ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53694— 2009

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение 5-гидроксиметилфурфурола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

БЗ 12—2009/986

Москва
Стандартинформ
2010

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» (НО «РСПС») при участии НИИ питания Российской Академии медицинских наук (НИИ питания РАМН), Закрытого акционерного общества «Мултон» и ВНИИ консервной и овощесушильной промышленности (ГНУ «ВНИИКОП»)

2 ВНЕСЕН Подкомитетом «Соки фруктовые и овощные, нектары, сокосодержащие напитки и морсы» Технического комитета 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 15 декабря 2009 г. № 1094-ст

4 В настоящем стандарте учтены основные положения международного стандарта CODEX-STAN 247—2005 «Общий стандарт на фруктовые соки и нектары» (CODEX-STAN 247—2005 «Codex general standard for fruit juices and nectars») в части методов анализа и отбора проб соковой продукции;

основные нормативные положения документа IFU «Метод 69 (Rev. 2005) "Определение гидроксиметилфурфурола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии" (Международная федерация производителей фруктовых соков) [IFU Analyses No. 69 (Rev. 2005) «Determination of Hydroxymethylfurfural (HPLC)» (International Federation of Fruit Juice Produces)]

5 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, 2010

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 определения . . . 2
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы, реактивы . . . 2
5 Отбор и подготовка проб . . . 3
6 Подготовка к проведению определения . . . 3
7 Выполнение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии . . . 6
8 Обработка и оформление результатов определения . . . 7
9 Контроль точности результатов определения . . . 8
10 Требования безопасности . . . 9
Приложение А (справочное) Хроматограмма 5-гидроксиметилфурфурола в пробе концентрированного яблочного сока . . . 10
Библиография . . . 11

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение 5-гидроксиметилфурфурола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products.
Determination of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method

Дата введения — 2011—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки и нектары, концентрированные соки, пюре и концентрированные пюре, морсы и концентрированные морсы, сокосодержащие напитки, 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 5-гидроксиметилфурфурола (5-ГМФ).

Нижний предел измерений массовой концентрации (массовой доли) 5-гидроксиметилфурфурола составляет 1 мг/дм^3 (млн$^{-1}$). Верхний предел измерений массовой концентрации (массовой доли) 50 мг/дм^3 (млн$^{-1}$).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

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

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 12.1.010—76 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

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

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

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) 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 18270—72 Кислота уксусная особой чистоты. Технические условия

ГОСТ 22967—90 (СТ СЭВ 2486—80, СТ СЭВ 3399—82) Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

Издание официальное

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

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

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

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, а также 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 определения

Метод основан на применении обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Массовую концентрацию или массовую долю 5-гидроксиметилфурфурола в соковой продукции определяют спектрофотометрическим детектором в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 284 нм.

5-гидроксиметилфурфурол является продуктом превращения фруктозы и сахарозы при нагревании в кислой среде. Превышение содержания 5-гидроксиметилфурфурола установленных для него норм в соковой продукции свидетельствует о несоблюдении режимов ее тепловой обработки при концентрировании и/или пастеризации (стерилизации).

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

4.1 Хроматограф жидкостный высокоэффективный со спектрофотометрическим детектором (рабочий диапазон длин волн поглощения от 200 до 600 нм) и программно-аппаратным комплексом сбора и обработки данных типа «Millenium 2000».

4.2 Спектрофотометр со значениями характеристик не ниже следующих:

спектральный рабочий диапазон — 200—800 нм;

пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений по шкале длин волн $\pm 0{,}2$ нм;

пределы допускаемой воспроизводимости измерений по шкале длин волн $\pm 0{,}08$ нм ($\lambda = 656$ нм);

пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений по фотометрической шкале $\pm 0{,}002$ е.о.п.[1)] при оптической плотности 0,3 е.о.п. и $\pm 0{,}003$ е.о.п. при оптической плотности 1 е.о.п.;

пределы допускаемой воспроизводимости измерений по фотометрической шкале $\pm 0{,}0008$ е.о.п. при оптической плотности 1 е.о.п.;

предел допускаемого СКО[2)] случайной составляющей погрешности измерений по фотометрической шкале $\pm 0{,}0001$ е.о.п. при оптической плотности 0 е.о.п., $\lambda = 500$ нм и $\pm 0{,}0006$ е.о.п. при оптической плотности 1 е.о.п., $\lambda = 500$ нм;

уровень мешающего излучения 1,0 % ($\lambda = 200$ нм) и 0,05 % ($\lambda = 220$ и 340 нм).

4.3 Колонка аналитическая длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем, размер частиц 5 мкм.

4.4 Микрошприцы для ВЭЖХ, вместимостью 25, 100 и 250 мкл.

4.5 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания $\pm 0{,}1$ мг.

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

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

[1)] е.о.п. — единица оптической плотности.

[2)] СКО — среднеквадратическое отклонение.

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

4.9 Пипетки 1-2-1, 1-2-5, 1-2-10 2-го класса точности по ГОСТ 29169.

4.10 Пипетки градуированные 1-2-25 по ГОСТ 29227 вместимостью 25 $см^3$ или дозаторы пипеточные с аналогичным или изменяемым объемом доз с относительной погрешностью дозирования ±1 %.

4.11 Колбы мерные с одной отметкой, вместимостью 25, 50, 100, 500, 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.

4.12 Цилиндр мерный вместимостью 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.

4.13 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

колбы круглодонные вместимостью 1000 $см^3$;

воронка лабораторная;

стаканы вместимостью 50, 100, 250, 500, 1000 $см^3$.

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

4.15 Кюветы кварцевые для спектрофотометрии с длиной оптического пути 10 мм.

4.16 Установка для дегазации элюента.

4.17 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

4.18 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.19 Вода для лабораторного анализа первой степени чистоты по ГОСТ Р 52501.

4.20 Ацетонитрил для ВЭЖХ.

4.21 Кислота уксусная особой чистоты по ГОСТ 18270.

4.22 5-гидроксиметилфурфурол особой чистоты с массовой долей основного вещества не менее 97 % или 5-гидроксиметилфурфурол с массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.23 Шприц медицинский 5 $см^3$ по ГОСТ 22967.

4.24 Стаканчики для взвешивания СВ-24/10 (30 × 50).

4.25 Фильтры обеззоленные по [1].

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.

5 Отбор и подготовка проб

Отбор проб — по ГОСТ 26313, подготовка проб — по ГОСТ 26671.

6 Подготовка к проведению определения

6.1 Приготовление подвижной фазы для жидкостной хроматографии

В мерный цилиндр по ГОСТ 1770 вместимостью 1000 $см^3$ последовательно приливают 840 $см^3$ дистиллированной воды по ГОСТ 6709, 150 $см^3$ ацетонитрила по 4.19 и 10 $см^3$ уксусной кислоты особой чистоты по ГОСТ 18270, раствор переносят в емкость для элюента по 4.16 с завинчивающейся крышкой и перемешивают. Полученный раствор дегазируют на установке для дегазации элюента по 4.16 под вакуумом в течение 15 мин с одновременной фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок хранения раствора при условии визуального отсутствия нерастворимых веществ — 5 сут. Перед каждым определением раствор элюента предварительно дегазируют под вакуумом в течение 15 мин с одновременной фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм.

6.2 Подготовка проб для определения

6.2.1 Определение массовой концентрации 5-гидроксиметилфурфурола в осветленных соках и сокосодержащих напитках, не содержащих нерастворимые в воде вещества, проводят без предварительного разбавления пробы дистиллированной водой.

Определение 5-гидроксиметилфурфурола в соковой продукции (при его вероятно высокой массовой концентрации) проводят после предварительного разбавления пробы дистиллированной водой в соотношении: с осветленными соками или сокосодержащими напитками 1:3 — 1:10, с концентрированными соками 1:25 — 1:50.

Определение массовой концентрации 5-гидроксиметилфурфурола в осветленных соках и сокосодержащих напитках, содержащих нерастворимые в дистиллированной воде вещества, проводят после

фильтрования пробы через обеззоленный фильтр «белая лента» [1] или ее центрифугирования по 4.7 с фактором разделения не менее 990 g в течение 15 мин.

Затем 1—2 $см^3$ пробы отбирают в медицинский шприц по 4.23 через иглу, после этого заменяют иглу на фильтр с диаметром пор 0,45 или 0,20 мкм и отфильтровывают в виалу по 4.14.

6.2.2 Определение массовой концентрации 5-гидроксиметилфурфурола в соках и сокосодержащих напитках с объемной долей мякоти до 10,0 % включительно (соки и нектары из цитрусовых, ананаса, персика, абрикоса и др.) или содержащих нерастворимые в воде вещества, проводят после тщательного перемешивания пробы стеклянной палочкой, а затем центрифугирования с фактором разделения не менее 990 g в течение 15 мин.

Соки и сокосодержащие напитки с объемной долей мякоти свыше 10,0 % (из манго, томата, банана и др.) предварительно разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:5 для осветления раствора. Для этого в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 50 $см^3$ мерным цилиндром по ГОСТ 1770 отбирают 10 $см^3$ пробы и доводят дистиллированной водой до метки. После этого пробу гомогенизируют перемешиванием стеклянной палочкой и центрифугируют с фактором разделения не менее 990 g в течение 15 мин. В случае неполного осаждения нерастворимых в дистиллированной воде частиц с плотностью менее единицы пробу вновь фильтруют через обеззоленный фильтр «белая лента» или центрифугируют с фактором разделения не менее 990 g в течение 15 мин.

Затем 1—2 $см^3$ пробы с осветленным раствором отбирают в медицинский шприц через иглу, заменяют иглу на фильтр с диаметром пор 0,45 или 0,20 мкм и отфильтровывают в виалу.

6.2.3 Определение массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола в концентрированных соках проводят после предварительного разбавления пробы дистиллированной водой весовым методом в соотношении 1:5. Для этого на лабораторных весах по ГОСТ 24104 в стакане вместимостью 50 $см^3$ по 4.24 взвешивают 5—7 г концентрированного сока с записью результата до третьего знака после запятой, прибавляют дистиллированную воду до получения общей массы пробы 25—35 г с записью результата до третьего знака после запятой. Делением общей массы пробы на массу концентрированного сока до разбавления водой вычисляют величину разбавления (разведения), которую учитывают при обработке результатов. В случае, если концентрированный сок представляет собой пюре, при разбавлении которого образуются нерастворимые в дистиллированной воде вещества, пробу дополнительно центрифугируют в соответствии с аналогичными требованиями 6.2.2.

Затем 1—2 $см^3$ пробы с осветленным раствором отбирают в медицинский шприц через иглу, заменяют иглу на фильтр с диаметром пор 0,45 или 0,20 мкм и отфильтровывают в виалу.

6.2.4 Для определения массовой концентрации 5-гидроксиметилфурфурола подготовку проб проводят по 6.2.1, 6.2.2, для определения массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола подготовку проб проводят по 6.2.3.

6.3 Приготовление стандартных растворов 5-гидроксиметилфурфурола

6.3.1 Приготовление основного стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола массовой концентрацией 1000 мг/ $дм^3$

В стакане вместимостью 50 $см^3$ взвешивают 0,025 г 5-гидроксиметилфурфурола по 4.22 с точностью до третьего знака после запятой, растворяют ориентировочно в 15 $см^3$ ацетонитрила по 4.20, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$, доводят ацетонитрилом до метки и перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре 4 °С — 1 мес, при комнатной температуре — 1 нед.

6.3.2 Приготовление рабочего стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола массовой концентрацией 1—7 мг/$дм^3$

Из основного стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола готовят рабочий стандартный раствор 5-гидроксиметилфурфурола для определения точной массовой концентрации основного стандартного раствора Для этого в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ приливают ориентировочно 20 $см^3$ ацетонитрила, вносят пипеточным дозатором 50 — 350 мкл основного стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола, подготовленного по 6.3.1, доводят ацетонитрилом до метки и тщательно перемешивают.

Для определения точной массовой концентрации основного стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола регистрируют спектр поглощения рабочего раствора 5-гидроксиметилфурфурола относительно воды для лабораторного анализа по 4.19 в диапазоне длин волн 210—350 нм. Определяют значение абсорбции максимума (около 284 нм) и рассчитывают точную массовую концентрацию рабочего стандартного раствора по уравнению

$$C_{раб} = 1000 \cdot A \cdot M/\varepsilon \cdot L = A \cdot 7{,}487, \quad (1)$$

где $C_{раб}$ — массовая концентрация или массовая доля рабочего стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола, мг/дм^3;

A — оптическая плотность раствора 5-гидроксиметилфурфурола в максимуме поглощения;

M — молекулярная масса 5-гидроксиметилфурфурола, равная 126 г/моль;

ε — молярный коэффициент поглощения 5-гидроксиметилфурфурола, равный 16830 [моль × × см/дм^3]$^{-1}$;

L — толщина слоя раствора в кювете, см.

По точной массовой концентрации рабочего стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола рассчитывают точную массовую концентрацию основного стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола по уравнению

$$C_{осн} = C_{раб} \cdot r, \quad (2)$$

где $C_{осн}$ — точная массовая концентрация рабочего стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола;

r — величина разбавления (разведения) основного стандартного раствора при приготовлении рабочего раствора.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 3 сут, при температуре (2 ÷ 4) °С — 3 мес, при температуре минус 20 °С — 6 мес.

6.4 Приготовление градуировочных растворов 5-гидроксиметилфурфурола массовой концентрацией 1,0—32,0 мг/дм^3

Из основного стандартного раствора 5-гидроксиметилфурфурола по 6.3.1, массовой концентрацией 1000 мг/дм^3 готовят градуировочные растворы № 1—4.

Градуировочный раствор № 1 готовят из основного стандартного раствора в соответствии с таблицей 1. Для приготовления градуировочных растворов № 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуировочного раствора № 1, помещают их в мерные колбы и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивая.

Стандартные градуировочные растворы 5-гидроксиметилфурфурола готовят для построения градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации или массовой доли к большей в соответствии с таблицей 1.

Стандартные градуировочные растворы 5-гидроксиметилфурфурола готовят непосредственно перед проведением измерений.

Таблица 1 — Приготовление стандартных градуировочных растворов 5-гидроксиметилфурфурола

№ п/п	№ стандартного раствора	Компонент	Вместимость мерной колбы, см^3	Способ приготовления	Массовая концентрация (массовая доля), мг/дм^3 (млн$^{-1}$)
1	1	5-ГМФ	50	Отбирают 1,6 см^3 основного стандартного раствора 5-ГМФ массовой концентрацией* 1000 мг/дм^3 в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	32,0
2	2	5-ГМФ	25	Отбирают 0,78** см^3 раствора № 1 в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	1,0
3	3	5-ГМФ	25	Отбирают 3,13 см^3 раствора № 1 в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	4,0
4	4	5-ГМФ	25	Отбирают 12,5 см^3 раствора № 1 в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	16,0

* В данном случае значения массовой концентрации и массовой доли совпадают, поскольку плотность приготавливаемых растворов близка к единице.

** Объемы 5-ГМФ менее 1 см^3 вносят с помощью микрошприцов вместимостью 100 или 250 мкл по 4.4, предварительно градуированных по дистиллированной воде.

7 Выполнение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

7.1 Условия хроматографического анализа

Колонка аналитическая: длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем, с размером частиц 5 мкм по 4.3.

Элюент: ацетонитрил/вода/уксусная кислота (15 %/ 84 %/1 %, по объему).

Температура колонки: комнатная.

Детектирование: УФ, 284 нм.

Скорость подачи элюента: 1,0 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы: 10—20 мкл.

7.2 Условия проведения измерений

Измерения проводят в 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 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов. Регистрируют площади пиков 5-гидроксиметилфурфурола и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации (массовой доли) 5-гидроксиметилфурфурола в градуировочном растворе.

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

Градуировочную зависимость выражают линейным уравнением

$$y = k \cdot x. \qquad (3)$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется значением достоверности аппроксимации (R^2):

$$R^2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (3) следует, что площадь пиков стандартных растворов 5-гидроксиметилфурфурола S (mAU·с или AU · с) и их массовая концентрация c (мг/$дм^3$) или массовая доля c ($млн^{-1}$) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \qquad (4)$$

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

$$k = \frac{\sum (S_i \cdot c_i)}{\sum c_i^2}, \qquad (5)$$

где S_i — площадь пика 5-гидроксиметилфурфурола при анализе i-го стандартного раствора, mAU · с или AU · с;

c_i — массовая концентрация или массовая доля 5-гидроксиметилфурфурола при анализе i-го стандартного раствора, мг/$дм^3$ ($млн^{-1}$).

Градуировочную зависимость строят при замене оборудования, колонок, изменении условий хроматографического анализа или при выявлении несоответствия метрологическим требованиям результатов оперативного контроля или внутреннего аудита.

7.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ проб, подготовленных по 6.2. Каждую пробу анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1 (подраздел 3.14) и ГОСТ Р ИСО 5725-2. Регистрируют площадь пика 5-гидроксиметилфурфурола. В случае, если массовая концентрация или массовая доля 5-гидроксиметилфурфурола в пробе настолько максимальна, что

площадь соответствующего пика выходит за верхнюю границу диапазона градуировки хроматографа, подготавливают новую пробу с большим разбавлением и измерение повторяют.

Пример хроматограммы раствора 5-гидроксиметилфурфурола приведен в приложении А.

8 Обработка и оформление результатов определения

Массовую концентрацию или массовую долю 5-гидроксиметилфурфурола рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения пробы. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и определение массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола $c(X)$, мг/дм^3 (млн$^{-1}$), проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c\,(X) = \frac{S_X \cdot V_2}{k \cdot V_1} \text{ или } c\,(X) = \frac{S_x \cdot m_{общ}}{k \cdot m(x)} \qquad (6)$$

или по формулам с использованием стандартного раствора массовой концентрацией или массовой долей 5-гидроксиметилфурфурола наиболее близкой к ожидаемой в анализируемой пробе

$$c\,(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_X \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1} \text{ или } c\,(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot m_{общ}}{S_{ст} \cdot m(x)}, \qquad (7)$$

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

$c(X)$ — массовая концентрация или массовая доля 5-гидроксиметилфурфурола в анализируемой пробе, мг/дм^3 (млн$^{-1}$);

$c_{ст}$ — массовая концентрация или массовая доля 5-гидроксиметилфурфурола в стандартном растворе, мг/дм^3 или (млн$^{-1}$);

S_X — площадь пика анализируемого 5-гидроксиметилфурфурола, mAU · с или AU · с;

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

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого 5-гидроксиметилфурфурола в стандартном растворе, mAU · с или AU · с;

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.

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

Расхождение между двумя параллельными определениями (в процентах от среднего значения), выполненными в условиях повторяемости, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, приведенного в таблице 2, при вероятности $P = 0{,}95$.

При соблюдении этого условия за окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений $X_{ср}$, округленное до второго десятичного знака.

Границы относительной погрешности определения массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола $\pm\,\delta$, %, при соблюдении условий, регламентированных настоящей методикой, при вероятности $P = 0{,}95$ не должны превышать значений, приведенных в таблице 2.

Таблица 2 — Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола

Наименование показателя (P = 0,95, n = 2)	Значение показателя при диапазонах измерений массовой концентрации (массовой доли), мг/дм^3 (млн$^{-1}$)
	От 1,0 до 50,0 включ.
Предел повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, %	2
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	6
Граница относительной погрешности $\pm\,\delta$, %	5
Предел обнаружения метода, мг/дм^3 (млн$^{-1}$)	0,1

Если массовая концентрация (массовая доля) 5-гидроксиметилфурфурола превышает 50 мг/дм^3 (млн$^{-1}$), то определение массовой концентрации (массовой доли) 5-гидроксиметилфурфурола проводят после разбавления пробы по 6.2.1 — 6.2.3 с доведением массовой концентрации (массовой доли) 5-гидроксиметилфурфурола в пробе до диапазона от 1 до 50 мг/дм^3 (млн$^{-1}$).

Окончательный результат определения массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола представляют в следующем виде:

$$X_{ср} = \pm \Delta, \quad (8)$$

где $X_{ср}$ — среднее значение результатов двух параллельных определений массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола, мг/дм^3 (млн$^{-1}$);

Δ — границы абсолютной погрешности определений массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола, мг/дм^3 (млн$^{-1}$), рассчитанные по формуле

$$\Delta = \frac{\delta \cdot X_{ср}}{100}. \quad (9)$$

9 Контроль точности результатов определения

9.1 Оперативный контроль повторяемости результатов определения

Оперативный контроль повторяемости результатов определения массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола проводят при получении каждого результата определения путем сравнения расхождения между результатами двух параллельных определений (в процентах от среднего значения), выполненных в условиях повторяемости с пределом повторяемости (сходимости), приведенным в таблице 2.

Повторяемость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01\, r_{отн} X_{ср}. \quad (10)$$

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

9.2 Оперативный контроль воспроизводимости результатов определения

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых определений, которые получены в условиях воспроизводимости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, разные лаборатории, разные операторы, различное оборудование), не должно превышать предела воспроизводимости, приведенного в таблице 2. При превышении указанного предела воспроизводимости контрольное определение повторяют. При повторном превышении указанного предела воспроизводимости выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

9.3 Оперативный контроль погрешности (точности) результатов определения

Оперативный контроль погрешности (точности) результатов определения осуществляют методом добавок с использованием проб соковой продукции, объем или масса которых должны соответствовать удвоенному количеству, необходимому для проведения измерений. Пробу делят на две равные части. В одну из них добавляют стандарт 5-гидроксиметилфурфурола в таких количествах, чтобы добавка составляла 50 % — 150 % исходного содержания компонента в пробе, но не превышала верхней границы диапазона определения массовой концентрации или массовой доли компонента с учетом границ погрешности определения (см. таблицу 2). Обе части пробы подвергают измерениям в точном соответствии с требованиями настоящего стандарта.

Результаты контрольных определений признают удовлетворительными, если погрешность определения массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола в добавке не превышает норматива оперативного контроля погрешности (точности), то есть выполняется условие

$$|X_{доб} - X_{ср} - c_{доб}| \le K_{доб}, \quad (11)$$

где $X_{доб}$ — среднее значение двух определений массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола в пробе с добавкой, мг/дм^3 (млн$^{-1}$);

$X_{ср}$ — среднее значение двух определений массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола в пробе без внесения добавки, мг/дм^3 (млн$^{-1}$);

$c_{доб}$ — значение добавки 5-гидроксиметилфурфурола, мг/дм^3 (млн$^{-1}$);

$K_{доб}$ — норматив оперативного контроля погрешности, мг/дм^3 (млн$^{-1}$).

При проведении внутрилабораторного контроля ($P = 0,90$) значение $K_{доб}$ рассчитывают по формуле

$$K_{доб} = 0,84 \cdot \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + X_{ср}^2}\ . \qquad (12)$$

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

$$K_{доб} = \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + X_{ср}^2}\ , \qquad (13)$$

где δ — границы относительной погрешности определения массовой концентрации или массовой доли 5-гидроксиметилфурфурола, указанные в таблице 2.

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

Периодичность контроля погрешности (точности) устанавливается самой лабораторией с учетом фактического состояния работ. При замене оборудования, колонок, реактивов, изменении условий хроматографического анализа или при выявлении несоответствия метрологическим требованиям результатов оперативного контроля или внутреннего аудита.

10 Требования безопасности

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.

Требования взрывобезопасности — в соответствии с ГОСТ 12.1.010.

При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила электробезопасности по ГОСТ 12.1.018, ГОСТ 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

10.2 Требования к квалификации оператора

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

Приложение А
(справочное)

Хроматограмма 5-гидроксиметилфурфурола в пробе концентрированного яблочного сока

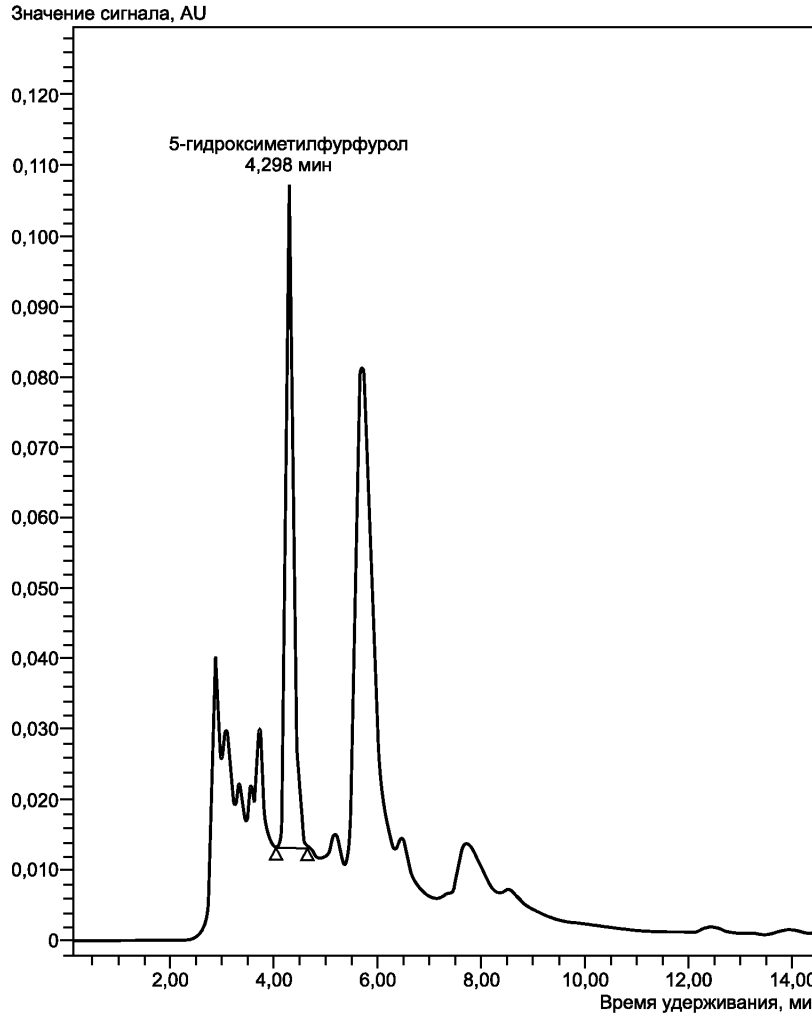

Рисунок А.1 — Хроматограмма 5-гидроксиметилфурфурола (время удерживания ГМФ — 4,298 мин)

Библиография

[1] ТУ 6-09-1678—95 Фильтры обеззоленные ФЩ-ФС-15 «Белая лента»

УДК 664.863.001.4:006.354 ОКС 67.080, 67.050 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: соковая продукция, определение, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, стандартный раствор, градуировочные растворы, массовая концентрация 5-гидроксиметилфурфурола, массовая доля 5-гидроксиметилфурфурола, предел повторяемости (сходимости), границы относительной погрешности

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *Т.И. Кононенко*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 09.04.2010. Подписано в печать 28.04.2010. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 211 экз. Зак. 347.

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