ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54760— 2011

ПРОДУКТЫ МОЛОЧНЫЕ СОСТАВНЫЕ И ПРОДУКТЫ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ НА МОЛОЧНОЙ ОСНОВЕ

Определение массовой концентрации моно- и дисахаридов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 470 «Молоко и продукты переработки молока»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 949-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2012

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ МОЛОЧНЫЕ СОСТАВНЫЕ И ПРОДУКТЫ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ НА МОЛОЧНОЙ ОСНОВЕ

Определение массовой концентрации моно- и дисахаридов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Component milk products and infant milk products. Determination of mono- and disugars mass concentration by high-performance liquid chromatographic method

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на составные молочные продукты и продукты детского питания на молочной основе (далее – продукт) и устанавливает определение массовой концентрации моно- и дисахаридов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Диапазон измерений массовой концентрации моно- и дисахаридов в продукте от 50,0 до 10000,0 мг/дм^3.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

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

ГОСТ 12.1.004—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—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13928—84 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные шкафы бытовые. Общие технические условия.

Издание официальное

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

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

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

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины, установленные нормативным правовым актом Российской Федерации [1], а также следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **метод высокоэффективной жидкостной хроматографии:** Метод разделения компонентов продукта, основанный на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна, с использованием высокого давления (до 400 бар) и мелкозернистых сорбентов (до 1,8 мкм).

4 Сущность метода

Метод основан на определении углеводов в фильтрате, полученном после удаления из пробы продукта жира и белка, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при разделении на аминофазной колонке. Полученные результаты измерения сравнивают со значениями массовой концентрации моно- и дисахаридов в стандартных образцах, используя градуировочный график.

Пример хроматограммы молочного продукта представлен в приложении А.

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

Хроматограф жидкостный высокоэффективный, включающий следующие элементы:

- колонку аминофазную длиной 300 мм, размером внутреннего диаметра 78 мм;
- предколонку длиной 300 мм, размером внутреннего диаметра 46 мм, заполненную катионом в гидрогенной форме;
- предколонку длиной 300 мм, размером внутреннего диаметра 46 мм, заполненную анионом в карбонатной форме;
- детектор высокочувствительный рефрактометрический с порогом шума не более 5×10^{-9} единиц рефракции;
- мешалку магнитную;
- насос, способный пропускать раствор со скоростью 0,3—0,6 $см^3$/мин, с пульсацией не более 1 % при давлении на колонку от 1,5 до 4,0 МПа;
- термостат для хроматографических колонок, обеспечивающий поддержание температуры элюента (85 ± 2) °С;
- устройство петлевое для ввода пробы рабочим объемом петли 0,020 $см^3$;
- программу компьютерную для статистической обработки результатов типа «Мультихром», версия 1.5 и выше со встроенным интегратором.

Весы по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,001 г, ± 0,2 мг.

Дозаторы пипеточные переменного объема дозирования в диапазоне 0,040—1,000 $см^3$ с относительной погрешностью дозирования ± 1 %.

Микрошприц для ВЭЖХ вместимостью 0,100 см^3.
Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.
Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919.
Баня ультразвуковая лабораторная рабочим объемом не менее 2 дм^3.
Колбы мерные 1-50-2, 1-100-2, 1-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.
Цилиндры вместимостью 1-50-2, 1-100-2 по ГОСТ 1770.
Пипетки градуированные 1-1-2-10 по ГОСТ 29227.
Пипетки с одним делением 1(2)-2-5, 1(2)-2-10, 2-2-20 по ГОСТ 29169.
Колбы П-1-50-19/26 ТС ($К_н$-1-25-19/26 ТС) по ГОСТ 25336.
Воронки В-56-80 ХС по ГОСТ 25336.
Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.
Прибор для фильтрования стеклянный с фильтром с размером диаметра 0,45 мкм.
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026, фильтры с размером диаметра 12,5 см.
Фильтры мембранные с размером диаметра пор не более 0,5 мкм.
Ацетат цинка двуводный, массовой долей основного вещества не менее 99,999 %.
Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61.
Кислота фосфорновольфрамовая 24-водная.
Образцы стандартные углеводов массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.
Вода для лабораторного анализа первой степени чистоты (бидистиллированная) по ГОСТ Р 52501.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

6 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 13928 и ГОСТ 26809.

7 Подготовка к проведению измерений

7.1 Подготовка стандартного раствора углевода

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 75 мг соответствующего стандартного образца углевода с записью результата до четвертого знака после запятой и растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки.

Срок хранения раствора при температуре от 4 °С до 6 °С — не более 7 сут.

7.2 Реактив для предварительной обработки пробы

(91,00 ± 0,01) г ацетата цинка двуводного, (54,60 ± 0,01) г фосфорновольфрамовой кислоты 24-водной и 58,1 см^3 ледяной уксусной кислоты аккуратно вносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки.

Срок хранения реактива при температуре от 4 °С до 6 °С — не более 10 сут.

7.3 Подготовка градуировочных растворов

Градуировочные растворы, содержащие 250, 500, 750 и 1000 мг углевода на 1000 см^3 обезжиренного пастеризованного молока готовят, добавляя 5, 10, 15 и 20 см^3 соответственно стандартного раствора углевода, подготовленного по 7.1, к обезжиренному пастеризованному молоку, не содержащему данного углевода.

В четыре мерные колбы вместимостью 50 см^3 помещают по 15 см^3 обезжиренного пастеризованного молока.

7.3.1 Градуировочный раствор А, содержащий 250 мг углевода на 1000 см^3 продукта

7.3.1.1 В первую мерную колбу, содержащую 15 см^3 молока, помещают 5 см^3 стандартного раствора углевода (по 7.1) и перемешивают. Мерным цилиндром добавляют 15 см^3 бидистиллированной воды и вновь перемешивают.

7.3.1.2 Затем с помощью пипетки добавляют 5,5 см^3 реактива для предварительной обработки образца по 7.2 и перемешивают. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки и перемешивают. Оставляют на 1 ч при температуре (23 ± 2) °С и фильтруют через бумажный фильтр с размером диаметра 12,5 см, отбрасывая первые 5 см^3 фильтрата.

7.3.2 Градуировочный раствор Б, содержащий 500 мг углевода на 1000 см^3 продукта

Во вторую мерную колбу, содержащую 15 см^3 молока, помещают 10 см^3 стандартного раствора углевода по 7.1 и перемешивают. Добавляют 10 см^3 бидистиллированной воды, используя мерный цилиндр, и перемешивают. Далее — по 7.3.1.2.

7.3.3 Градуировочный раствор В, содержащий 750 мг углевода на 1000 см^3 продукта

В третью мерную колбу, содержащую 15 см^3 молока, помещают 15 см^3 стандартного раствора углевода по 7.1 и перемешивают. Добавляют 5 см^3 бидистиллированной воды, используя мерный цилиндр, и перемешивают. Далее — по 7.3.1.2.

7.3.4 Градуировочный раствор Г, содержащий 1000 мг углевода на 1000 см^3 продукта

В четвертую мерную колбу, содержащую 15 см^3 молока, помещают 20 см^3 стандартного раствора углевода по 7.1 и перемешивают. Добавляют 5 см^3 бидистиллированной воды, используя мерный цилиндр, и перемешивают. Далее — по 7.3.1.2.

7.3.5 Все растворы готовят перед определением.

7.4 Подготовка элюента

Дегазацию растворенного в элюенте воздуха проводят с помощью водоструйного или вакуумного насоса, обрабатывая бидистиллированную воду ультразвуком в течение 30 с при комнатной температуре. По возможности избегают вспенивания элюента.

Элюент готовят в день определения.

7.5 Подготовка анализируемой пробы продукта

7.5.1 Пробу продукта нагревают до температуры (20 ± 2) °С и аккуратно перемешивают. Если жир не растворился, пробу постепенно нагревают до температуры (40 ± 2) °С, аккуратно перемешивают переворачиванием (не допуская вбивания воздуха), и быстро охлаждают до температуры (20 ± 2) °С.

7.5.2 (15.000 ± 0,001) г подготовленной по 7.5.1 пробы помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3. Мерным цилиндром приливают 20 см^3 бидистиллированной воды. Добавляют 5,5 см^3 реактива для предварительной обработки пробы по 7.2 и перемешивают. Объем раствора доводят бидистиллированной водой до метки и перемешивают. Полученный раствор оставляют на 1 ч при температуре (23 ± 2) °С, затем фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 5 см^3 фильтрата.

7.6 Подготовка хроматографа

Установку, включение и подготовку хроматографа к работе выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации прибора.

7.6.1 Условия хроматографирования

- скорость потока — 0,3—0,6 см^3/мин;
- температура — 85,0 °С;
- подвижная фаза: бидистиллированная вода;
- детектор: рефрактометрический.

7.6.2 Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика измеряют площади пиков, соответствующие массовым концентрациям углеводов в градуировочных растворах. Каждый градуировочный раствор хроматографируют не менее трех раз. Измерения выполняют последовательно, начиная с растворов с наименьшей массовой концентрацией определяемого вещества.

Полученные при хроматографировании значения не должны отклоняться от стандартных более чем на 5,00 %.

По полученным данным, используя программные обеспечения к приборам, рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = a\,C_{угр} + b$.

Градуировочный график строят с учетом вычисленных значений уравнения:

$$Y = aC_{угр} + b, \qquad (1)$$

где Y — площадь пика углеводов;

a и b — коэффициенты регрессии;

$C_{угр}$ — массовая концентрация углеводов в градуировочном растворе, мг/см^3.

7.6.3 Градуировку проводят не реже 1 раза в квартал, а также при использовании новой партии реактивов, замене колонок или ремонте хроматографа.

8 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:
- температура окружающего воздуха . . . . . (20 ± 5) °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . (55 ± 25) %;
- атмосферное давление . . . . . (96 ± 10) кПа;
- частота переменного тока . . . . . (50 ± 5) Гц;
- напряжение в сети . . . . . (220 ± 10) В.

Для проведения измерений применяют бидистиллированную воду, которую готовят следующим образом: дистиллированную воду фильтруют через мембранный фильтр (размер диаметра пор не более 0,5 мкм), затем кипятят для удаления растворенного воздуха и охлаждают до комнатной температуры.

9 Проведение измерений

9.1 Дегазация анализируемой пробы

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают 3 см^3 фильтрата по 7.5. Дегазацию растворенного в фильтрате воздуха проводят с помощью вакуумного насоса, обрабатывая ультразвуком в течение 30 с при комнатной температуре. По возможности избегают вспенивания.

9.2 В инжектор хроматографа вводят от 0,01 до 0,03 см^3 тщательно отмеренного дегазированного фильтрата со скоростью потока 0,3—0,6 см^3/мин.

Плоттер выбирают так, чтобы минимальная высота пика углевода составляла около 5 мм для градуировочного раствора А.

10 Обработка результатов измерений

Массовую концентрацию углеводов в анализируемой пробе продукта C, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$C = \frac{V_1 C_3}{V_2}, \qquad (2)$$

где V_1 — объем анализируемой пробы после разбавления по 7.5, см^3;

C_3 — концентрация углевода, рассчитанная по градуировочному графику (7.6.2), мг/дм^3;

V_2 — объем анализируемой пробы, взятый для анализа по 9.2, см^3.

Вычисления проводят до второго десятичного знака. За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости по разделу 11.

Окончательный результат округляют до первого десятичного знака.

11 Контроль точности результатов измерений

11.1 Метрологические характеристики метода определения массовой концентрации моно- и дисахаридов

Приписанные характеристики погрешности и ее составляющих метода определения массовой концентрации моно- и дисахаридов при P = 0,95 приведены в таблице 1.

Таблица 1

Диапазон измерений массовой концентрации углеводов, мг/дм^3	Предел повторяемости $r_{отн.}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн.}$, %	Границы относительной погрешности ± δ, %
От 50,0 до 1000,0 вкл.	12	23	16
Св. 1000,0 до 10000,0	9	17	12

11.2 Проверка приемлемости результатов определений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов определений массовой концентрации моно- и дисахаридов, полученных в условиях повторяемости (два параллельных определения, $n = 2$), проводят с учетом требований ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

Результаты измерений считаются приемлемыми при условии:

$$|X_1 - X_2| \le r_{отн} \cdot 0{,}01 X_{ср},$$

где X_1, X_2 — значения двух параллельных определений, полученных в условиях повторяемости, мг/дм^3;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, мг/дм^3;

$r_{отн}$ — пределы повторяемости (сходимости), значения которых приведены в таблице 1, %.

Если данное условие не выполняется, то проводят повторное определение и проверку приемлемости результатов определений в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

11.3 Проверка приемлемости результатов определения, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов определений массовой концентрации моно- и дисахаридов, полученных в условиях воспроизводимости (в двух лабораториях, $m = 2$), проводят с учетом требований ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.2.1).

Результаты определений, выполненные в условиях воспроизводимости, считаются приемлемыми при условии:

$$|X_1' - X_2'| \le R_{отн} \cdot 0{,}01 X_{ср},$$

где X_1', X_2' — результаты определений, полученные в двух лабораториях в условиях воспроизводимости, мг/дм^3;

$R_{отн}$ — пределы воспроизводимости, значения которых приведены в таблице 1 %;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм^3.

Если данное условие не выполняется, то процедуры повторяют в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

12 Оформление результатов

Результат измерений массовой концентрации моно- и дисахаридов в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$X_{ср} \pm \delta \cdot 0{,}01 X_{ср}, \text{ при } P = 0{,}95,$$

где δ — границы относительной погрешности измерений, % (таблица 1);

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, мг/дм^3.

13 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.007;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с требованиями ГОСТ Р 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.009.

Приложение А
(справочное)

Пример хроматограммы определения массовой концентрации моно- и дисахаридов в молочном продукте

А.1 Пример хроматограммы определения массовой концентрации моно- и дисахаридов в молочном продукте приведен на рисунке А.1.

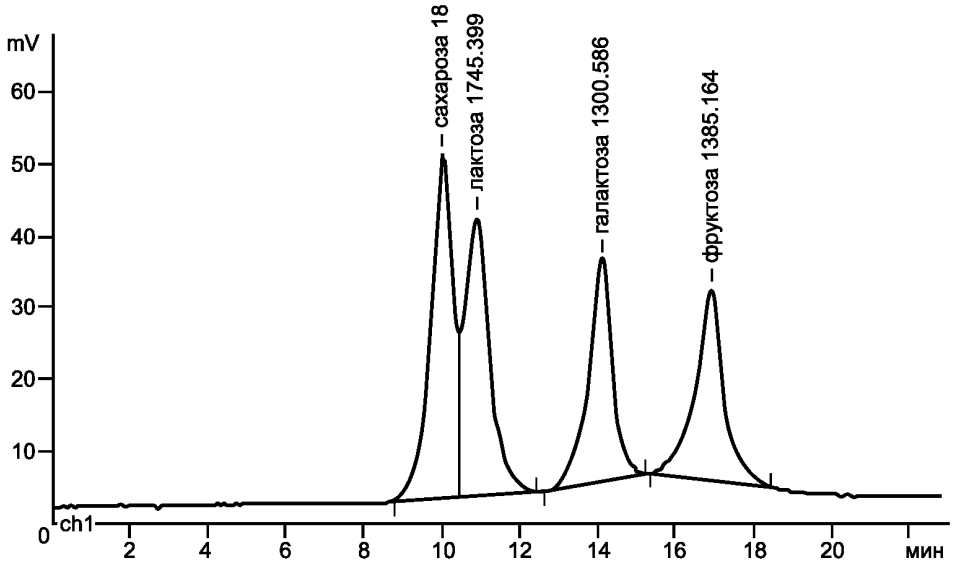

Рисунок А.1

Библиография

[1] Федеральный закон от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» (с изменением)

УДК 637.12.04/07:576.8:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: продукты молочные составные, продукты детского питания на молочной основе, хроматограф, высокоэффективная жидкостная хроматография, элюент, детектор, моно- и дисахариды, термины и определения, сущность метода, отбор проб, подготовка к проведению измерений, условия проведения измерений, проведение измерения, обработка результатов измерений, контроль точности результатов измерений, оформление результатов, требования, обеспечивающие безопасность

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

Сдано в набор 23.08.2012. Подписано в печать 05.09.2012. Формат 60x84 1/8. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 1,40.
Уч.-изд. л. 0,95. Тираж 221 экз. Зак. 757.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru