

Методика выполнения измерений массовой концентрации углеводов в напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(СВ-во №21-03 от 04.07.2003 ВНИИМС)

1. Область применения

Настоящая методика устанавливает метод измерений массовой концентрации углеводов (сахарозы, глюкозы, фруктозы) в напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Методика распространяется на вина виноградные, оригинальные и плодовые, напитки винные и безалкогольные, соки и виноматериалы. Диапазон измерений массовой концентрации сахарозы, глюкозы, фруктозы – (0,5 – 80 г/дм³)

2. Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 4212-76	Реактивы. Приготовление растворов для колориметрического и нефелометрического анализа
ГОСТ 6687.0-86	Продукция безалкогольной промышленности. Правила приемки и методы отбора проб.
ГОСТ 6709-72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12786-80	Пиво. Правила приемки и методы отбора проб
ГОСТ 24104-88	Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28165-89	Приборы и аппараты лабораторные из стекла. Аквадистилляторы. Испарители. Установки ректификационные. Общие технические требования
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
ГОСТ Р 1.12-99	Государственная система стандартизации. Стандартизация и смежные виды деятельности. Термины и определения
ГОСТ Р 8.563-96	Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений

ГОСТ Р 51144-98 Продукты винодельческой промышленности. Правила приемки и методы отбора проб

3. Определения, обозначения и сокращения

В настоящем стандарте используют определения и сокращения с учетом требований ГОСТ Р 1.12, ГОСТ 8.563, а также термины, установленные в ГОСТ Р 51880.

4. Сущность метода

Метод основан на индивидуальном определении сахарозы, глюкозы, фруктозы, присутствующих в пробе напитков с помощью рефрактометрического детектирования после хроматографического разделения. Хроматограмма пробы напитка сокодержавшего представлена в приложении А.

5. Средства измерений, оборудование, реактивы

5.1. Хроматограф жидкостный «Стайер» по ТУ 4321.003.18294344 с рефрактометрическим детектором и оборудованный термостатом колонок, обеспечивающим поддержание температуры 80 °С с точностью 0,5 °С и стабильностью 0,1 °С.

Метрологические характеристики хроматографа:

-пределы допускаемого значения относительного среднеквадратического отклонения времени удерживания определяемого компонента 0.6%;

-пределы допускаемого значения относительного среднеквадратического отклонения выходного сигнала по высоте и площади пика -4 %.

5.2. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г, 2 класса точности по ГОСТ 24104

5.3 Набор гирь Г-2-200 по ГОСТ 7328

5.4 Пипетки мерные лабораторные стеклянные 2 класса точности, вместимостью 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29169

5.5 Посуда мерная лабораторная стеклянная 2 класса точности: колбы мерные наливные вместимостью 25 см³; 50 см³; 100 см³; 500 см³; 1000 см³; цилиндры вместимостью 10 см³; 25 см³; 50 см³; пробирки мерные вместимостью 10 см³; 15 см³; 20 см³ по ГОСТ 1770

5.6 Шприц медицинский, вместимостью 2см³

5.7 Колонка хроматографическая разделительная Rezex RCM, 8μ, 300 x 7,8 мм (Phenomenex, США)

5.8. Колонка защитная (предколонка) "Carbo-Ca²⁺" (4 x 3.0 мм) (Phenomenex, США)

5.9. Колонка для твердофазной экстракции Strata SDB-L 500мг/3мл (Phenomenex, США)

- 5.10 Установка для вакуумной фильтрации
- 5.11 Установка для твердофазной экстракции
- 5.12 Фильтры фторопластовые с диаметром пор 0,45 мкм
- 5.13 Микрошприц дозирующий для ВЭЖХ (типа Hamilton)
- 5.14 Сахароза по ГОСТ 5833 - 75, ч.д.а.
- 5.15 D (-) Фруктоза по ТУ 6-09-1979-77, ч.
- 5.16 Глюкоза-моногидрат по ФС 42-2419-86, фарм.
- 5.17. Спирт изопропиловый по ТУ 6-09-07-1718-91, ос.ч.

Допускается использование иных средств измерений, вспомогательного оборудования и реактивов с техническими характеристиками не хуже указанных выше.

6. Подготовка к проведению измерений

При подготовке к выполнению измерений выполняют следующие работы: приготовление растворов, подготовка хроматографа к работе.

6.1. Приготовление реактивов

6.1.1 Приготовление элюента для хроматографического разделения углеводов.

1000 см³ бидистиллированной воды фильтруют через фторопластовый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют, подключая емкость с элюентом к водоструйному насосу на 15 мин.

6.1.2. Приготовление основного раствора углеводов с массовой концентрацией сахарозы - 100 г/дм³, глюкозы – 100 г/дм³, фруктозы -100 г/дм³.

Навески углеводов массой: сахарозы 10,00 г; глюкозы 10,91 г; фруктозы – 10,00 г взвешивают на аналитических весах, результат записывают с точностью до 0,01г.

Навески помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в бидистиллированной воде и содержимое колбы доводят до метки.

6.1.3 Приготовление градуировочного раствора № 1 с массовой концентрацией сахарозы - 50 г/дм³, глюкозы –50 г/дм³, фруктозы -50 г/дм³.

В мерную колбу вместимостью 50 см³ пипеткой вместимостью 25 см³ вносят 25 см³ основного раствора углеводов, приготовленного по 6.1.2, содержимое колбы доводят до метки бидистиллированной водой и перемешивают.

6.1.4. Приготовление градуировочного раствора № 2 с массовой концентрацией сахарозы - 25 г/дм³, глюкозы –25 г/дм³, фруктозы -25 г/дм³.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ пипеткой вносят 25 см³ основного раствора углеводов, приготовленного по 6.1.2. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

6.1.5. Приготовление градуировочного раствора № 3 с массовой концентрацией сахарозы – 2,5 г/дм³, глюкозы – 2,5 г/дм³, фруктозы – 2,5 г/дм³.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ пипеткой вносят 10 см³ градуировочного раствора №2, приготовленного по 6.1.4. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

6.1.6 Все растворы готовят в день определения.

6.2. Подготовка хроматографа к работе

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

Устанавливают последовательно защитную и разделительную колонки и готовят разделительную систему к работе в соответствии с паспортом колонок.

6.2.2 Условия хроматографического разделения сахарозы, глюкозы и фруктозы:

температура окружающего воздуха, °С	25 ± 5;
атмосферное давление, мм рт. ст	760 ± 30;
относительная влажность воздуха, %	65 ± 15;
частота питающей сети, Гц	50 ± 0,5;
напряжение питания в сети, В	220 ± 10;
скорость элюирования (элюент по 6.1)	0,6 см ³ /мин,
объем петлевого дозатора	20 мкл.
температура термостата	85 °С.

6.2.3 Ориентировочные значения времен удерживания сахарозы, глюкозы и фруктозы, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование компонента	Время удерживания, мин
Сахароза	9,2 ± 0,2
Глюкоза	10,8 ± 0,2
Фруктоза	13,8 ± 0,3

6.2.4 Детектирование разделенных углеводов осуществляют рефрактометрически.

6.3. Контроль разрешающей способности разделительной колонки

Разрешающую способность установленной разделительной системы оценивают по значению показателя разрешения (R_s) сахарозы и глюкозы.

6.3.1 Шприц для ввода пробы в хроматограф и петлевой дозатор промывают градуировочным раствором № 1: шприц - 3-х кратным объемом, не менее 50 мкл, петлевой дозатор - 0,3-0,5 см³.

6.3.2 Поворачивают кран ввода пробы в положение LOAD (ЗАГРУЗКА).

6.3.3 После выхода хроматографа на режим шприцем в петлевой дозатор вводят градуировочный раствор № 1 в количестве не менее трех объемов дозатора

6.3.4 Поворачивают кран ввода пробы в положение INJECT (ВВОД).

Программа сбора и обработки хроматографической информации запускается автоматически, а хроматограммы могут быть выведены на дисплей и/или принтер.

6.3.5 Значение (R_s) определяют по формуле:

$$R_s = \frac{2(t_{R1} - t_{R2})}{W_2 - W_1} \quad (1)$$

где t_{R1} и t_{R2} приведенные времена удерживания сахарозы и глюкозы, мин соответственно

W_1 и W_2 - ширина пиков (при основании) сахарозы и глюкозы, мин.

Приведенное время удерживания (t'_R) сахарозы и глюкозы определяют по формуле 2:

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (2),$$

где t_R - абсолютное время удерживания углевода, мин;

t_0 - время выхода неудерживаемого компонента (мертвый объем), мин.

Для установленной колонки среднее значение $R_{s(n,n+1)}$ для пары критически разделяемых углеводов (n) и (n+1) рассчитывают по результатам двух параллельных измерений.

При расчете R_s используют систему сбора и обработки хроматографических данных.

6.3.6 Качество колонки считают удовлетворительным при значениях $R_{s(n,n+1)} > 1,3$.

6.3.7 Контроль качества разделительной системы в процессе эксплуатации проводят не реже одного раза в 2 недели.

6.4. Установление градуировочной характеристики

6.4.1. Процедуры градуировки хроматографа выполняют по градуировочным растворам №№ 1-3 в соответствии с руководством по эксплуатации и руководством пользователя программным обеспечением. Градуировочная зависимость описывается уравнением:

$$Y = K_1 X + K_0 \quad (3)$$

6.4.2. Градуировку детектора проводят в следующих условиях выполнения измерений:

температура окружающего воздуха, °С	20 ÷ 35;
атмосферное давление, мм рт. ст	760 ± 30;
относительная влажность воздуха, %	65 ± 15;
частота питающей сети, Гц	50 ± 0,5;
напряжение питания в сети, В	220 ± 10

6.4.3. Для каждого градуировочного раствора, начиная с раствора № 3, последовательно, после промывания шприца для ввода пробы и петлевого дозатора соответствующим градуировочным раствором выполняют операции по 6.3.2-6.3.4.

6.4.4 Хроматограммы обрабатывают в соответствии с руководством пользователя.

6.4.5 Проверку градуировочной характеристики по градуировочному раствору № 2 выполняют перед началом работ в день выполнения измерений. При отклонении результатов измерений в градуировочных растворах массовой концентрации любого из углеводов более, чем на 15% и/или изменении времен удерживания более, чем на 3,5% повторную градуировку хроматографа выполняют во всем диапазоне измерений.

6.4.6 Градуировку во всем диапазоне измеряемых концентраций углеводов проводят не реже 1 раза в квартал, а также при использовании новой партии реактивов, замене колонок и после ремонта хроматографа.

7. Отбор проб

Отбор проб выполняют: по ГОСТ 6687.0 и ГОСТ 12786 (продукция пивобезалкогольной промышленности), по ГОСТ Р 26313 и ГОСТ 26661 (соки фруктовые); по ГОСТ Р 51144-98 (вина).

8. Подготовка проб

В общем виде подготовка проб представлена в приложении Б.

8.1. Пипеткой вместимостью 5 см³ в химический стаканчик отбирают пробу напитка объемом 5 см³, дозатором пипеточным добавляют 250 мкл изопропилового спирта и содержимое стаканчика перемешивают.

*Примечание. При наличии взвешенных частиц продукт предварительно центрифугируют со скоростью 6000 об/мин, а затем фильтруют через нейлоновый или тефлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

8.2 Колонку для твердофазной экстракции, собранную в соответствии с приложением В, подсоединяют к вакуумной линии и промывают последовательно 2 см³ изопропилового спирта и 4 см³ воды, не допуская осушения ее рабочей поверхности.

8.3 Пробу, подготовленную по 8.1, пропускают через колонку для твердофазной экстракции, подготовленную по 8.2 при скорости 1 – 2 см³/мин и первые порции

фильтрата объемом 1 – 2 см³ удаляют. Для хроматографического разделения используют последующую порцию фильтрата.

9. Проведение измерений

9.1 Шприц для ввода пробы в хроматограф и петлевой дозатор промывают раствором пробы, подготовленной к измерениям по 8.3: шприц — 3-х кратным объемом, не менее 50 мкл, петлевой дозатор — 0,3 - 0,5 см³.

9.2 Поворачивают кран ввода пробы в положение LOAD (ЗАГРУЗКА).

9.3 После выхода хроматографа на режим шприцем в петлевой дозатор вводят раствор пробы (не менее трех объемов дозатора).

9.4 Поворачивают кран ввода пробы в положение INJECT (ВВОД).

Программа сбора и обработки хроматографической информации запускается автоматически, при этом хроматограммы могут быть выведены на дисплей и/или принтер

9.5 Хроматограммы каждой пробы обрабатываются в соответствии с руководством пользователя программно-аппаратного комплекса и могут быть выведены на дисплей и/или принтер.

Идентификацию и расчет массовой концентрации определяемого углевода в пробе продукта, г/дм³ выполняет система сбора и обработки данных хроматографа.

10. Обработка результатов измерений.

10.1 За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, если выполняется условие (4)

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r, \quad (4)$$

где X_1, X_2 – результаты параллельных определений, г/дм³;

r – значение предела повторяемости, %, приведенное в таблице 2.

Таблица 2

Наименование компонента	Диапазон измерений массовой концентрации, г/дм ³	Показатель повторяемости, %, $\sigma_r \left(\begin{smallmatrix} 0 \\ \Delta \end{smallmatrix} \right)$	Показатель воспроизводимости, %, $\sigma_{R\bar{x}} \left(\begin{smallmatrix} 0 \\ \Delta \end{smallmatrix} \right)$	Границы относительной погрешности измерений, %, $\pm \delta$, P=0,95	Предел повторяемости, %, r , P=0,95, n=2	Предел воспроизводимости, %, $R_{\bar{x}}$, P=0,95, m=2
Глюкоза	от 0,5 до 5,0 вкл.	5	9	25	14	25
	св.5,0 до 80 вкл.	3	5	13	8	14
Фруктоза	от 0,5 до 5,0 вкл.	4	10	25	11	28
	св.5,0 до 80 вкл.	3	5	13	8	14

Наименование компонента	Диапазон измерений массовой концентрации, г/дм ³	Показатель повторяемости, %, $\sigma_r \left(\begin{smallmatrix} 0 \\ \Delta \end{smallmatrix} \right)$	Показатель воспроизводимости, %, $\sigma_{R\bar{x}} \left(\begin{smallmatrix} 0 \\ \Delta \end{smallmatrix} \right)$	Границы относительной погрешности измерений, %, $\pm \delta$, P=0,95	Предел повторяемости, %, r, P=0,95, n=2	Предел воспроизводимости, %, $R_{\bar{x}}$, P=0,95, m=2
Сахароза	от 0,5 до 5,0 вкл.	4	8	25	11	22
	св.5,0 до 80 вкл.	3	6	15	8	17

10.2 Если условие (4) не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данной МВИ. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие (5)

$$\frac{4 \cdot |X_{\max} - X_{\min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95}(n) \quad (5)$$

где X_{\max} , X_{\min} – максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений, г/дм³;

$CR_{0,95}(n)$ – значение критического диапазона для уровня вероятности $P = 0,95$ и $n = 4$, $CR_{0,95}(4) = 1,3 \times r$; %

n – число определений.

Если условие (5) не выполняется, выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями МВИ.

10.3 Результат количественного химического анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$X_{cp} \pm 0,01 \cdot \delta X_{cp}, \text{ г/дм}^3, \text{ при } n \text{ и } P = 0,95;$$

где X_{cp} – среднее арифметическое результатов n определений, признанных приемлемыми (п.п.10.1–10.2).

Если полученный результат анализа составляет значение меньше нижней границы диапазона измерений, установленного МВИ (0,5 г/дм³), то результат измерений представляют в виде: «меньше, чем 0,5 г/дм³».

11 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Периодичность контроля устанавливается планом контроля точности результатов измерений лаборатории.

11.1 Контроль качества результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

11.1.1 Контроль проводится с использованием образца рабочей пробы.

11.1.2 Контроль показателя промежуточной прецизионности результатов измерений проводят дважды анализируя образец для контроля в полном соответствии с данной МВИ в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами «время», «оператор» ($X_{cp,1}$, $X_{cp,2}$).

Промежуточную прецизионность признают удовлетворительной, если выполняется условие (6):

$$\frac{2 \cdot |X_{cp,1} - X_{cp,2}| \cdot 100}{(X_{cp,1} + X_{cp,2})} \leq R_{(T,O)}, \quad (6)$$

где $R_{(T,O)}$ – предел промежуточной прецизионности, %, рассчитывают как

$$R_{(T,O)отн} = R/1,2, \quad (7)$$

где R – значение предела воспроизводимости (таблица 2).

Если условие (6) не выполняется, процедуру повторяют. При повторном превышении норматива контроля выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

11.2 Контроль стабильности результатов измерений

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории осуществляют по ГОСТ ИСО 5725-6, используя метод контроля стабильности показателей промежуточной прецизионности и правильности рутинного анализа по ГОСТ ИСО 5725-6. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, превышение предела действия или регулярное превышение предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

12. Требования к квалификации операторов

Выполнение измерений и обработку результатов должен проводить инженер-химик, техник или лаборант не ниже 4-го разряда по ГОСТ 12.0.004, имеющий высшее или специальное образование, опыт работы в химической лаборатории, прошедший специальное обучение, изучивший техническую документацию на хроматограф.

13. Требования безопасности

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами.

Электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019 . Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения.

Помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021.

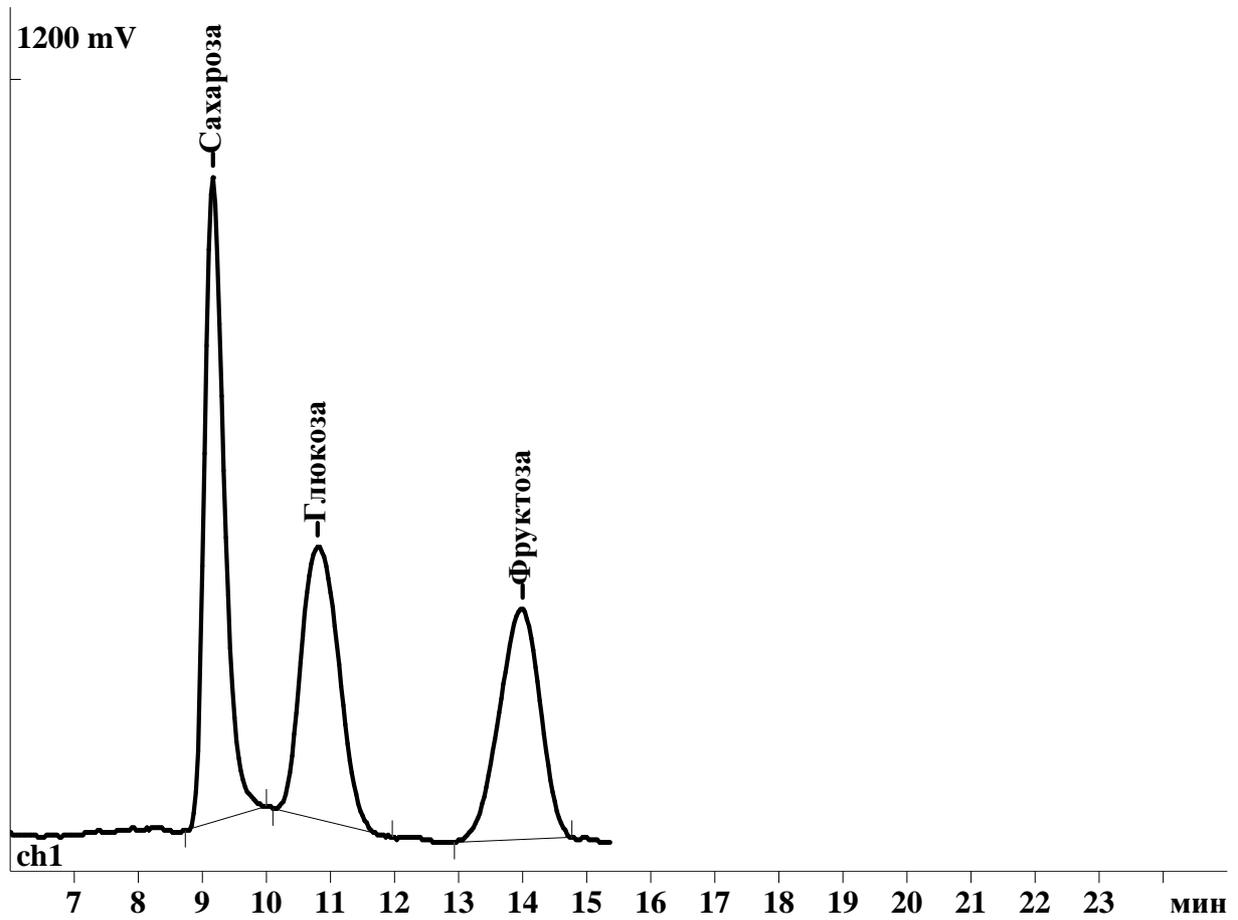


Рисунок 1. Хроматограмма пробы сокосодержащего напитка.

Схема подготовки проб к хроматографическому разделению

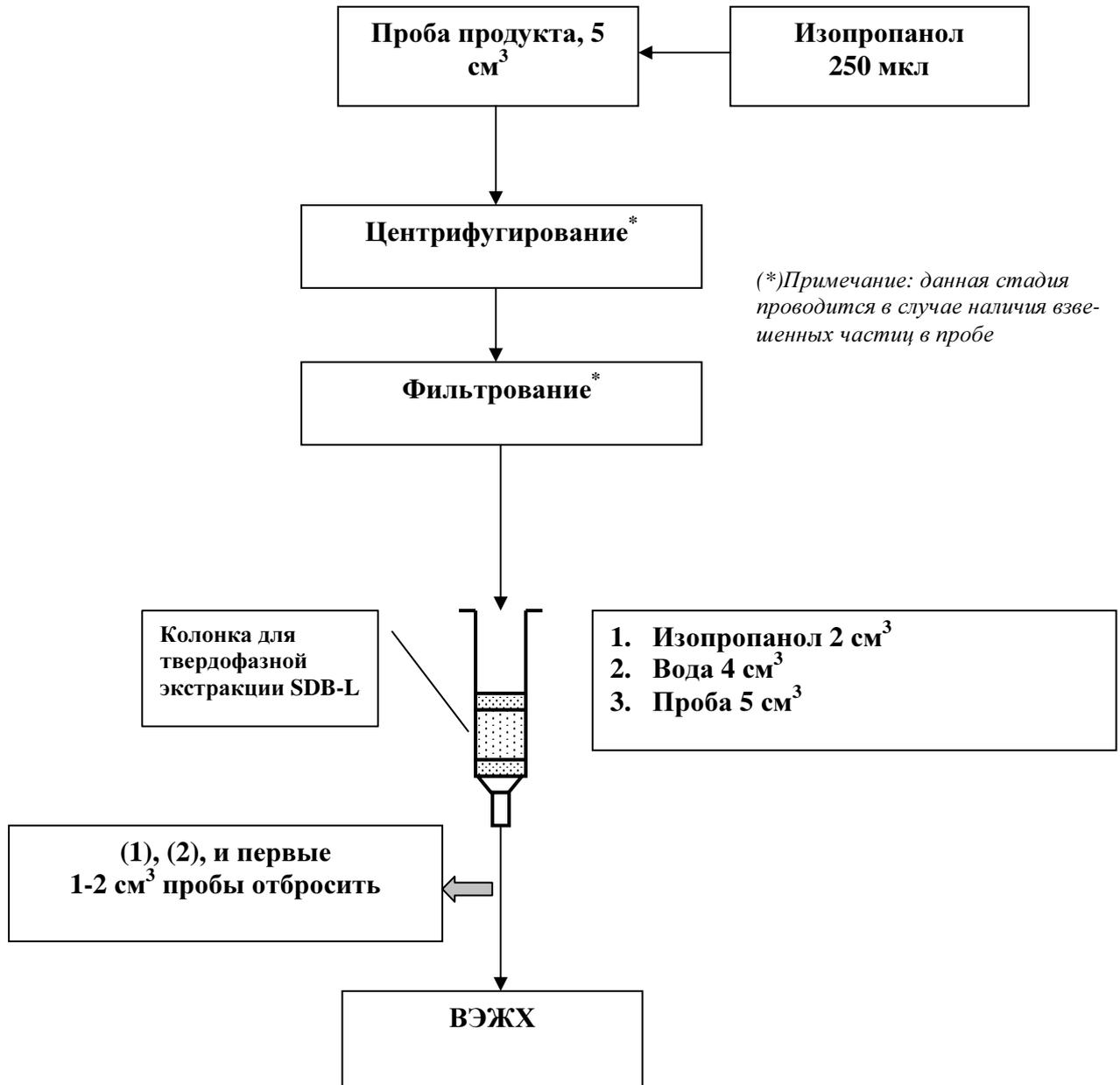


СХЕМА УСТАНОВКИ ДЛЯ ТФЭКСТРАКЦИИ

