
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
54685—
2011

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение фумаровой кислоты методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2012

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)

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. № 844-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 и метрологические характеристики документа ИФУ 72 (1998) «Метод определения фумаровой кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии» (Международная федерация производителей фруктовых соков) [IFU-Analyses Nr. 72 (1998) «Fumaric acid (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

© Стандартиформ. 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 определения	2
4 Отбор проб	2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы	2
6 Подготовка к проведению измерений	3
7 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	3
8 Обработка и оформление результатов определения	5
9 Требования безопасности	5
Приложение А (справочное) Метрологические характеристики метода	6
Библиография	7

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение фумаровой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products. Determination of fumaric acid by high performance liquid chromatography method (HPLC)

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары, морсы и сокодержательные 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 фумаровой кислоты.

Нижний предел измерений массовой концентрации (массовой доли) фумаровой кислоты составляет 1 мг/дм³ (млн⁻¹). Верхний предел измерений массовой концентрации (массовой доли) фумаровой кислоты — 50 мг/дм³ (млн⁻¹).

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 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения
- ГОСТ Р 52501—2005 Вода для лабораторного анализа. Технические условия
- 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 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 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
- ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия
- ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

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

П р и м е ч а н и е — 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 определения

Метод основан на применении высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Массовую концентрацию или массовую долю фумаровой кислоты в соковой продукции определяют с применением спектрофотометрического детектора в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 210 нм.

4 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26313.

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

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

5.2 Колонка аналитическая, длиной 300 мм и внутренним размером диаметра 7,8 мм, заполненная сорбентом на основе сополимера стирола с дивинилбензолом с привитыми сульфокислотными группами, снабженная предколонкой длиной 30 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненной тем же сорбентом.

5.3 Детектор спектрофотометрический, позволяющий производить измерения оптической плотности при длине волны 210 нм с проточной кюветой рабочим объемом не более 10 мм³ со следующими метрологическими характеристиками:

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

- 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 $\pm 0,002$ при оптической плотности 0,3 и $\pm 0,003$ при оптической плотности 1;
- пределы допускаемой воспроизводимости измерений по фотометрической шкале $\pm 0,0008$ при оптической плотности 1.

5.4 Весы по ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность взвешивания с пределами абсолютной допускаемой погрешности $\pm 0,1$ мг.

5.5 Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5 и 1-2-2-10 по ГОСТ 29227.

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

- цилиндры 1-50-2 и 1-1000-2;
- колбы мерные с притертой пробкой 4-50-2, 4-500-2 и 4-1000-2;
- пробирки стеклянные 1-10-0,1 ХС и 1-20-0,1 ХС.

5.7 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

- воронки лабораторные;
- стаканы В-1-50, В-1-100 и В-2-1000.

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

5.9 Фильтры обеззоленные по [1].

5.10 Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (g-фактор) 1000—4000.

5.11 Баня ультразвуковая.

5.12 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

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

5.14 Кислота фумаровая, массовой долей основного вещества не менее 99,5 %.

5.15 Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Приготовление подвижной фазы для жидкостной хроматографии

В качестве подвижной фазы используют водный раствор серной кислоты молярной концентрации $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,005$ моль/дм³, который необходимо предварительно профильтровать через мембранный фильтр.

Срок хранения раствора в плотно закупоренной посуде при комнатной температуре — не более 7 сут.

6.2 Подготовка проб для измерений

Раствор пробы для хроматографического анализа готовят в соответствии с ГОСТ Р 53693 (подраздел 6.2).

6.3 Приготовление стандартных градуировочных растворов фумаровой кислоты

6.3.1 Приготовление основного стандартного раствора фумаровой кислоты

50 мг фумаровой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 500 см³, на 2/3 объема наполненную водой для лабораторного анализа по 5.13. Содержимое колбы тщательно перемешивают, после чего доводят до метки водой по 5.13 и вновь тщательно перемешивают. Получают основной стандартный раствор массовой концентрацией фумаровой кислоты 100 мг/дм³.

Срок хранения раствора в плотно закупоренной емкости при температуре 4 °С — не более 6 мес.

6.3.2 Приготовление градуировочных растворов фумаровой кислоты

Градуировочные растворы фумаровой кислоты готовят непосредственно перед использованием.

Из основного стандартного раствора фумаровой кислоты массовой концентрацией 100 мг/дм³ готовят пять градуировочных растворов в диапазоне массовых концентраций фумаровой кислоты от 1,0 до 10,0 мг/дм³ при помощи разведения основного стандартного раствора (0,5; 1,0; 3,0; 4,0; 5,0 см³) водой по 5.13 в мерных колбах вместимостью по 50 см³. Аликвоты основного стандартного раствора дозируют с помощью пипеток и далее содержимое колб доводят до метки водой по 5.13. Приготовленные градуировочные растворы фильтруют через мембранные фильтры с размером диаметра пор 0,45 мкм.

7 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

7.1 Условия хроматографического анализа

Колонка аналитическая по 5.2.

Элюент: раствор серной кислоты молярной концентрации 0,005 моль/дм³ по 6.1.

Температура колонки: 40 °С.

Длина волны детектора: 210 нм.

Скорость потока подачи элюента: 0,6 см³/мин (ориентировочное значение).

Объем вводимой пробы: 15 мкл.

Время удерживания фумаровой кислоты: 14 мин (ориентировочное значение).

Продолжительность анализа: примерно 20 мин.

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 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов. Регистрируют время удерживания и площади пиков фумаровой кислоты и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации фумаровой кислоты в градуировочном растворе.

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

Площадь пика фумаровой кислоты S , мм², и ее концентрация в градуировочном растворе c , мг/дм³, находятся в функциональной зависимости вида

$$c = K \cdot S, \quad (1)$$

где K — градуировочный коэффициент, мг/(дм³мм²).

Градуировочный коэффициент K в формуле (1) рассчитывают по результатам анализа градуировочных растворов с помощью системы автоматизированной обработки данных или, при ее отсутствии в составе хроматографа, по методу наименьших квадратов, полагая свободный член в уравнении регрессии равным нулю, по формуле

$$K = \frac{\sum(S_i c_i)}{\sum S_i^2}, \quad (2)$$

где S_i — площадь пика фумаровой кислоты при анализе i -го градуировочного раствора, мм²;

c_i — массовая концентрация фумаровой кислоты в i -м градуировочном растворе, мг/дм³.

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

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

Градуировочную зависимость строят при замене оборудования, колонок, реактивов, условий хроматографического анализа.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы. В качестве контрольного образца используют раствор фумаровой кислоты в подвижной фазе массовой концентрации 5,0 мг/дм³, приготовленный в соответствии с 6.3.2. Проводят двукратный хроматографический анализ контрольного образца и идентифицируют пик фумаровой кислоты по времени удерживания. По результатам каждого анализа рассчитывают массовую концентрацию фумаровой кислоты в контрольном образце по формуле (1).

Проверяют повторяемость значений массовой концентрации фумаровой кислоты при анализе контрольного образца по формуле

$$|C_{k,1} - C_{k,2}| \leq 0,03 \cdot \bar{C}_k, \quad (3)$$

где $C_{k,1}$ и $C_{k,2}$ — массовые концентрации фумаровой кислоты в контрольном образце, полученные по первой и второй хроматограммам, мг/дм³;

\bar{C}_k — среднеарифметическое значений $C_{k,1}$ и $C_{k,2}$, мг/дм³.

Градуировочная зависимость признается стабильной, если выполняется условие

$$|\bar{C}_k - C| \leq 0,10 \cdot C, \quad (4)$$

где C — фактическая массовая концентрация фумаровой кислоты в контрольном образце, мг/дм³.

Если условие (4) не выполняется, то процедуру контроля повторяют и при получении неудовлетворительного результата контроля градуировку хроматографа проводят заново.

7.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ двух параллельных проб, подготовленных по 6.2.

Регистрируют площадь пика фумаровой кислоты. В случае если массовая концентрация или массовая доля фумаровой кислоты в пробе настолько велика, что площадь соответствующего пика выходит за верхнюю границу диапазона градуировки хроматографа, то проводят повторный хроматографический анализ раствора пробы с большей степенью разбавления.

8 Обработка и оформление результатов определения

Массовую концентрацию фумаровой кислоты X_1 , мг/дм³, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{S \cdot K \cdot V_1}{V_2}, \quad (5)$$

где S — площадь пика фумаровой кислоты на хроматограмме раствора пробы, мм²;

K — градуировочный коэффициент, мг/(дм³ · мм²);

V_1 — объем, в котором разбавлена проба для анализа, см³;

V_2 — объем пробы, взятой для анализа, см³.

При испытании соков с объемной долей мякоти более 10 % результат определения выражают в виде массовой доли фумаровой кислоты X_2 , млн⁻¹, которую рассчитывают по формуле

$$X_2 = \frac{S \cdot K \cdot V}{m}, \quad (6)$$

где K — градуировочный коэффициент, мг/(дм³ · мм²);

V — объем, в котором разбавлена проба для анализа, см³;

m — масса пробы, взятая для анализа, г.

Вычисления проводят с точностью до второго десятичного знака.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений $X_{ср}$, выполненных в условиях повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-1, округленное до первого десятичного знака.

В справочном приложении А приведены метрологические характеристики метода определения массовой концентрации фумаровой кислоты по данным метода ИФУ 72 «Метод определения фумаровой кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии». Значения характеристик прецизионности, указанные в таблице А.1 приложения А, приведены для конкретных видов соковой продукции.

9 Требования безопасности

9.1 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 выполнению измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила пожаровзрывобезопасности по ГОСТ 12.1.018, по электробезопасности — по ГОСТ Р 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

9.2 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 методику измерений с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Первое выполнение 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)

Метрологические характеристики метода

А.1 Метрологические характеристики метода приведены в таблице А.1.

Т а б л и ц а А.1 — Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации или массовой доли фумаровой кислоты*

Наименование показателя	Соковая продукция		
	Вишневый нектар	Яблочный сок	Вишневый нектар
Среднее значение определения, мг/дм ³	14,5	6,8	3,4
Стандартное отклонение повторяемости S_p , мг/дм ³	0,172	0,225	0,165
Предел повторяемости (сходимости) r , мг/дм ³	0,5	0,5	0,5
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R , мг/дм ³	0,674	0,682	0,801
Предел воспроизводимости R , мг/дм ³	1,9	1,9	2,2

* По данным метода ИФУ 72 (1998) «Метод определения фумаровой кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Библиография

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

Ключевые слова: соковая продукция, фумаровая кислота, сущность метода, высокоэффективная жидкостная хроматография, стандартные градуировочные растворы, массовая концентрация, массовая доля, подготовка к проведению измерения, проведение измерения, обработка и оформление результатов определения, требования безопасности

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

Сдано в набор 27.08.2012. Подписано в печать 25.09.2012. Формат 60x84¹/₈. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 1,40.
Уч.-изд. л. 1,10. Тираж 211 экз. Зак. 827.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.