ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ГОСТ Р 54684— 2011**

# ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

## Определение органических кислот методом обращенно-фазовой 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 Некоммерческой организацией «Российский союз производителей соков» (РСПС) при участии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт питания» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИ питания» РАМН) и Закрытого акционерного общества «Мултон» (ЗАО «Мултон»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки фруктов, овощей и грибов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 843-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

## Содержание

1 Область применения . . . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . . . 1
3 Сущность метода . . . . . 2
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы . . . . . 2
5 Отбор проб . . . . . 4
6 Подготовка к проведению измерений . . . . . 4
7 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии . . . . . 6
8 Обработка и оформление результатов определений . . . . . 7
9 Контроль точности результатов определений . . . . . 10
10 Требования, обеспечивающие безопасность . . . . . 10
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм органических кислот . . . . . 12

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ**

# Определение органических кислот методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products. Determination of organic acids by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC)

**Дата введения — 2013—01—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары, морсы и сокосодержащие напитки, фруктовые и овощные концентрированные соки, пюре и концентрированные пюре, морсы и концентрированные морсы, соковую продукцию из фруктов и овощей обогащенную и для детского питания (далее — соковая продукция) и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения массовой концентрации или массовой доли суммы свободных форм и солей следующих органических кислот: щавелевой, винной, хинной, яблочной, изолимонной, лимонной, молочной, шикимовой, янтарной и фумаровой в диапазонах измерений, приведенных в таблице 6. Органические кислоты, имеющие оптические изомеры, детектируются в виде суммы их энантиомеров (D- и L-форм). Измерение отдельных форм оптических изомеров не входит в область применения настоящего стандарта.

## 2 Нормативные ссылки

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

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

ГОСТ Р 53693—2009 Продукция соковая. Определение аскорбиновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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

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

ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 908—2004 Кислота лимонная моногидрат пищевая. Технические условия

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

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

**Издание официальное**

ГОСТ 6552—80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия
ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 21400—75 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний.
ГОСТ 22967—90 (СТ СЭВ 2486—80, СТ СЭВ 3399—81) 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—84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

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 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 Сущность метода

Метод основан на применении обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Массовая концентрация (массовая доля) органических кислот в соковой продукции определяется спектрофотометрическим или диодноматричным детектором при длине волны 210 нм.

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

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

4.2 Детектор спектрофотометрический, позволяющий проводить измерения оптической плотности при длине волны 210 нм с проточной кюветой рабочим объемом не более 20 мм$^3$ со следующими метрологическими характеристиками:

| Относительное среднее квадратичное отклонение, % | | | |
|---|---|---|---|
| По площади пика | По высоте пика | По времени удерживания | По площади пика за 8 ч непрерывной работы |
| 5 | 5 | 1 | 5 |

или диодноматричный детектор с метрологическими характеристиками:

| Технические характеристики | | | Метрологические характеристики | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Относительное среднее квадратичное отклонение выходных сигналов, % | | Относительное изменение выходного сигнала за 8 ч непрерывной работы, % | |
| Значение уровня флуктуационных шумов | Значение дрейфа нулевого сигнала | Предел детектирования | Время удерживания | Площадь пика | Время удерживания | Площадь пика |
| $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ | $1{,}5 \cdot 10^{-3}$/ч | $1{,}5 \cdot 10^{-10}$ г/см$^3$ | 0,3 | 1,0 | 2,0 | 2,0 |

4.3 Колонки хроматографические:

- колонка аналитическая длиной 250 мм и размером внутреннего диаметра 4,6 мм, заполненная силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом (RP или С18), с размером частиц 5 мкм[1)];

- колонка аналитическая длиной 300 мм и размером внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем, с привитыми группами С18, с блокированными остаточными силанольными группами (энд-кэппинг), привитыми дополнительно полярными группами С3 (замещенный аминопропил), с размером частиц 5 мкм[2)].

4.4 Посуда мерная лабораторная стеклянная по ГОСТ 1770:

- цилиндры 1-50-2 и 1-1000-2;
- колбы мерные 4-25-2, 4-50-2, 4-100-2, 4-500-2 и 4-1000-2;
- пробирки 1-10-0,1 ХС и 1-20-0,1 ХС.

4.5 Емкости для жидких проб (виалы) вместимостью 2—6 $см^3$.

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

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

4.8 Фильтры мембранные с размером диаметра пор 0,20 и 0,45 мкм для фильтрования подвижной фазы и проб.

4.9 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

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

4.10 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.11 Шприц медицинский вместимостью 5 $см^3$ по ГОСТ 22967.

4.12 Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (g-фактор) 800—1000.

4.13 Магнитная мешалка ММ-01 лабораторная.

4.14 Иономер (pH-метр) с погрешностью измерения ± 0,01 ед. pH.

4.15 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.16 Калий фосфорнокислый двузамещенный (дигидрофосфат) $KH_2PO_4$, безводный.

4.17 Калий фосфорнокислый двузамещенный (дигидрофосфат) $KH_2PO_4 \times 3H_2O$ по ГОСТ 2493.

4.18 Кислота ортофосфорная массовой долей основного вещества 98 %, ч. д. а., по ГОСТ 6552.

4.19 Ацетонитрил, ч. д. а.

4.20 Моногидрат лимонной кислоты массовой долей основного вещества 99,5 %, ч. д. а., по ГОСТ 908.

4.21 Органические кислоты:

- винная кислота массовой долей основного вещества не менее 99,5 %, ч. д. а., или по [1];
- хинная кислота массовой долей основного вещества не менее 98,0 %, ч. д. а., или по [1];
- шикимовая кислота массовой долей основного вещества не менее 97,0 %, ч. д. а., или по [1];
- L-молочная кислота массовой долей основного вещества не менее 90,5 %, ч. д. а., или по [1];
- D,L-изолимонной кислоты тринатриевая соль массовой долей основного вещества не менее 93,0 %, ч. д. а., или по [1];
- фумаровая кислота массовой долей основного вещества не менее 99,5 %, ч. д. а., или по [1];
- яблочная кислота массовой долей основного вещества не менее 99,5 %, ч. д. а., или по [1];
- кислота щавелевая, 2-водная массовой долей основного вещества не менее 99,0 %, ч. д. а., или по [1];
- кислота янтарная массовой долей основного вещества не менее 99,0 %, ч. д. а., или по [1].

4.22 Весы по ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность однократного взвешивания с пределами абсолютной допускаемой погрешности не более ± 0,08 мг.

Допускается применение средств измерений и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

---

[1)] Сорбенты марок «Phenomenex Luna (2)», «Atlantis dC18» апробированы и обеспечивают требуемую эффективность хроматографического разделения. Данная информация не является рекламой указанных сорбентов и не исключает возможность применения других сорбентов.

[2)] Сорбент марок «Allure Organic acids» апробирован и обеспечивает требуемую эффективность хроматографического разделения. Данная информация не является рекламой указанного сорбента и не исключает возможность применения других сорбентов.

## 5 Отбор проб

5.1 Отбор проб — по ГОСТ 26313.

## 6 Подготовка к проведению измерений

### 6.1 Приготовление подвижной фазы для жидкостной хроматографии

Для приготовления фосфатного буферного раствора молярной концентрации 0,1 моль/дм$^3$ 13,6 г дигидрофосфата калия безводного по 4.16 или 3-водного дигидрофосфата калия по 4.17, в пересчете на безводный, помещают в коническую колбу по 4.9 вместимостью 1000 см$^3$ и растворяют в дистиллированной воде при перемешивании на магнитной мешалке по 4.13. Затем доводят кислотность полученного раствора до значения 2,2—2,6 ед. pH, прибавляя по каплям концентрированную ортофосфорную кислоту по 4.18 при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке по 4.13.

Готовый буферный раствор переносят в мерную колбу по 4.4 вместимостью 1000 см$^3$, доводят до метки и тщательно перемешивают. Полученный раствор отфильтровывают и дегазируют на установке 4.6 через мембранный фильтр с размером диаметра пор 0,45 мкм.

Срок хранения готового буферного раствора при комнатной температуре — 3 сут.

### 6.2 Подготовка проб для измерений

Подготовка проб для измерений — в соответствии с ГОСТ Р 53693 (подраздел 6.2).

### 6.3 Приготовление стандартных градуировочных растворов органических кислот

Приготовление стандартных градуировочных растворов анализируемого ряда органических кислот делят на три группы в соответствии с диапазоном определяемых кислот, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 — Группы стандартных градуировочных растворов

| Группы органических кислот | Анализируемая органическая кислота | Массовая концентрация (массовая доля), г/дм$^3$ (‰) |
|---|---|---|
| Группа А | Винная | 0,10—15,00 |
| | Хинная | 0,10—10,00 |
| | Яблочная | 0,10—25,00 |
| | Лимонная | 0,10—50,00 |
| Группа Б | Щавелевая кислота | 0,05—1,00 |
| | Изолимонная кислота | 0,05—0,50 |
| | Молочная кислота | 0,05—1,00 |
| | Янтарная кислота | 0,05—1,00 |
| Группа В | Шикимовая | 0,05—10,00 |
| | Фумаровая | 0,005—0,50 |

#### 6.3.1 Приготовление основных стандартных градуировочных растворов органических кислот группы А

##### 6.3.1.1 Приготовление основного стандартного раствора № 1А

Взвешивают на лабораторных весах по 1,25 г лимонной, яблочной, хинной и винной кислот с точностью до второго десятичного знака, растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 250 см$^3$.

Массовая концентрация полученного основного стандартного раствора кислот 1А составляет 5,0 г/дм$^3$.

#### 6.3.2 Приготовление основных стандартных градуировочных растворов органических кислот групп Б и В

##### 6.3.2.1 Приготовление основных стандартных растворов № 1Б и № 1В

Взвешивают на лабораторных весах по 0,25 г щавелевой, изолимонной, молочной и янтарной кислот (с точностью до второго десятичного знака), а по 0,025 г шикимовой и фумаровой кислот (с точностью до третьего десятичного знака), а растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе объемом 250 см$^3$.

Массовая концентрация полученных основных стандартных растворов 1Б (щавелевой, изолимонной, молочной, янтарной кислот) составляет по 1,0 г/дм$^3$, а растворов 1В (шикимовой и фумаровой кислот) — по 0,1 г/дм$^3$ соответственно.

Основные стандартные градуировочные растворы хранят при температуре от 2 °С до 6 °С в течение одного месяца.

**6.3.3 Приготовление стандартных градуировочных растворов органических кислот**

Стандартные градуировочные растворы органических кислот готовят для одновременного построения четырех градуировочных зависимостей по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации (массовой доли) определяемой кислоты к большей, из основного стандартного раствора по 6.3.1.1 и 6.3.2.1 в соответствии с таблицами 2—4.

Стандартные градуировочные растворы органических кислот готовят непосредственно перед проведением измерений.

Таблица 2 — Приготовление стандартных градуировочных растворов группы А

| № стандартного раствора | Наименование органической кислоты группы А | Способ приготовления | Массовая концентрация (массовая доля), г/дм$^3$ (‰) |
|---|---|---|---|
| № 1А — основной | Хинная, винная, лимонная, яблочная | 1,25 г органической кислоты растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе объемом 250 см$^3$ | 5,0 |
| № 2А | Хинная, винная, лимонная, яблочная | 125 см$^3$ раствора № 1А помещают в мерную колбу объемом 250 см$^3$, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают | 2,5 |
| № 3А | Хинная, винная, лимонная, яблочная | 40 см$^3$ раствора № 2А помещают в мерную колбу объемом 100 см$^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают | 1,0 |
| № 4А | Хинная, винная, лимонная, яблочная | 20 см$^3$ раствора № 3А помещают в мерную колбу объемом 100 см$^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают | 0,2 |

Таблица 3 — Приготовление стандартных градуировочных растворов группы Б

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

Таблица 4 — Приготовление стандартных градуировочных растворов группы В

| № стандартного раствора | Наименование органической кислоты группы В | Способ приготовления | Массовая концентрация (массовая доля), г/дм$^3$ (‰) |
|---|---|---|---|
| № 1В — основной | Шикимовая, фумаровая | 0,025 г кислоты растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 250 см$^3$ | 0,1 |
| № 2В | Шикимовая, фумаровая | 125 см$^3$ раствора № 1Б помещают в мерную колбу на 250 см$^3$, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают | 0,05 |
| № 3В | Шикимовая, фумаровая | 20 см$^3$ раствора № 2Б помещают в мерную колбу на 100 см$^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают | 0,01 |
| № 4В | Шикимовая, фумаровая | 20 см$^3$ раствора № 3Б помещают в мерную колбу на 100 см$^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают | 0,002 |

### 6.4 Построение градуировочной зависимости

Процедуры построения градуировочной зависимости выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования и руководством пользователя программным обеспечением.

Хроматограммы обрабатывают в соответствии с руководством пользователя программно-аппаратным комплексом сбора и обработки данных.

Регистрируется площадь пиков соответствующих кислот. Площадь пиков рассматриваемых кислот стандартных растворов $S$ (mAU · с или AU · с) и их массовая концентрация (массовая доля) $\overline{c}_i$, г/дм$^3$ (‰), находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c_i = \frac{S_i}{k}, \tag{1}$$

где $k$ — градуировочный коэффициент, mAU · с/г/дм$^3$.

Градуировочные коэффициенты $k$ рассчитывают по результатам анализа стандартных растворов с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных или при его отсутствии в составе хроматографа по методу наименьших квадратов, полагая свободный член в уравнении регрессии равным нулю:

$$k = \frac{\Sigma(S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \tag{2}$$

где $S_i$ — площадь пика соответствующей кислоты при анализе $i$-го стандартного раствора;

$c_i$ — массовая концентрация (массовая доля) кислоты при анализе $i$-го стандартного раствора, г/дм$^3$ (‰).

Градуировочная зависимость строится при смене оборудования, колонок, условий хроматографического анализа или при выявлении несоответствия метрологическим требованиям результатов оперативного контроля или внутреннего аудита.

Проверку градуировочной зависимости по стандартным растворам, соответствующим двум точкам диапазона измерений, проводят в день выполнения анализов перед началом работ. В случае обнаружения отклонения результатов измерения массовой концентрации (массовой доли) кислот в стандартных растворах более чем на 3,2 % строят новую градуировочную зависимость во всем диапазоне измерений.

## 7 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

### 7.1 Условия хроматографического анализа

Элюент: фосфатный буферный раствор молярной концентрации 0,1 моль/дм$^3$ с 2,2—2,6 ед. pH по 6.1.

Температура колонки: 20 °С или температура окружающего воздуха (25 ± 5) °С.

Длина волны спектрофотометрического детектора: 210 нм.

Диапазон длин волн диодноматричного детектора: 200—600 нм.

Скорость потока подачи элюента: 0,8—1 $см^3$/мин (ориентировочное значение).

Объем вводимой пробы: 5—10 мкл.

Время выхода органических кислот при ВЭЖХ характеризуется коэффициентом емкости $K'$, который не зависит от скорости подачи элюента. Коэффициенты емкости рассчитывают по формуле

$$k' = (t_R - t_0)/t_0,$$

где $t_R$ — время удерживания аналита, мин,

$t_0$ — мертвый объем колонки, мин.

Примерные значения коэффициентов емкости основных органических кислот, определяемых в соковой продукции, представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Коэффициенты емкости основных органических кислот

| Наименование кислоты | $K'$ | Наименование кислоты | $K'$ |
|---|---|---|---|
| Щавелевая | 0,14 | Шикимовая | 0,96 |
| Винная | 0,20 | Молочная | 1,20 |
| Хинная | 0,30 | Лимонная | 2,68 |
| Яблочная | 0,71 | Янтарная | 2,92 |
| Изолимонная | 0,81 | Фумаровая | 3,04 |

Примечание — Вводимые объемы стандартного градуировочного раствора при градуировке и анализируемой пробы должны быть одинаковыми.

### 7.2 Условия проведения измерений

Измерения проводят при следующих лабораторных условиях:

- температура окружающего воздуха (25 ± 5) °С;
- атмосферное давление (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность (65 ± 15) %;
- частота переменного тока (50 ± 5)Гц;
- напряжение в сети (220 ± 10) В.

### 7.3 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ проб, подготовленных по 6.2. Анализ проводят на двух параллельных пробах при соблюдении всех остальных условий повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1 (подраздел 3.14). Регистрируют площадь пиков органических кислот. В случае если массовая концентрация (массовая доля) органической кислоты в пробе настолько максимальна, что площадь соответствующего пика выходит за верхнюю границу диапазона градуировки хроматографа, то подготавливают новую пробу с другим разбавлением и измерение повторяют.

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

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

Хроматографическая система должна обеспечивать удовлетворительное разделение основных пиков.

Примеры хроматограмм основных органических кислот приведены в приложении А.

## 8 Обработка и оформление результатов определений

Массовую концентрацию (массовую долю) органических кислот рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения пробы. Вычисления массовой концентрации или массовой доли проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и определение массовой концентрации (массовой доли) определяемой органической кислоты $c(X)$, г/дм$^3$ (‰), проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1} \quad \text{или} \quad c(X) = \frac{S_x \cdot m_{общ}}{k \cdot m(x)}, \tag{3}$$

или по формулам с использованием стандартного раствора с массовой концентрацией (массовой долей) определяемой органической кислоты, наиболее близкой к ожидаемой в анализируемой пробе:

$$c(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1} \quad \text{или} \quad c(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot m_{общ}}{S_{ст} \cdot m(x)}, \tag{4}$$

где $S_x$ — площадь пика органической кислоты, mAU · с или U · с;

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

$k$ — градуировочный коэффициент, [г/дм$^3$/mAU · с]$^{-1}$;

$V_1$ — объем пробы, отобранный для анализа, см$^3$;

$m_{общ}$ — масса анализируемой пробы после разбавления, г;

$m(x)$ — масса анализируемой пробы до разбавления, г;

$c_{ст}$ — массовая концентрация или массовая доля органической кислоты в стандартном растворе, г/дм$^3$ (‰);

$S_{ст}$ — площадь пика органической кислоты в стандартном растворе, mAU · с или U · с.

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

Расхождение результатов между двумя параллельными определениями (в процентах от среднего значения), выполненными в условиях повторяемости, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, приведенного в таблицах 7—9, при вероятности $P = 0,95$.

При соблюдении этого условия за окончательный результат определения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений $X_{ср}$, округленное до второго десятичного знака, при определении фумаровой кислоты в диапазоне измерений от 0,001 до 0,010 мг/дм$^3$ за окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, округленное до третьего десятичного знака.

Диапазоны измерений массовой концентрации или массовой доли органических кислот в соковой продукции приведены в таблице 6.

Таблица 6 — Диапазоны измерений массовой концентрации (массовой доли) органических кислот в соковой продукции

| Анализируемая органическая кислота | Массовая концентрация (массовая доля), г/дм$^3$ (‰) | Анализируемая органическая кислота | Массовая концентрация (массовая доля), г/дм$^3$ (‰) |
|---|---|---|---|
| Щавелевая | 0,05—1,00 | Лимонная | 0,10—50,00 |
| Винная | 0,10—15,00 | Шикимовая | 0,05—10,00 |
| Хинная | 0,10—10,00 | Молочная | 0,05—1,00 |
| Яблочная | 0,10—25,00 | Янтарная | 0,05—1,00 |
| Изолимонная* | 0,05—0,50 | Фумаровая | 0,005—0,500 |
| * При низких значениях массовой концентрации (массовой доли) изолимонной кислоты в соковой продукции (менее 0,2 г/дм$^3$) для более точного определения отношения концентраций лимонной и изолимонной кислоты могут применяться другие (в том числе ферментативные) методы определения. | | | |

Границы относительной погрешности определения массовой концентрации (массовой доли) анализируемых кислот при соблюдении условий, регламентированных настоящей методикой, при вероятности $P = 0,95$ не должны превышать значений, приведенных в таблицах 7—9.

Расхождение между двумя результатами измерений (в процентах среднего значения), полученными в условиях воспроизводимости, не должно превышать предела воспроизводимости $R_{отн}$, приведенного в таблицах 7—9 при $P$ = 0,95.

Таблица 7 — Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации (массовой доли) органических кислот: яблочной, лимонной, винной, хинной при $P$ = 0,95.

| Наименование показателя | Значение показателя при диапазонах измерений массовой концентрации (массовой доли), г/дм$^3$ (‰) | | |
|---|---|---|---|
| | От 0,10 до 0,50 включ. | Св. 0,50 до 5,00 включ. | Св. 5,00 до 50,00 включ. |
| Предел повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, % | 12 | 10 | 7 |
| Предел воспроизводимости $R_{отн}$, % | 18 | 17 | 13 |
| Границы относительной погрешности $\pm\,\delta$, % | 13 | 12 | 10 |

Таблица 8 — Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации (массовой доли) органических кислот: щавелевой, изолимонной, молочной, янтарной при $P$ = 0,95

| Наименование показателя | Значение показателя при диапазонах измерений массовой концентрации (массовой доли), г/дм$^3$ (‰) | | |
|---|---|---|---|
| | От 0,05 до 0,10 включ. | Св. 0,10 до 0,50 включ. | Св. 0,50 до 1,00 включ. |
| Предел повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, % | 15 | 12 | 10 |
| Предел воспроизводимости $R_{отн}$, % | 26 | 18 | 17 |
| Границы относительной погрешности $\pm\,\delta$, % | 19 | 13 | 12 |

Таблица 9 — Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации или массовой доли органических кислот: шикимовой, фумаровой при $P$ = 0,95

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

Окончательный результат определения массовой концентрации или массовой доли органической кислоты представляют в следующем виде

$$X_{ср} \pm \Delta, \qquad (5)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений массовой концентрации или массовой доли органической кислоты, г/дм$^3$ или ‰;

$\Delta$ — границы абсолютной погрешности определений массовой концентрации или массовой доли органической кислоты, г/дм$^3$ или ‰, рассчитанные по формуле

$$\Delta = \frac{\delta \cdot X_{ср}}{100}, \qquad (6)$$

где $\delta$ — границы относительной погрешности в соответствии с таблицами 7—9.

## 9 Контроль точности результатов определений

### 9.1 Контроль повторяемости (сходимости) результатов определений

Контроль повторяемости (сходимости) результатов определений проводят при получении каждого результата определения путем сравнения расхождения между результатами двух параллельных определений с пределом повторяемости (сходимости), приведенным в таблицах 7—9.

Сходимость результатов определения признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01\, r_{отн} X_{ср}. \quad (8)$$

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

### 9.2 Контроль погрешности (точности) результатов определений

Контроль погрешности (точности) результатов определений осуществляют методом добавок с использованием реальных проб продукции. Масса пробы должна соответствовать удвоенному количеству, необходимому для проведения определения. Пробу делят на две равные части. В одну из них добавляют стандарты органических кислот, в таких количествах, чтобы добавка составляла 50 %—150 % исходного содержания компонента в пробе, но не превышала верхней границы диапазона определения массовой концентрации (массовой доли) компонента с учетом границ погрешности определения (таблицы 7—9). Обе части пробы анализируют в точном соответствии с методом.

Результаты контрольных определений признают удовлетворительными, если погрешность определения массовых концентраций (массовых долей) кислот в добавке не превышает норматива контроля погрешности (точности), то есть выполняется условие

$$|X_{доб} - X_{ср} - c_{доб}| \le K_{доб}, \quad (8)$$

где $X_{доб}$ — среднеарифметическое значение двух параллельных определений пробы с добавкой, г/дм$^3$ или ‰;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение двух параллельных определений пробы без добавки, г/дм$^3$ или ‰;

$c_{доб}$ — величина добавки, г/дм$^3$ или ‰;

$K_{доб}$ — норматив контроля погрешности, г/дм$^3$ или ‰.

При проведении внутрилабораторного контроля ($P$ = 0,95) значение $K_{доб}$ рассчитывают по формуле

$$K_{доб} = 0{,}84 \cdot \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + X_{ср}^2}. \quad (9)$$

При проведении внешнего контроля ($P$ = 0,95) значение $K_{доб}$ рассчитывают по формуле

$$K_{доб} = \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + X_{ср}^2}, \quad (10)$$

где $\delta$ — границы относительной погрешности определения массовых концентраций кислот, указанные в таблицах 7—9, %.

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

Периодичность контроля погрешности (точности) устанавливается самой лабораторией с учетом фактического состояния работ. При смене партий реактивов, экземпляров средств измерений и стандартов проведение контроля погрешности обязательно.

## 10 Требования, обеспечивающие безопасность

### 10.1 Условия безопасного проведения работ

При работе с химическими реактивами следует соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами, по ГОСТ 12.1.005 и

ГОСТ 12.1.007. При подготовке проб к анализу и выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила пожаровзрывобезопасности по ГОСТ 12.1.018, электробезопасности — по ГОСТ Р 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

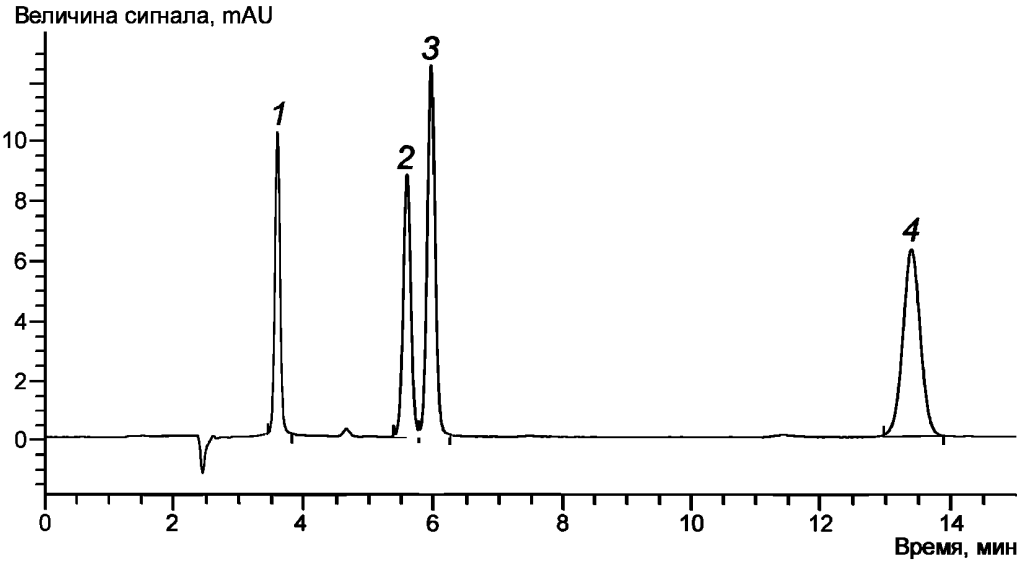
### 10.2 Требования к квалификации операторов

К выполнению испытаний и обработке результатов допускается инженер-химик, техник или лаборант, имеющий высшее или специальное образование, опыт работы в химической лаборатории и изучивший 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)**

## Примеры хроматограмм органических кислот

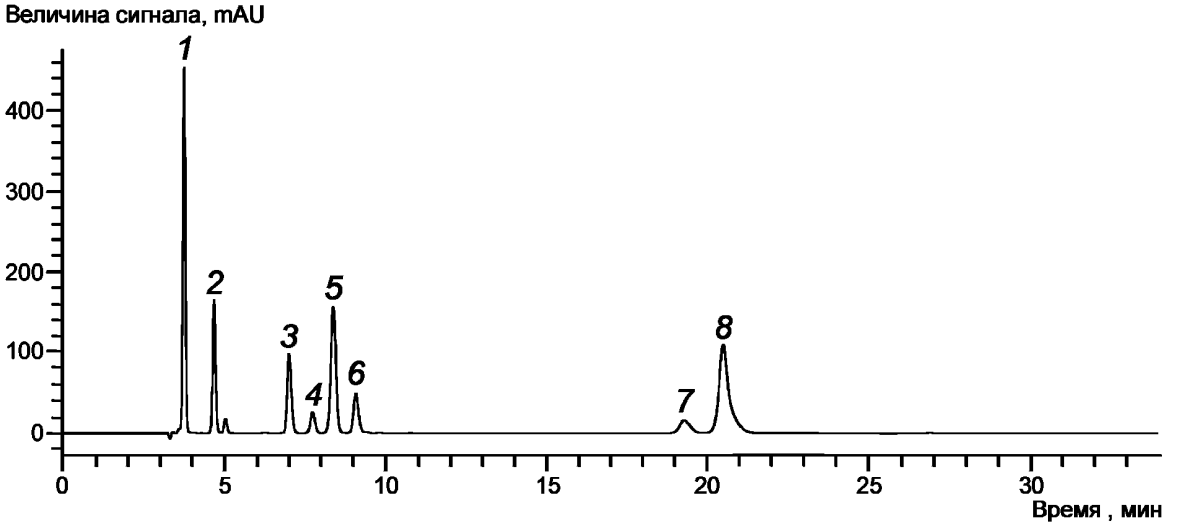
А.1 Примеры хроматограмм органических кислот приведены на рисунках А.1—А.3.




*1* — хинная кислота; *2* — изолимонная кислота; *3* — молочная кислота; *4* — лимонная кислота

Рисунок А.1 — Хроматограмма стандартного раствора модельной смеси органических кислот

Условия хроматографирования: 0,1М фосфатный буфер, 2,4 ед. pH, скорость элюирования 1,0 мл/мин.




*1* — винная; *2* — хинная; *3* — яблочная; *4* — шикимовая; *5* — изолимонная; *6* — молочная; *7* — лимонная; *8* — фумаровая

Рисунок А.2 — Хроматограмма стандартного раствора модельной смеси органических кислот

Условия хроматографирования: 0,2 М фосфатный буфер = 2,2 ед. pH.

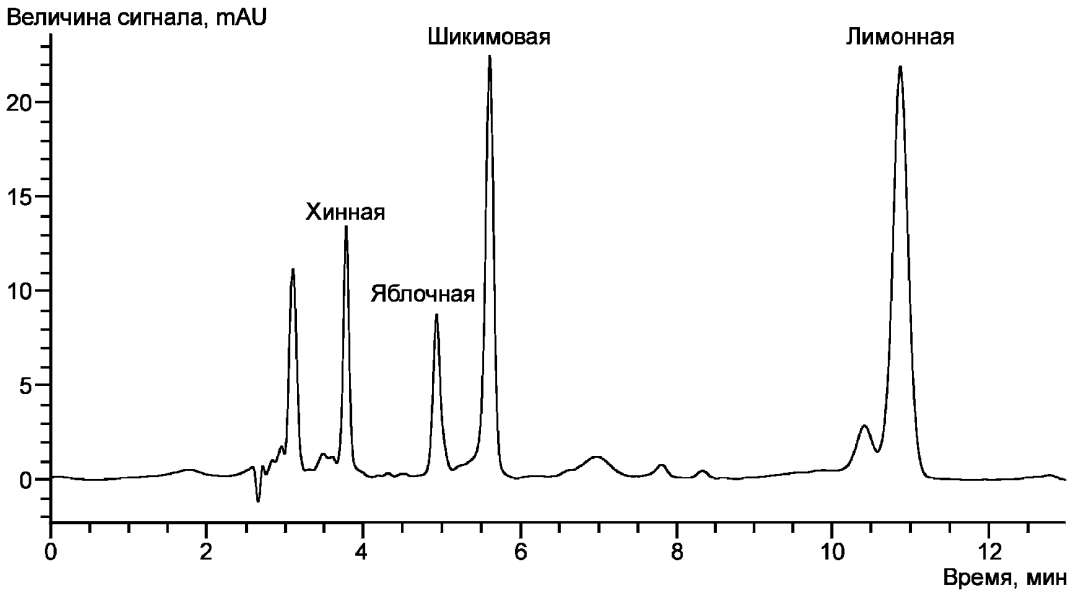



Рисунок А.3 — Хроматограмма сока черники

Массовая концентрация кислот на хроматограмме: хинная — 1,2 мг/см$^3$, яблочная — 0,8 мг/см$^3$ , шикимовая — 1,8 мг/см$^3$, лимонная — 2,1 мг/см$^3$.

## Библиография

[1] — каталожные номера:

| Название кислот | Каталог | Номер |
|---|---|---|
| Винная кислота | Aldrich | 25.138-0 |
| Хинная кислота | Aldrich | 13.862-2 |
| Шикимовая кислота | Sigma | S 5375 |
| L-молочная кислота | Fluka | 19.925-7 |
| D,L-изолимонной кислоты тринатриевая соль | Aldrich | 22.008-6 |
| Фумаровая кислота | Aldrich | F1.935-3 |
| Яблочная кислота | Aldrich | 12.241-6 |
| Кислота щавелевая 2-водная | Aldrich | 194131 |
| Кислота янтарная | Fluka | 14079 |

УДК 664.863.001.4:006.354 ОКС 67.050, 67.080 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: соковая продукция; определение; высокоэффективная жидкостная хроматография; стандартный раствор; градуировочные растворы; массовая концентрация органических кислот; массовая доля, подготовка к проведению измерения; проведение измерения; предел повторяемости; граница относительной погрешности; требования; обеспечивающие безопасность

Редактор *Е.В. Никулина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 12.09.2012. Подписано в печать 25.10.2012. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 201 экз. Зак. 939.

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