив Карреза II)

Взвешивают (300,00 ± 0,01) г уксуснокислого цинка 2-водного, растворяют в небольшом количестве воды и переносят, смывая несколькими порциями воды, в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Раствор хранят при комнатной температуре не более одного месяца.

8 Порядок проведения измерений

8.1 Условия хроматографических измерений

Измерения проводят при следующих параметрах:
- температура термостата колонки ..... (25 ± 5) °С;
- объем вводимой пробы ..... от 10 до 20 мм^3;
- элюент ..... по 7.5;
- режим элюирования ..... изократический;
- длина волны спектрофотометрического детектора ..... 235 нм (для бензойной кислоты) и 254 нм (для сорбиновой кислоты).

Скорость подвижной фазы выбирают в соответствии с типоразмерами колонки.

Примечание – При измерении смеси сорбиновой и бензойной кислот рекомендуется проводить детектирование при длине волны 235 нм. При измерении только сорбиновой кислоты допускается использование длины волны детектирования 254 нм, на которой отклик бензойной кислоты очень слабый. Поэтому при измерении только бензойной кислоты детектирование следует проводить при длине волны 235 нм.

В зависимости от типа применяемого хроматографа и хроматографической колонки допускается изменение условий измерений, обеспечивающих требуемое разделение компонентов пробы в порядке, указанном в приложении Б.

8.2 Приготовление градуировочных растворов

Готовят ряд градуировочных растворов по шести уровням, от меньшей массовой концентрации к большей, из аттестованной смеси (см. приложение В) в соответствии с таблицей 1, используя соответствующие пипетки по 5.4 с одной меткой и мерные колбы по 5.21, доводят объем до метки ацетатным буферным раствором, приготовленным по 7.3, и перемешивают.

Градуировочные растворы хранят при температуре не выше 4 °С не более одной недели.

Таблица 1 – Приготовление градуировочных растворов для измерения сорбиновой и бензойной кислот

№ градуировочного раствора (i = 1...6)	Вместимость мерной колбы, см^3	Объем аттестованной смеси, взятый для приготовления градуировочного раствора, см^3	Массовая доля сорбиновой или бензойной кислоты $X_{гр,i}$, млн$^{-1}$	Границы погрешности аттестованного значения массовой доли сорбиновой или бензойной кислоты при P = 0,95, отн. %
1	100	0,50	5	± 2,3
2	100	1,0	10	± 1,5
3	100	5,0	50	± 1,3
4	50	5,0	100	± 1,3
5	50	10,0	200	± 1,2
6	50	25,0	500	± 1,2

8.3 Установление градуировочной характеристики (градуировка хроматографа)

Построение и обработку градуировочной зависимости выполняют методом абсолютной градуировки с помощью программного обеспечения хроматографа.

Хроматограммы обрабатывают в соответствии с руководством пользователя программного обеспечениея. Регистрируют пики сорбиновой и бензойной кислот. Компоненты идентифицируют по абсолютным значениям времени удерживания.

Проводят измерения всех градуировочных растворов, проводя по три параллельных измерения для каждого уровня, в порядке возрастания массовой концентрации компонентов, полностью заполняя петлю инжектора в условиях, указанных в 8.1. Регистрируют площади пиков, проверяя приемлемость выходных сигналов.

Выходные сигналы признают приемлемыми, если относительное среднеквадратичное отклонение (ОСКО) для каждого уровня градуировочных растворов по трем параллельным измерениям, участвующих в нахождении градуировочной характеристики, вычисленное с помощью программного обеспечения, не превышает 3 %.

Площадь пика бензойной или сорбиновой кислоты $\overline{S}$ (среднеарифметическое значение из ре-

зультатов двух измерений), мВ·с, и их массовая доля в градуировочных растворах X, млн$^{-1}$, находятся в функциональной зависимости вида

$$\overline{S} = k \cdot X + b \,, \qquad (1)$$

где k,b – градуировочные коэффициенты в уравнении прямой, вычисляемые методом наименьших квадратов, мВ·с·(млн$^{-1}$)$^{-1}$ и мВ·с соответственно.

Градуировочную характеристику, вычисленную методом наименьших квадратов, считают линейной, если коэффициент корреляции R_{cs} составляет не менее 0,995.

Градуировочную характеристику устанавливают заново в случае замены оборудования, колонок, партий реактивов, изменения условий измерений или при неудовлетворительных результатах оперативного контроля, но не реже одного раза в месяц.

Установление градуировочной характеристики с проверкой линейности проводят заново в случаях:

- после введения в эксплуатацию новых или отремонтированных средств измерений;
- после замены хроматографической колонки;
- при смене партий реактивов;
- после очистки систем разделения и детектирования;
- если градуировочная характеристика нестабильна, но не реже одного раза в месяц.

8.4 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят не реже одного раза в неделю с применением двух градуировочных растворов, приготовленных по 8.2, с массовой концентрацией сорбиновой и бензойной кислот, близкой к началу и концу диапазона измерений. Допускается проводить контроль только по сорбиновой или только по бензойной кислоте, чередуя их.

Регистрируют хроматограммы каждого градуировочного раствора в тех же условиях, в которых была установлена градуировочная характеристика.

Измеренное таким образом значение массовой доли сорбиновой или бензойной кислоты сравнивают с реальным содержанием сорбиновой и бензойной кислоты в градуировочных растворах.

Градуировочную характеристику считают стабильной, если для каждого градуировочного раствора выполняется условие

$$\frac{\left|X_{\text{изм}} - X_{\text{гр},i}\right|}{X_{\text{гр},i}} \cdot 100 \le K_{\text{гр}} \,, \qquad (2)$$

где $X_{\text{изм}}$ – массовая доля сорбиновой или бензойной кислоты в i-том градуировочном растворе, измеренная по градуировочной характеристике, млн$^{-1}$;

$X_{\text{гр},i}$ – аттестованное значение массовой доли сорбиновой или бензойной кислоты в i-том градуировочном растворе, млн$^{-1}$;

100 – коэффициент пересчета в проценты;

$K_{\text{гр}}$ – норматив контроля стабильности градуировочной характеристики для бензойной и сорбиновой кислот, равный 8 %;

i – номер градуировочного раствора (см. таблицу 2).

Если два и более результатов контрольных процедур превышают норматив контроля $K_{\text{гр}}$, то градуировочная характеристика нестабильна и требуется повторная градуировка измерительной системы.

Если один результат контрольной процедуры превышает норматив контроля, то необходимо повторить контрольную процедуру, если результат повторной контрольной процедуры также превышает норматив контроля, то необходимо провести повторную градуировку. Если результат повторной контрольной процедуры меньше норматива контроля, то можно сделать вывод о том, что градуировочная характеристика стабильна.

8.5 Измерение проб

Измерения проводят не менее двух раз в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-1 (подраздел 3.14).

8.5.1 Экстракция сорбиновой и бензойной кислот

Взвешивают (2,000–10,000) г пробы, подготовленной по разделу 6, и переносят ее количественно в мерную колбу вместимостью 250 см^3 (V_2), приливают 100 см^3 экстрагирующего раствора, приготовленного по 7.4. Колбу, не закрывая пробкой, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически перемешивая, после чего вносят последовательно по 5 см^3 раствора Карреза I и раствора Карреза II, тщательно перемешивая содержимое колбы после каждого внесения, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Раствор из мерной колбы переносят в пробирки и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин.

Надосадочный слой из пробирки фильтруют через картридж для твердофазной экстракции, отбирают из него пипеткой аликвоту объемом 10 см^3 (V_3) в мерную колбу вместимостью 50 см^3 (V_1) и доводят до метки экстрагирующим раствором, приготовленным по 7.5, тщательно перемешивают.

Полученный раствор используют для хроматографического измерения по 8.5.2.

8.5.2 Хроматографическое измерение сорбиновой и бензойной кислот

В инжектор хроматографа микрошприцем вводят раствор пробы, полученный по 8.5.1, полностью заполняя петлю инжектора, и проводят измерения в условиях, указанных в 8.1.

Получают две хроматограммы раствора пробы. Регистрируют на хроматограммах пики сорбиновой и бензойной кислот, совпадающие по времени удерживания с пиками на хроматограммах, полученных при измерении градуировочных растворов.

Значения площадей пиков на хроматограмме раствора пробы используют для расчета массовых долей сорбиновой и бензойной кислот по разделу 9 при условии, что они не выходят за верхнюю границу диапазона градуировочной характеристики.

Относительное расхождение времени удерживания не должно отличаться более чем на 5 %. Если данное условие не соблюдается, измерения повторяют.

Типовые хроматограммы сорбиновой и бензойной кислот в продуктах переработки фруктов и овощей приведены в приложении Г.

9 Обработка и оформление результатов измерений

9.1 Обработку хроматограмм проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных в составе хроматографа с использованием градуировочной зависимости.

9.2 Массовую долю сорбиновой или бензойной кислоты X, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(\overline{S} - b) \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot \rho}{k \cdot m \cdot V_2}, \qquad (3)$$

где $\overline{S}$ – средняя площадь пика сорбиновой или бензойной кислоты на хроматограммах раствора пробы, мВ·с;

b – градуировочный коэффициент для сорбиновой или бензойной кислоты, мВ·с;

V_1 – объем, в котором растворена аликвота раствора пробы перед измерением, см^3;

V_3 – объем аликвоты раствора пробы, взятый для разведения, см^3;

p – плотность аттестованного раствора сорбиновой и бензойной кислот,г/см^3.

k – градуировочный коэффициент для сорбиновой или бензойной кислоты, мВ·с·(млн$^{-1}$)$^{-1}$;

m – масса пробы, взятой для измерения, г;

V_2 – объем, в котором растворена проба при приготовлении раствора, см^3

Если площадь пика сорбиновой или бензойной кислоты на хроматограммах раствора пробы выходит за верхнюю границу диапазона градуировки хроматографа, раствор, полученный по 8.5.1, разбавляют экстрагирующим раствором так, чтобы результат измерений не превышал верхнюю границу градуировочной зависимости и проводят его повторное измерение.

9.3 За результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, если относительное расхождение между ними не превышает предела повторяемости $r_{отн}$, приведенного в таблице 2 при доверительной вероятности P = 0,95:

$$2 \cdot \frac{|X_1 - X_2|}{X_1 + X_2} \le 0{,}01 \cdot r_{отн}, \quad (4)$$

где X_1, X_2 – результаты параллельных измерений массовых долей сорбиновой или бензойной кислоты, вычисленных по формуле (3), млн$^{-1}$;

$r_{отн}$ – значение предела повторяемости, %, (см. таблицу 2).

9.4 Если условие (4) не выполняется, получают еще два результата параллельных измерений в соответствии с 8.5.2. За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов четырех параллельных измерений, если относительное расхождение между ними при соблюдении условий согласно ГОСТ ИСО 5725-6 (раздел 5) не превышает значения критического диапазона $CR_{0,95}(4)_{отн}$ при доверительной вероятности P = 0,95

$$4 \cdot \frac{|X_{макс} - X_{мин}|}{X_1 + X_2 + X_3 + X_4} \le 0{,}01 \cdot CR_{0,95}(4)_{отн}, \quad (5)$$

где $X_{макс}$, $X_{мин}$ – максимальное и минимальное значения из результатов четырех параллельных измерений массовой доли сорбиновой или бензойной кислот в пробе, млн$^{-1}$;

X_1, X_2, X_3, X_4 – результаты четырех параллельных измерений массовой доли сорбиновой или бензойной кислот в пробе, млн$^{-1}$;

$CR_{0,95}(4)_{отн}$ – значение критического диапазона для уровня вероятности P = 0,95 для четырех результатов параллельных измерений, % (см. таблицу 2).

9.5 Если относительное расхождение полученных четырех результатов параллельных измерений больше $CR_{0,95}(4)_{отн}$, то в качестве результата измерений принимают медиану четырех результатов параллельных измерений.

Таблица 2 – Значения пределов повторяемости, воспроизводимости критического диапазона $CR_{0,95}(4)_{отн}$ при доверительной вероятности P = 0,95

Диапазон измерений массовой доли сорбиновой и бензойной кислот, млн$^{-1}$	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных измерений) $r_{отн}$, %	Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения между четырьмя результатами параллельных измерений) $CR_{0,95}(4)_{отн}$, %	Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами, полученными в условиях воспроизводимости) $R_{отн}$, %
От 10 до 1500 включ.	8	11	12

9.6 Расхождение между результатами измерений, полученных в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости, выраженного в абсолютных величинах. При выполнении этого условия приемлемы оба результата, и в качестве окончательного может быть использовано их общее среднее значение.

Предел воспроизводимости R вычисляют по формуле

$$R = 0{,}01 \cdot R_{отн} \cdot \overline{\overline{X}}, \quad (6)$$

где 0,01 – коэффициент пересчета от процентов в абсолютные величины;

$R_{отн}$ – значение предела воспроизводимости в относительных величинах (см. таблицу 2), %;

$\overline{\overline{X}}$ – среднее значение результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, млн$^{-1}$;

При превышении предела воспроизводимости выполняют процедуры в соответствии с ГОСТ ISO 5725-6 (пункты 5.3.3, 5.3.4).

9.7 Результаты измерений в документах, предусматривающих их использование, представляют согласно ГОСТ ISO/МЭК 17025 с указанием настоящего стандарта в виде

$$\overline{X} \pm 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \text{ при } P = 0{,}95,$$

где $\overline{X}$ – результат измерений массовой доли сорбиновой или бензойной кислоты, млн$^{-1}$;

$\pm\,\delta$ – границы относительной погрешности (см. таблицу 3), %.

Таблица 3 – Значения показателей повторяемости, воспроизводимости и точности результатов измерений

Диапазон измерений массовых долей сорбиновой и бензойной кислот, млн$^{-1}$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратичное отклонение повторяемости) $\sigma_{r,отн}$ %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратичное отклонение воспроизводимости) $\sigma_{R,отн}$ %	Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0,95$) ± δ, %
От 10 до 1500 включ.	3	4,5	9

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

10 Контроль качества результатов измерений при реализации метода

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

В качестве образцов для контроля используют стандартные образцы по ГОСТ 8.315* или аттестованные смеси по [2] с известным содержанием сорбиновой и бензойной кислот, введенных в продукты переработки фруктов и овощей, не содержащие данных компонентов**.

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

11 Требования безопасности

11.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении измерений должны соблюдаться требования безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

По степени воздействия на организм вредные вещества, используемые при выполнении измерений, относятся к 2, 3, 4 классам опасности по ГОСТ 12.1.007.

Содержание используемых вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать установленных ПДК в соответствии с ГОСТ 12.1.005.

Остатки проб продуктов переработки фруктов и овощей утилизируют в порядке, установленном в лаборатории.

Требования электробезопасности при работе с приборами – по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004.

11.2 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений, обработке и оформлению результатов допускаются инженеры-химики, лаборанты, имеющие высшее или среднее специальное образование, опыт работы с данным оборудованием и знакомые с настоящим методом.

Первое применение метода в лаборатории должно проводиться под руководством специалиста, владеющего теорией высокоэффективной жидкостной хроматографии и имеющего практические навыки в этой области.

Установление градуировочной характеристики, приготовление градуировочных растворов, проведение внутреннего контроля следует проводить специалисту высшей квалификации, имеющему стаж работы в данной области.

---

* Допускается использовать стандартные образцы сорбиновой и бензойной кислот по ГОСТ 8.315 с границами допускаемой относительной погрешности аттестованного значения ± 1 % при $P = 0,95$.

** Допускается использование градуировочных растворов или растворов с другими аттестованными значениями, приготовленных по приложению В.

Приложение А
(справочное)

Расчетный метод определения массовых долей водорастворимых солей (сорбатов и бензоатов)

А.1 Массовую долю водорастворимой соли сорбиновой или бензойной кислоты кислоты X_c, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X_c = X \cdot \frac{M_c}{M}, \qquad (A.1)$$

где X – массовая доля сорбиновой или бензойной кислоты, вычисляемая по формуле (3), млн$^{-1}$;
M_c – молярная масса соли бензойной или сорбиновой кислоты, г/моль;
M – молярная масса сорбиновой или бензойной кислоты, г/моль.

Приложение Б
(обязательное)

Определение эффективности хроматографической колонки

Б.1 Проверку условий хроматографического разделения осуществляют путем хроматографического измерения градуировочного раствора № 1 (см. таблицу 1).

При настройке хроматографа для обеспечения надежного измерения устанавливают норматив приемлемого разрешения для пар соседних пиков индивидуальных компонентов, определяемых пользователем, в зависимости от типа хроматографической системы, условий измерений и типа продукта.

Б.2 Коэффициент разделения *k* вычисляют по формуле

$$k = \frac{\Delta L}{W_1 + W_2}, \quad (Б.1)$$

где ΔL – расстояние между максимумами соседних пиков на пробной хроматограмме, мм;

W_1, W_2 – значения ширины первого и второго пиков на половине высоты соответствующего пика, мм (см. рисунок Б.1).

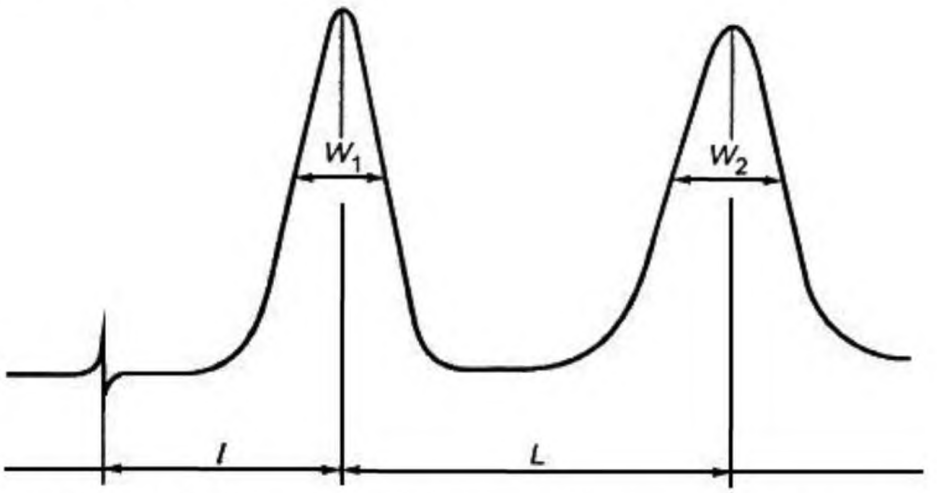


Рисунок Б.1 – Параметры, характеризующие эффективность разделения

Число теоретических тарелок (ЧТТ) вычисляют по формуле

$$\text{ЧТТ} = 5,54 \cdot \left(\frac{t}{W_{1/2}}\right)^2, \quad (Б.2)$$

где 5,54 – коэффициент пропорциональности;

t – время выхода пика, с;

$W_{1/2}$ – ширина пика на полувысоте, с.

Б.3 Эффективность хроматографического разделения признается удовлетворительной, если коэффициент разделения пиков сорбиновой и бензойной кислот составляет не менее 1,3, а число эффективных теоретических тарелок, вычисленное по пику бензойной кислоты, составляет не менее 4000.

Если данное условие не соблюдается, то для достижения требуемой эффективности разделения экспериментальным путем подбирают новые условия хроматографического измерения, т. е. новый состав подвижной фазы (объемную долю метанола в ней) и скорость ее потока. При невозможности достижения требуемых условий эффективности хроматографического разделения проводят определения других хроматографических колонок аналогичным образом.

Б.4 Контроль эффективности хроматографического разделения проводят не реже одного раза в две недели.

Приложение В
(обязательное)

Методика приготовления аттестованной смеси сорбиновой и бензойной кислоты

В.1 Область применения

Методика устанавливает порядок приготовления аттестованной смеси сорбиновой и бензойной кислот, предназначенной для приготовления градуировочных растворов в соответствии с 8.2 и оперативного контроля погрешности.

Аттестованная смесь представляет собой раствор сорбиновой и бензойной кислот в ацетатном буферном растворе.

В.2 Метрологические характеристики

Метрологические характеристики аттестованной смеси приведены в таблице В.1.

Таблица В.1

Наименование характеристики	Значение метрологической характеристики
Аттестованное значение массовой доли бензойной кислоты, млн$^{-1}$	1000
Аттестованное значение массовой доли сорбиновой кислоты, млн$^{-1}$	1000
Границы погрешности аттестованного значения массовой доли бензойной кислоты при P = 0,95, отн. %	± 1,1
Границы погрешности аттестованного значения массовой доли сорбиновой кислоты при P = 0,95, отн. %	± 1,0
Примечание – Метрологические характеристики установлены в соответствии с рекомендациями [2].	

В.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

В.3.1 Средства измерений

Весы специального класса точности с максимальной нагрузкой 210 г и ценой поверочного деления $e \le 0{,}001$ г по ГОСТ OIML R 76-1.

Колба мерная 2а-100-1 по ГОСТ 1770.

В.3.2 Реактивы

Кислота сорбиновая (гекса-2,4-диеновая), с массовой долей основного вещества не менее 99,5 %.

Кислота бензойная по ГОСТ 10521, ч. д. а.

Метанол для жидкостной хроматографии, ос. ч.

В.4 Порядок приготовления аттестованной смеси

Устанавливают массу используемой мерной колбы взвешиванием на весах.

В мерной колбе взвешивают на весах (0,100 ± 0,001) г бензойной кислоты и (0,100 ± 0,001) г сорбиновой кислоты, добавляют 40 см^3 метанола и перемешивают до полного растворения кристаллов, после чего доводят объем до метки ацетатным буферным раствором, приготовленным по 7.3 при температуре (25 ± 2) °С, снова взвешивают мерную колбу и тщательно перемешивают содержимое. Фактическую массу приготовленного раствора находят вычитанием массы пустой колбы из массы мерной колбы после доведения объема в ней до метки водой.

По установленному значению массы раствора аттестованной смеси находят плотность данного раствора ρ, г/см^3

$$\rho = \frac{m}{V}, \qquad (В.1)$$

где m – масса раствора, г;

V – объем раствора, 100 см^3.

Аттестованное значение массовых долей бензойной и сорбиновой кислот, X, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = 10^6 \cdot \frac{m_к}{m_1 - m_0}, \qquad (В.2)$$

где 10^6 – коэффициент пересчета массовой доли в единицы млн$^{-1}$;
$m_к$ – масса бензойной/сорбиновой кислоты, г;
m_1 – масса мерной колбы с раствором соответственно, г;
m_0 – масса пустой мерной колбы, г.

В.5 Требования к квалификации исполнителей

К приготовлению аттестованного раствора допускаются инженеры-химики или лаборанты, имеющие высшее или среднее специальное образование, прошедшие специальную подготовку и имеющие стаж работы в химической лаборатории не менее года.

В.6 Требования к упаковке и маркировке

На колбе с аттестованной смесью должна быть наклеена этикетка с указанием концентрации, погрешности ее установления и даты приготовления.

В.7 Условия хранения

Срок хранения аттестованного раствора при температуре (20 ± 5) °С – не более месяца.

Приложение Г
(справочное)

Типовые хроматограммы сорбиновой и бензойной кислот в продуктах переработки фруктов и овощей

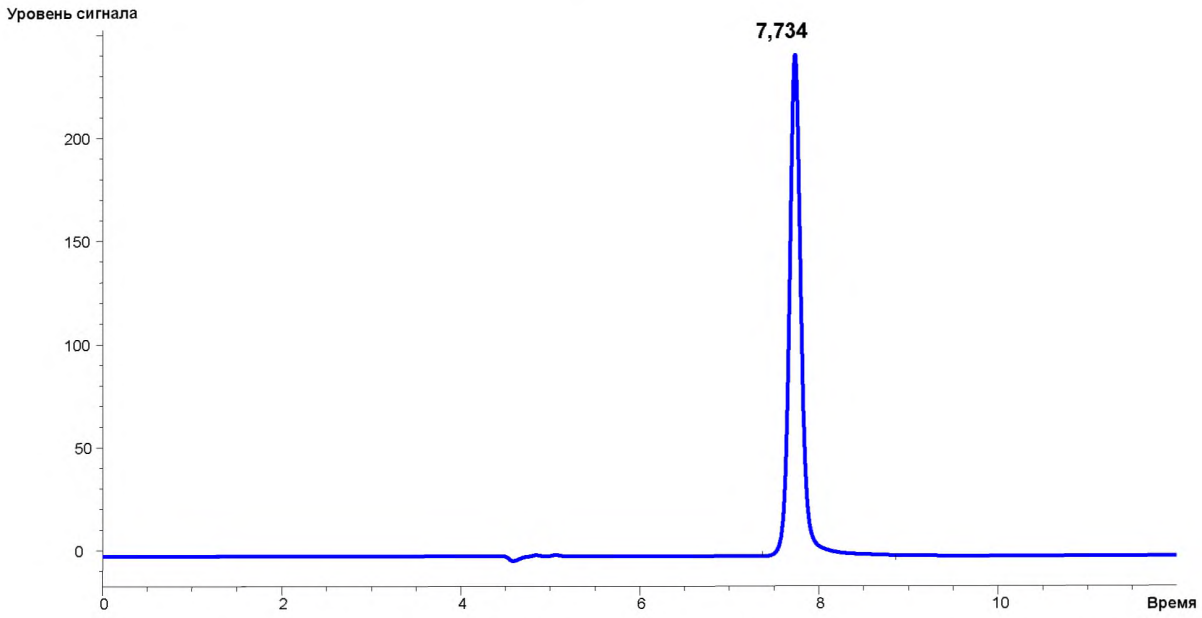


Рисунок Г.1 – Хроматограмма сорбиновой кислоты в экстракте из сока при длине волны 254 нм

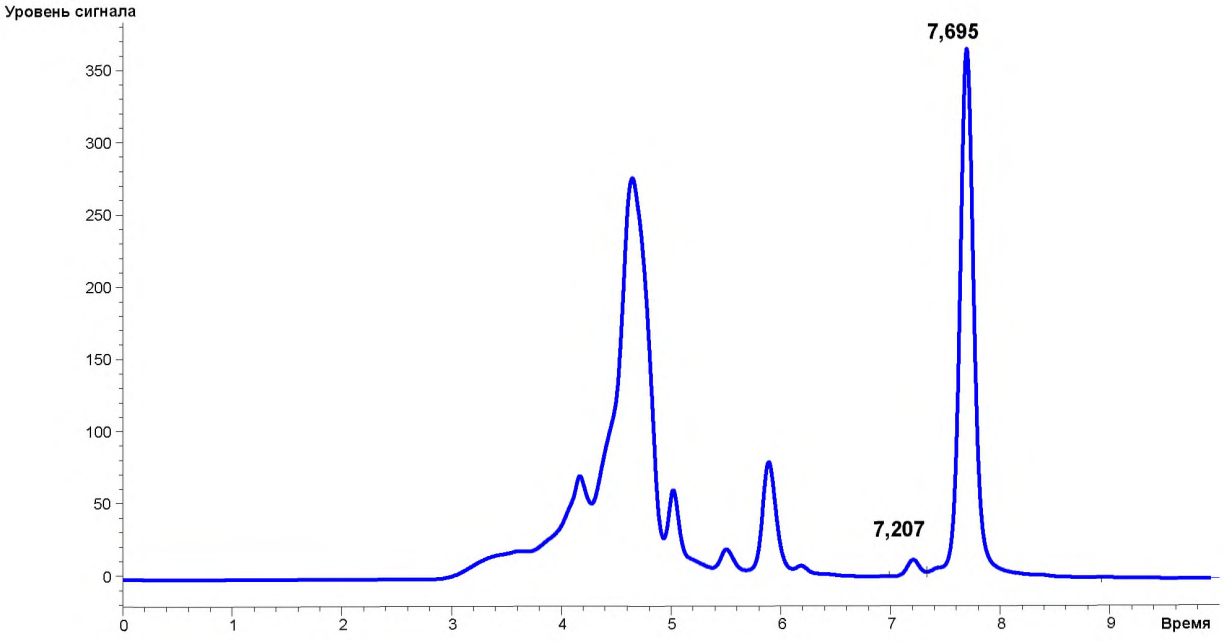


Рисунок Г.2 – Хроматограмма сорбиновой кислоты (время удерживания 7,2 мин) и бензойной кислоты (время удерживания 7,7 мин) в экстракте из киселя при длине волны 235 нм

Библиография

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

[2] РМГ 60–2003 Государственная система обеспечения единства измерений. Смеси аттестованные. Общие требования к разработке

УДК 664.863.001.4:006.354 МКС 67.080.01 Н69

Ключевые слова: продукты переработки фруктов и овощей, соковая продукция, фруктовые и овощные соки, нектары, морсы, высокоэффективная жидкостная хроматография, градуировочные растворы, массовая концентрация, бензойная кислота, сорбиновая кислота

Редактор *Л.Л. Штендель*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *А.С. Самарина*

Подписано в печать 15.12.2015. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 2,33. Тираж 45 экз. Зак. 3817.

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