

# ИНСТРУКЦИЯ

**по применению Аналитического комплекта**

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении органических кислот во фруктовых и овощных соках и напитках. В Инструкции также изложены рекомендации по работе с анализируемыми пробами, соблюдение которых повышает точность определения изучаемых компонентов.

Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям, относящимся к работе с Аналитическими комплектами.

## **1. Цель и назначение Аналитического комплекта *Органические кислоты в соках***

### ***1.1. Цель выпуска комплекта***

Целью выпуска Аналитического комплекта является обеспечение массового контроля образцов фруктовых и овощных соков и сокосодержащих напитков в условиях сертификационных центров Госстандарта и ГСЭН РФ, а также аккредитованных испытательных лабораторий.

Диапазоны измеряемых массовых концентраций определяемых компонентов составляют 0.1-100 г/л

### ***1.2. Назначение комплекта***

Аналитический комплект предназначен для проведения подготовки проб и количественного определения методом ВЭЖХ аскорбиновой, лимонной, винной и яблочной кислот, содержание которых нормируется в СанПиН 2.3.2.1078-01 (Приложение 2, п. 2.2.).

### ***1.3. Особенности комплекта***

Традиционным в анализе органических кислот является изократическое ВЭЖХ-разделение на полимерной колонке в режиме ионной эксклюзии при повышенных (30-60°C) температурах, либо в режиме обращенно-фазовой хроматографии на двух последовательно соединенных C-18-колонках при высокой концентрации фосфатного буфера в подвижной фазе (АОАС Official Method 983.13). Низкая эффективность разделения кислот в сочетании с объективными сложностями работы с

**Цель** и назначение Аналитического комплекта Органические кислоты в соках концентрированными солевыми растворами в качестве элюентов снижает ценность последнего подхода.

В предлагаемом Аналитическом комплекте реализован способ *высокоэффективного* изократического ВЭЖХ-разделения нормируемых органических кислот в общей пробе сока также на двух последовательно соединенных колонках с отечественным сферическим сорбентом ДИАСФЕР-С18 (ЗАО “БиоХимМак СТ”) с традиционной для обращенно-фазной хроматографии концентрацией фосфатного буфера. Это позволяет использовать любые модели жидкостных хроматографов со спектрофотометрическим (СФД) детектором. Однако для повышения точности определения лимонной кислоты, особенно при низкой ее концентрации в анализируемой пробе, колонки необходимо термостатировать.

*Метод обладает следующими характерными особенностями:*

- Подготовка (очистка) проб продуктов методом твердофазной экстракции на многофазных патронах ДИАПАК-С16М (ЗАО “БиоХимМак СТ”) с предварительным центрифугированием консистентных образцов;
- ВЭЖХ-разделение органических кислот в изократическом режиме на двух последовательно соединенных аналитических колонках ДИАСФЕР-110-(С18+С18NT) с использованием любого жидкостного хроматографа, снабжённого СФД (область детектирования 210-220 нм);
- Термостатирование ВЭЖХ-колонок при +18°С для точного анализа низких концентраций лимонной кислоты .

---

## II. Состав комплекта<sup>1</sup>

1. Концентрирующие патроны ДИАПАК-С16М (ТУ 4215-002-05451931-94) для пробоподготовки методом твердофазной экстракции 100 единичных проб - 20 шт.
2. Аналитическая ВЭЖХ-колонка ДИАСФЕР-С18 (ТУ 4215-001-05451931-94);  $d_p= 5-7$  мкм; 150× 4,6 мм - 1 шт.
3. Аналитическая ВЭЖХ-колонка ДИАСФЕР-С18NT (ТУ 4215-001-05451931-94);  $d_p= 5-7$  мкм; 150× 4,6 мм - 1 шт.
4. Набор стандартных образцов (аскорбиновая, лимонная, винная, яблочная) с содержанием основного вещества не менее 99 % по 0.5 г каждого.
5. Инструкция по применению Аналитического комплекта *Органические кислоты в соках*.

## III. Порядок пробоподготовки

1. 10 мл осветленного сока, нектара или сокосодержащего напитка профильтровать через складчатый бумажный фильтр;
  - 10 мл консистентного образца центрифугировать при 3-4 тыс. об/мин в течение 10-15 мин и отобрать осветленный супернатант;
  - К 2.0 г концентрата сока добавить 8.0 г бидистиллированной воды, перемешать и профильтровать через складчатый бумажный фильтр;

---

<sup>1</sup> Примечание.

Общелабораторное оборудование и растворители в состав аналитического комплекта не входят.

#### IV. Количественный анализ

2. Снять заглушку с патрона ДИАПАК-С16М и прокачать при помощи шприца с наконечником типа “Луер” по 5 мл ацетонитрила и *элюента* со скоростью 1-2 капли в секунду, не допуская попадания воздуха на патрон;
  - В тех же условиях прокачать через патрон 5 мл фильтрата или супернатанта. Отбросив 1 мл элюата, собрать оставшийся объем (около 4 мл) очищенного продукта;
3. 2.0 мл подготовленного образца перенести при помощи пипетки в мерную колбу вместимостью 10 мл и довести объем раствора до метки *элюентом*;
4. Для регенерации патрона ДИАПАК-С16М прокачать 10 мл этилового спирта, а непосредственно перед работой по 5 мл ацетонитрила и *элюента* в условиях по п. 2.

### IV. Количественный анализ

#### 1. Приготовление элюента для хроматографического анализа

Навеску 2.4 г натрия фосфорнокислого однозамещенного поместить в мерную колбу на 1 л и растворить в 0.950 л *бидистиллированной* воды. Довести pH раствора до 2.5, добавив по каплям концентрированную фосфорную кислоту, а затем воду до метки. Профильтровать раствор через мембранный фильтр с размером пор не более 0,5 мкм и тщательно дегазировать любым способом (*элюент*).

#### 2. Подготовка хроматографической системы

Собрать систему, включающую:

- Изократический хроматограф, снабженный ручным или автоматическим инжектором с петлей объемом 50 мкл;
- СФД с возможностью детектирования на длинах волн 210-220 нм. Например, “Knauer”(Германия), модель K-2501, Госреестр средств измерений РФ № 24632-03;
- Две последовательно соединенные аналитические колонки ДиАСФЕР-110-(C18NT +C18);
- При необходимости - термостат с возможностью термостатирования колонок при +18°C.

Прокачивать *элюент* через хроматографическую систему со скоростью 0.6 мл/мин до стабилизации базовой линии СФД.

### 3. Градуировка хроматографической системы

При градуировке хроматографической системы использовать рабочие растворы *в элюенте* смеси органических кислот с концентрациями в диапазоне 0.1-1.0 мг/мл.

Для приготовления рабочих растворов навески стандартных образцов (п. II) массой 0.1 г поместить в одну мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки *элюентом* (концентрация 1 мг/мл каждого компонента). При последующих разведениях аликвот приготовленного раствора также использовать *элюент*.

Градуировку стабилизированной по п. IV.2 хроматографической системы осуществлять последовательным вводом не менее 2 раз рабочих растворов в объеме 50 мкл, начиная с раствора наименьшей концентрации. После записи градуировочных хроматограмм провести математическую обработку с фиксацией площадей пиков и времен удерживания компонентов и построить

#### IV. Количественный анализ

градуировочные зависимости. Ориентировочные времена удерживания винной, яблочной, аскорбиновой и лимонной кислот составляют 8, 12, 15 и 24 мин, соответственно.

#### 4. Количественный анализ образцов

Ввести в стабилизированную хроматографическую систему 50 мкл подготовленного по п. III образца не менее 2 раз. После записи хроматограммы идентифицировать по временам удерживания и определить площади пиков органических кислот. С использованием градуировочных зависимостей рассчитать массовую концентрацию компонентов в анализируемом образце, а с учетом разведения (1:5-для соков и 1:25-для концентратов) – их массовую концентрацию в исходном продукте. При необходимости определения высоких концентраций аскорбиновой кислоты кратность разведения образца может быть увеличена.

Разработал \_\_\_\_\_/Г.Г.Васяров/

\_\_\_\_\_ /Г.С.Алексеева/

“ \_\_\_ “ \_\_\_\_\_ 2003 г.





Закрытое Акционерное Общество “**БиоХимМак СТ**”

Россия, 119899, Москва, Ленинские горы ,

МГУ им. М.В. Ломоносова

тел./факс (095) 939-59-67, 939-58-06 /офис/

939-36-66 /лаборатория/

Е-mail: [bcmst@bcm.chem.msu.ru](mailto:bcmst@bcm.chem.msu.ru)