ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53185— 2008

НАПИТКИ БЕЗАЛКОГОЛЬНЫЕ И СЛАБОАЛКОГОЛЬНЫЕ ТОНИЗИРУЮЩИЕ

Методы испытания

Издание официальное

БЗ 2—2009/707

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 группой специалистов Некоммерческой организации «Национальный фонд защиты потребителей» при участии НИИ питания РАМН, ООО «Ред Булл», ООО «ПепсиКо Холдингс», ООО «Хэппилэнд», ООО «Браво-Премиум»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. № 635-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, 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 Отбор проб . . . 2
4 Методы определения компонентов . . . 2
4.1 Метод определения таурина . . . 2
4.2 Метод определения глюкуронолактона . . . 7
4.3 Метод определения инозита . . . 11
4.4 Метод определения L-карнитина . . . 14
4.5 Метод определения схизандрина . . . 18
4.6 Метод определения элеутерозидов . . . 22
4.7 Метод определения гинсенозидов . . . 27
4.8 Метод определения кофеина . . . 31
4.9 Метод определения витамина B_3 (ниацина) . . . 34
4.10 Метод определения витамина B_5 (пантотеновой кислоты) . . . 38
4.11 Метод определения витамина B_6 (пиридоксина гидрохлорида) . . . 41
Библиография . . . 45

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

НАПИТКИ БЕЗАЛКОГОЛЬНЫЕ И СЛАБОАЛКОГОЛЬНЫЕ ТОНИЗИРУЮЩИЕ

Методы испытания

Alcohol-free and low-alcoholic tonic beverages.
Test methods

Дата введения — 2010—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы контроля содержания тонизирующих компонентов и биологически активных веществ, которые обеспечивают функциональное действие напитков безалкогольных тонизирующих и напитков слабоалкогольных тонизирующих.

Настоящий стандарт не распространяется на чай, кофе, безалкогольные напитки на основе чайных и кофейных экстрактов.

Настоящий стандарт устанавливает в напитках безалкогольных тонизирующих и напитках слабоалкогольных тонизирующих следующие методы контроля:

- метод определения кофеина;
- метод определения таурина;
- метод определения глюкуронолактона;
- метод определения инозита;
- метод определения L-карнитина;
- метод определения схизандрина;
- метод определения элеутерозидов;
- метод определения гинсенозидов;
- метод определения витаминов: B_3 (ниацин), B_5 (пантотеновая кислота), B_6 (пиридоксин гидрохлорид).

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 ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

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

Издание официальное

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4172—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4199—76 Реактивы. Натрий тетраборнокислый 10-водный. Технические условия

ГОСТ 4206—75 Реактивы. Калий железосинеродистый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5789—78 Реактивы. Толуол. Технические условия

ГОСТ 6552—80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6687.0—86 Продукция безалкогольной промышленности. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995—77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 10652—73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N, N, N', N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б). Технические условия

ГОСТ 12069—90 Меры длины штриховые брусковые. Технические условия

ГОСТ 18270—72 Кислота уксусная особой чистоты. Технические условия

ГОСТ 18704—78 Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 19710—83 Этиленгликоль. Технические условия

ГОСТ 19814—74 Кислота уксусная синтетическая и регенерированная. Технические условия

ГОСТ 20903—75 Кюветы прямоугольные кварцевые для спектрофотометров. Основные размеры. Технические требования

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

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, 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 Отбор проб

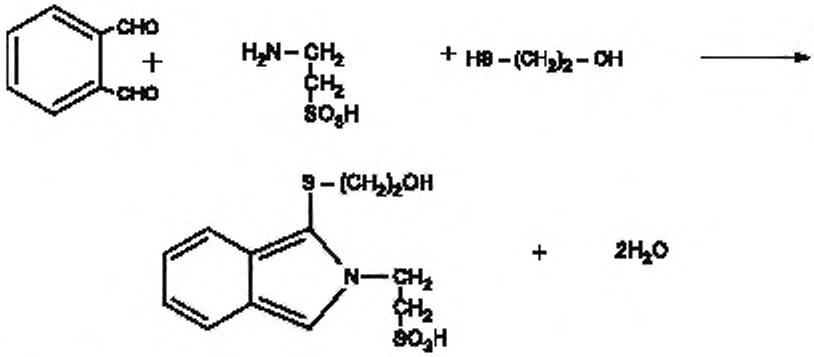
3.1 Отбор проб безалкогольных и слабоалкогольных тонизирующих напитков — по ГОСТ 6687.0.

4 Методы определения компонентов

4.1 Метод определения таурина

4.1.1 Сущность метода

Определение таурина основывается на предколоночной дериватизации с ортофталевым альдегидом в присутствии меркаптопропионовой кислоты «ОРА» и последующем хроматографическом разделении с помощью обращенно фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ). Детектирование ОРА дериватов проводят на спектрофотометрическом детекторе при λ = 338 нм или флуорометрическом детекторе при λex = 340 нм и λem = 450 нм.



4.1.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерений должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\,\%}_{-15\,\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

4.1.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Хроматограф жидкостной, оснащенный насосом высокого давления со скоростью подачи растворителя от 0,1 до 5,0 $см^3$/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки — 250 мм, диаметр — 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем, размером частиц 5 мкм.

Флуориметрический детектор: спектральный диапазон 200—600 нм, спектр излучения 320—800 нм.

Спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы: диапазон длин волн от 190 до 950 нм.

Таурин с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Бумажные фильтры «синяя лента».

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Ультразвуковая установка с частотой ультразвука 43—45 кГц.

Аппарат для встряхивания проб.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,0001 г.

Колбы мерные 2-10-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Стаканы химические вместимостью 50 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Виалы (емкости для жидкостных проб) — плоскодонные микропробирки с завинчивающимися крышками объемом 1,5 $см^3$.

Ацетонитрил для ВЭЖХ.

pH-метр с диапазоном измерений от 2 до 18 ед. pH, погрешность измерений ± 0,01 ед. pH.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Бумага фильтровальная с размером пор 0,5 мкм по ГОСТ 12069.

Мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

О-фталевый альдегид с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %.

3-меркаптопропионовая кислота с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Натрия ацетат трехводный х. ч.

Ледяная уксусная кислота х. ч. по ГОСТ 19814.

Соляная кислота концентрированная х. ч. по ГОСТ 3118.

Тетраборат натрия (декагидрат) по ГОСТ 4199.

Метанол ч. д. а. по ГОСТ 6995.

Натрия гидроокись (гидроксид натрия) ч. д. а. по ГОСТ 4328.

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

4.1.4 Приготовление растворов

4.1.4.1 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3

Осторожно помещают 8,5 см^3 концентрированной соляной кислоты с плотностью 1,1 г/см^3 в мерный стакан вместимостью 1000 см^3, до половины заполненный дистиллированной водой. Перемешивают и доводят объем до 1000 см^3.

4.1.4.2 Приготовление раствора уксусной кислоты массовой долей 1 %—2 %

1—2 г ледяной уксусной кислоты помещают в мерную колбу на 100 см^3, наполовину заполненную дистиллированной водой, доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

4.1.4.3 Приготовление подвижной фазы

Для приготовления подвижной фазы А молярной концентрацией 0,02 моль/дм^3 в стакан вместимостью 1000 см^3 помещают (1,360 ± 0,025) г тригидроацетата натрия, добавляют 500 см^3 дистиллированной воды, доводят pH до 6,6 (контролируют pH-метром) с помощью раствора уксусной кислоты массовой долей 1 %—2 %. Полученный раствор фильтруют через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. В качестве подвижной фазы В используют ацетонитрил. Раствор хранят в темном прохладном месте не более трех недель.

4.1.4.4 Приготовление раствора ОРА массовой концентрацией 5 мг/см^3

150 мг о-фталевого альдегида растворяют в 3 см^3 метанола в мерной колбе вместимостью 25 см^3, добавляют 120 мм^3 3-меркаптопропионовой кислоты и доводят объем до 25 см^3 водным раствором боратного буфера молярной концентрацией 0,4 моль/дм^3 (0,4 Н) с pH = 10,4 (приготовление раствора см. ниже). Раствор хранят в темном прохладном месте не более трех недель.

4.1.4.5 Приготовление раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 1 моль/дм^3 (1 Н)

Навеску гидроксида натрия массой (4,0 ± 0,1) г растворяют дистиллированной водой, не содержащей углекислого газа, в мерной колбе объемом 1 дм^3, раствор доводят водой до метки. Раствор можно приготовить из стандарт-титра.

4.1.4.6 Приготовление боратного буфера молярной концентрацией 0,4 моль/дм^3 (0,4 Н)

76 г натрия тетрабората (декагидрат) помещают в стакан вместимостью 1000 см^3, добавляют 1000 см^3 дистиллированной воды и прибавляют раствор гидрооксида натрия молярной концентрацией 1 моль/дм^3 (1Н) до (10,4 + 0,05) ед. pH. Полученный раствор фильтруют через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Раствор хранят в темном прохладном месте не более трех недель.

4.1.4.7 Приготовление стандартных градуировочных растворов таурина

Стандартные градуировочные растворы таурина готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы таурина хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навеску таурина массой 50 мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, до половины заполненную раствором соляной кислоты молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 (0,1 Н), перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают.

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

Таблица 1 — Приготовление стандартных градуировочных растворов таурина

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, см^3	Способ приготовления	Массовая концентрация, мг/дм^3
1	1 (основной)	100	Навеску таурина массой 50 мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, до половины заполненную раствором соляной кислоты молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3 (0,1 Н), перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	500

Окончание таблицы 1

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, $см^3$	Способ приготовления	Массовая концентрация, $мг/дм^3$
2	2	25	Отбирают 10 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	200
3	3	25	Отбирают 5 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	100
4	4	25	Отбирают 0,5 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	10
Примечание — Раствор № 4 используют в качестве одного из контрольных растворов в повседневных анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию таурина в анализируемых пробах.				

4.1.5 Подготовка образца к анализу

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 $см^3$ и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка 10 $см^3$ помещают в мерную колбу вместимостью 250 $см^3$, доводят раствором соляной кислоты молярной концентрацией 0,1 моль/$дм^3$ (0,1 Н) до метки и тщательно перемешивают. Фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента», затем через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

4.1.6 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.1.6.1 Условия хроматографического анализа

Условия хроматографического анализа:

колонка по 4.1.3.2;

подвижная фаза в процентах по объему: 85 % тригидроацетата натрия молярной концентрацией 0,02 моль/$дм^3$ с pH 6,6 (фаза А) и 15 % ацетонитрила (фаза В);

скорость подвижной фазы 1,0 $см^3$/мин;

детектирование: УФ λ = 338 нм (рефрактометрическое λ = 390 нм) и по флуоресценции: при λex = 340 нм и λem = 450 нм.

При использовании инжектора предколоночную дериватизацию проводят в виалах, с помощью шприца помещают 50 $мм^3$ боратного буфера, 10 $мм^3$ ОРА, 10 $мм^3$ подготовленного образца, перемешивают, набирая в шприц и обратно 5—10 раз, и вводят пробу 10 $мм^3$. Вводить пробу необходимо сразу же, так как ОРА комплексы не стойкие и разрушаются в течение 2—5 мин.

4.1.6.2 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов таурина.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации таурина 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

$$y = kx. \quad (1)$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (1) следует, что площадь пиков градуировочных растворов таурина S (mV · с или V · с) и их массовая концентрация c (мг/$дм^3$) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \quad (2)$$

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

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \quad (3)$$

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

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм^3.

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

4.1.6.3 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.1.5. Каждую пробу продукта 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 таурина. В случае, если площадь пика выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую менее или более разбавленную пробу и анализ повторяют.

4.1.7 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию таурина в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c\,(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1}, \quad (4)$$

или по формуле с использованием стандартного градуировочного раствора таурина

$$c\,(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \quad (5)$$

где S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

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

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

V_1 — объем пробы, отобранный для измерения, см^3;

$c\,(X)$ — массовая концентрация таурина в анализируемой пробе, мг/дм^3;

$c_{ст}$ — массовая концентрация таурина в стандартном растворе, мг/дм^3;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя способами (программно-аппаратным и расчетным) должны сходиться.

4.1.8 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2|}{(X_1 + X_2)} \cdot 100 \le r_{отн}, \quad (6)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм^3;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (7)$$

где $R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм^3.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0{,}95$ относительная погрешность измерений $\pm\,\delta$ % не должна превышать

значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta)\ \text{мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0{,}95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3;

$\pm\,\Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм^3, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \qquad (8)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$).

4.1.9 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости с пределом повторяемости, приведенным в таблице 2.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \qquad (9)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.1.10 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации таурина

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации таурина при $P = 0{,}95$ приведены в таблице 2.

Таблица 2

Метрологическая характеристика ($P = 0{,}95$)	Значение	
Диапазон измерений, мг/дм^3	От 1 до 500 включ.	Св. 500 до 5000
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	17	11
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	25	13
Границы относительной погрешности $\pm\,\delta$, %	18	9

4.2 Метод определения глюкуронолактона

4.2.1 Сущность метода

Метод основан на идентификации и количественном определении D-глюкуроно-γ-лактона с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением рефрактометрического и ультрафиолетового детектирования.

4.2.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерений должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\,\%}_{-15\,\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией. Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

4.2.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Жидкостной хроматограф с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5 см^3/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки — 250 мм, диаметр — 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем размером частиц 5 мкм.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки — 300 мм, диаметр — 7,8 мм, с катионитом в форме Са++ на основе сульфированного стиролдивинилбензола в ионной кальциевой форме (8 %).

Рефрактометрический детектор: предел детектирования по глюкозе < $1 \cdot 10^{-5}$ г.

Термостат колонок: температурный диапазон от 10 °С до 80 °С.

Спектрофотометрический детектор: диапазон длин волн от 190 до 950 нм.

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Ультразвуковая установка с частотой ультразвука 43—45 кГц.

Аппарат для встряхивания проб.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Ацетонитрил для ВЭЖХ.

Шкаф сушильный, обеспечивающий нагрев до 150 °С.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Бумага фильтровальная с размером пор 0,5 мкм по ГОСТ 12069.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

D-глюкуроно-γ-лактон кристаллический с содержанием основного вещества не менее 99,9 %.

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

4.2.4 Подготовка к анализу

4.2.4.1 Приготовление стандартных градуировочных растворов D-глюкуроно-γ-лактона

Стандартные градуировочные растворы D-глюкуроно-γ-лактона готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы D-глюкуроно-γ-лактона хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навеску D-глюкуроно-γ-лактона массой 75 мг помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3, до половины заполненную дистиллированной водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают.

Для приготовления градуировочных растворов №№ 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуировочного раствора № 1 в соответствии с таблицей 3, помещают их в мерные колбы и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивая.

Таблица 3 — Приготовление стандартных градуировочных растворов D-глюкуроно-γ-лактона

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, см^3	Способ приготовления	Массовая концентрация, мг/дм^3
1	1 (основной)	25	Навеску D-глюкуроно-γ-лактона массой 75 мг помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3, до половины заполненную дистиллированой водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	3000
2	2	25	Отбирают 5 см^3 раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	600
3	3	25	Отбирают 2 см^3 раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	240
4	4	25	Отбирают 0,5 см^3 раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	60
Примечание — Раствор № 3 используют в качестве одного из контрольных растворов в текущих анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию D-глюкуроно-γ-лактона в анализируемых пробах.				

4.2.4.2 Подготовка образца

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 см³ и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка в 10 см³ помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр с размером пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр.

4.2.5 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.2.5.1 Приготовление подвижной фазы

550 см³ ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтровальную бумагу с диаметром пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в установке для фильтрования растворов.

4.2.5.2 Условия хроматографического анализа

Условия ВЭЖХ при анализе энергетических напитков:

колонка по 4.2.3.2;

подвижная фаза ацетонитрил-вода (55:45) в процентах по объему;

скорость потока 1,0 см³/мин;

детектор спектрофотометрический, длина волны $\lambda = 210$ нм;

аликвота, вводимая в инжектор, 10—15 мкл;

ориентировочное время D-глюкуроно-γ-лактона (3,9 ± 0,3) мин.

4.2.5.3 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов D-глюкуроно-γ-лактона.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации D-глюкуроно-γ-лактона 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

$$y = kx. \tag{10}$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (10) следует, что площадь пиков градуировочных растворов D-глюкуроно-γ-лактона S (mV · с или V · с) и их массовая концентрация c (мг/дм³) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \tag{11}$$

где k — градуировочный коэффициент, [мг/дм³/mV · с]⁻¹.

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \tag{12}$$

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

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм³.

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

4.2.5.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.2.4.2. Каждую пробу продукта 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 D-глюкуроно-γ-лактона. В случае, если площадь пика выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую менее или более разбавленную пробу и анализ повторяют.

4.2.6 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию D-глюкуроно-γ-лактона в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1} \quad (13)$$

или по формулам с использованием стандартного градуировочного раствора D-глюкуроно-γ-лактона

$$c(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \quad (14)$$

где $c(X)$ — массовая концентрация D-глюкуроно-λ-лактона в анализируемой пробе, мг/дм^3;

S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

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

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

V_1 — объем пробы, отобранный для измерения, см^3;

$c_{ст}$ — массовая концентрация D-глюкуроно-γ-лактона в стандартном растворе, мг/дм^3;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя способами (программно-аппаратным и расчетным) должны сходиться.

4.2.7 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r_{отн}, \quad (15)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм^3;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (16)$$

где $R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм^3.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0{,}95$ относительная погрешность измерений $\pm\,\delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta) \text{ мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0{,}95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3;

$\pm\,\Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм^3, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \quad (17)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$).

4.2.8 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости с пределом повторяемости, приведенным в таблице 4.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \quad (18)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.2.9 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации D-глюкуроно-γ-лактона

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации D-глюкуроно-γ-лактона при $P = 0,95$ приведены в таблице 4.

Таблица 4

Метрологическая характеристика ($P = 0,95$)	Значение	
Диапазон концентраций, мг/дм^3	От 10 до 1000 включ.	Св. 1000 до 5000
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	30	11
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	35	15
Границы относительной погрешности ± δ, %	25	11

4.3 Метод определения инозита

4.3.1 Сущность метода

Метод основан на идентификации и количественном определении инозита с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

4.3.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\ \%}_{-15\ \%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

4.3.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Жидкостной хроматограф с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5 см^3/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки 250 мм, диаметр 4,6 мм, на основе ковалентной сшивки аминосилана к поверхности силикагеля, размер частиц 5 мкм.

Рефрактометрический детектор: предел детектирования по глюкозе < $1 \cdot 10^{-5}$ г.

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Ацетонитрил для ВЭЖХ.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Бумага фильтровальная с размером пор 0,5 мкм по ГОСТ 12069.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Установка для фильтрования растворов.

Шкаф сушильный, обеспечивающий нагрев до 150 °С.

Инозит кристаллический с массовой долей основного вещества не менее 99,0 % или по действующей нормативно-технической документации.

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

4.3.4 Приготовление растворов

4.3.4.1 Приготовление стандартных градуировочных растворов инозита

Стандартные градуировочные растворы инозита готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы инозита хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навеску инозита массой 100 мг помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, до половины заполненную дистиллированной водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают.

Для приготовления градуировочных растворов №№ 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуировочного раствора № 1 в соответствии с таблицей 5, помещают их в мерные колбы и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивая.

Таблица 5 — Приготовление стандартных градуировочных растворов инозита

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, см^3	Способ приготовления	Массовая концентрация, мг/дм^3
1	1 (основной)	50	Навеску инозита массой 100 мг помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, до половины заполненную дистиллированой водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	2000
2	2	25	Отбирают 10 см^3 раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	800
3	3	25	Отбирают 5 см^3 раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	400
4	4	25	Отбирают 1 см^3 раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	80
Примечание — Раствор № 2 используют в качестве одного из контрольных растворов в текущих анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию инозита в анализируемых пробах.				

4.3.4.2 Подготовка образца

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 см^3 и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка в 10 см^3 помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр с размером пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр.

4.3.5 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.3.5.1 Приготовление подвижной фазы

770 см^3 ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтровальную бумагу с диаметром пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в установке для фильтрования растворов.

4.3.5.2 Условия хроматографического анализа

Условия ВЭЖХ:

колонка по 4.3.3.2;

подвижная фаза ацетонитрил-вода (77:23) в процентах по объему,

скорость подвижной фазы 1,0 см^3/мин,

аликвота, вводимая в инжектор 10—15 мкл.

Ориентировочное время удерживания инозита (10,0 ± 0,2) мин.

4.3.5.3 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов инозита.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации инозита 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

$$y = kx. \quad (19)$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (19) следует, что площадь пиков градуировочных растворов инозита S (mV · с или V · с) и их массовая концентрация c (мг/дм^3) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \quad (20)$$

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

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \quad (21)$$

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

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм^3.

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

4.3.5.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.2.4.2. Каждую пробу продукта 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 инозита. В случае, если площадь пика выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую менее или более разбавленную пробу и анализ повторяют.

4.3.6 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию инозита в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных с использованием градуировочной зависимости

$$c(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1}, \quad (22)$$

или по формулам с использованием стандартного градуировочного раствора инозита

$$c(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \quad (23)$$

где $c(X)$ — массовая концентрация инозита в анализируемой пробе, мг/дм^3;

S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

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

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

V_1 — объем пробы, отобранный для измерения, см^3;

$c_{ст}$ — массовая концентрация инозита в стандартном растворе, мг/дм^3;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя способами (программно-аппаратным и расчетным) должны сходиться.

4.3.7 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r_{отн}, \quad (24)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм^3;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (25)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм^3;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0,95$ относительная погрешность измерений $\pm \delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta) \text{ мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0,95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3;

$\pm \Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм^3, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \quad (26)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$).

4.3.8 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости с пределом повторяемости, приведенным в таблице 6.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \quad (27)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (5.3.4).

4.3.9 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации инозита

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации инозита при $P = 0,95$ приведены в таблице 6.

Таблица 6

Метрологическая характеристика ($P = 0,95$)	Значения	
Диапазон измерений, мг/дм^3	От 20 до 300 включ.	Св. 300 до 1000
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	31	24
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	36	28
Границы относительной погрешности $\pm \delta$, %	26	20

4.4 Метод определения L-карнитина

4.4.1 Сущность метода

Метод основан на идентификации и количественном определении свободного L-карнитина с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением рефрактометрического детектирования.

4.4.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха. . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;
напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\%}_{-15\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

4.4.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Жидкостной хроматограф с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5 см^3/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки 250 мм, диаметр 4,6 мм, на основе ковалентной сшивки аминосилана к поверхности силикагеля, размер частиц 5 мкм.

Рефрактометрический детектор: предел детектирования по глюкозе < $1 \cdot 10^{-5}$ г.

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Ацетонитрил для ВЭЖХ.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Бумага фильтровальная с размером пор 0,5 мкм по ГОСТ 12069.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Установка для фильтрования растворов.

Шкаф сушильный, обеспечивающий нагрев до 150 °С.

L-карнитин гидрохлорид кристаллический с массовой долей основного вещества не менее 98,0 % или по действующей нормативно-технической документации.

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

4.4.4 Приготовление реактивов

4.4.4.1 Приготовление стандартных градуировочных растворов L-карнитина

Стандартные градуировочные растворы L-карнитина готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы L-карнитина хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навеску L-карнитина массой 100 мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, до половины заполненную дистиллированной водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают.

Для приготовления градуировочных растворов №№ 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуировочного раствора № 1 в соответствии с таблицей 7, помещают их в мерные колбы и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивая.

Таблица 7 — Приготовление стандартных градуировочных растворов L-карнитина

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, см^3	Способ приготовления	Массовая концентрация, мг/дм^3
1	1 (основной)	100	Навеску L-карнитина массой 100 мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, до половины заполненную дистиллированной водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	1000
2	2	25	Отбирают 10 см^3 раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	400

Окончание таблицы 7

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, $см^3$	Способ приготовления	Массовая концентрация, $мг/дм^3$
3	3	25	Отбирают 2 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	80
4	4	25	Отбирают 1 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	40
Примечание — Раствор № 4 используют в качестве одного из контрольных растворов в повседневных анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию L-карнитина в анализируемых пробах.				

4.4.4.2 Подготовка образца

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 $см^3$ и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка в 5 $см^3$ помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр с размером пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр.

4.4.5 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.4.5.1 Приготовление подвижной фазы

750 $см^3$ ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтровальную бумагу с диаметром пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в установке для фильтрования растворов.

4.4.5.2 Условия хроматографического анализа

Условия ВЭЖХ:

колонка по 4.4.3.2;

подвижная фаза ацетонитрил-вода (75:25) в процентах по объему;

скорость подвижной фазы 1,0 $см^3$/мин;

объем раствора, вводимого в инжектор 10—15 мкл.

Ориентировочное время удерживания L-карнитина (8,6 ± 0,2) мин.

4.4.5.3 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов L-карнитина.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации L-карнитина 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

$$y = kx. \tag{28}$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (28) следует, что площадь пиков градуировочных растворов L-карнитина S (mV · с или V · с) и их массовая концентрация c ($мг/дм^3$) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \tag{29}$$

где k — градуировочный коэффициент, [$мг/дм^3$/mV · с].

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \tag{30}$$

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

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм^3.

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

4.4.5.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.4.4.2. Каждую пробу продукта 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 L-карнитина. В случае, если площадь пика выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую менее или более разбавленную пробу и анализ повторяют.

4.4.6 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию L-карнитина в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c\,(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1} \qquad (31)$$

или по формуле с использованием стандартного градуировочного раствора L-карнитина

$$c\,(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \qquad (32)$$

где $c\,(X)$ — массовая концентрация L-карнитина в анализируемой пробе, мг/дм^3;

S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

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

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

V_1 — объем пробы, отобранный для измерения, см^3;

$c_{ст}$ — массовая концентрация L-карнитина в стандартном растворе, мг/дм^3;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя методами (программно-аппаратным и расчетным) должны совпадать.

4.4.7 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r_{отн}, \qquad (33)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм^3;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости:

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \qquad (34)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм^3;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0{,}95$ относительная погрешность измерений $\pm\,\delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta)\ \text{мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0{,}95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3;

$\pm\Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм^3, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \qquad (35)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$).

4.4.8 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, с пределом повторяемости, приведенным в таблице 8.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \qquad (36)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.4.9 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации L-карнитина

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации L-карнитина при $P = 0{,}95$ приведены в таблице 8.

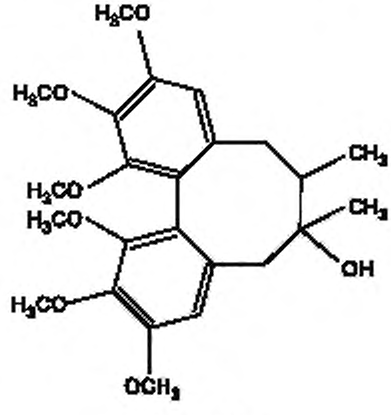
Таблица 8

Метрологическая характеристика ($P = 0{,}95$)	Значения	
Диапазон измерений, мг/дм^3	От 10 до 500 включ.	Св. 500 до 2000
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	36	24
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	41	29
Границы относительной погрешности $\pm\delta$, %	30	20

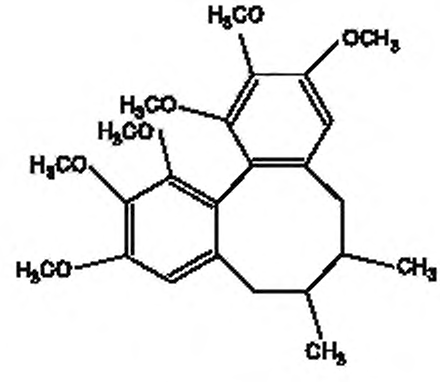
4.5 Метод определения схизандрина

4.5.1 Сущность метода

Определение схизандрина и γ-схизандрина в напитках проводится методом ВЭЖХ с фотометрическим детектированием при длине волны $\lambda = 254$ нм.



Схизандрин



γ-Схизандрин

4.5.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерений должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\ \%}_{-15\ \%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

4.5.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Хроматограф жидкостной, оснащенный насосом высокого давления со скоростью подачи растворителя от 0,1 до 5,0 $см^3$/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки 250 мм, диаметр 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем размером частиц 5 мкм.

Спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы, диапазон длин волн от 190 до 950 нм.

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Ультразвуковая установка с частотой ультразвука 43—45 кГц.

Аппарат для встряхивания проб.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,001 г.

pH-метр с диапазоном измерений от минус 2 до 18 ед. pH с абсолютной погрешностью измерений ± 0,01 ед. pH.

Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Стаканы химические вместимостью 50 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Ацетонитрил для ВЭЖХ ч.

Бумажные фильтры «синяя лента».

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Патрон Диапак С18.

Мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Схизандрин с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %.

Гамма-схизандрин с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %.

Метанол ч. д. а. по ГОСТ 6995.

Трифторуксусная кислота х. ч. ГОСТ 18270.

4.5.4 Приготовление реактивов

4.5.4.1 Приготовление стандартных градуировочных растворов схизандрина и γ-схизандрина

Стандартные градуировочные растворы схизандрина и γ-схизандрина готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы схизандрина и γ-схизандрина хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навески схизандрина и γ-схизандрина массой 10 мг помещают в мерные колбы вместимостью 50 $см^3$, до половины заполненные метанолом, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают.

Для приготовления градуировочных растворов №№ 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуировочного раствора № 1 в соответствии с таблицей 9, помещают их в мерные колбы и доводят метанолом до метки, тщательно перемешивая.

Таблица 9 — Приготовление стандартных градуировочных растворов схизандрина и γ-схизандрина

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, $см^3$	Способ приготовления	Массовая концентрация, $мг/дм^3$
1	1 (основной)	50	Навеску схизандрина и γ-схизандрина массой 10 мг помещают в мерные колбы вместимостью 50 $см^3$, до половины заполненные метанолом, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	200
2	2	25	Отбирают 10 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	80
3	3	25	Отбирают 5 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	40
4	4	25	Отбирают 1 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	8
Примечание — Раствор № 3 используют в качестве одного из контрольных растворов в повседневных анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию схизандрина и γ-схизандрина в анализируемых пробах.				

4.5.4.2 Подготовка образца

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 $см^3$ и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка 10 $см^3$ наносят на патрон Диапак С18, предварительно активированный 10 $см^3$ метилового спирта и 20 $см^3$ дистиллированной воды. Патрон промывают 30 $см^3$ дистиллированной воды. Схизандрины смывают 5 $см^3$ метилового спирта. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента», затем через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

4.5.4.3 Приготовление трифторуксусной кислоты массовой долей 1 %—2 %

1—2 г трифторуксусной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, наполовину заполненную дистиллированной водой, доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

4.5.5 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.5.5.1 Приготовление подвижной фазы

Для приготовления раствора трифторуксусной кислоты с pH 2,5 (подвижная фаза А) 500 $см^3$ дистиллированной воды помещают в стакан вместимостью 500 $см^3$ и доводят pH до 2,5 с помощью трифторуксусной кислоты массовой долей 1 %—2 %. Полученный раствор фильтруют через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. В качестве подвижной фазы В используют ацетонитрил.

4.5.5.2 Условия хроматографического анализа

Условия хроматографического анализа.

колонка по 4.5.3.2;

подвижная фаза: ацетонитрил — трифторуксусная кислота pH 2,5 (73:27) в процентах по объему;

скорость подачи элюента: 1,0 $см^3$/мин;

детектирование: УФλ = 254 нм;

объем пробы 10 $мм^3$;

ориентировочные времена удерживания схизандрина 3,7 и γ-схизандрина 8,8 мин.

4.5.5.3 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов схизандрина и γ-схизандрина.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации схизандрина и γ-схизандрина 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

$$y = kx. \qquad (37)$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (37) следует, что площадь пиков градуировочных растворов схизандрина и γ-схизандрина S (mV · с или V · с) и их массовая концентрация c (мг/дм³) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \tag{38}$$

где k — градуировочный коэффициент, [мг/дм³/mV · с]$^{-1}$.

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \tag{39}$$

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

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм³.

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

4.5.5.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.5.4.2. Каждую пробу продукта 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 пиков схизандрина и γ-схизандрина. В случае, если площадь пиков выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую менее или более разбавленную пробу и анализ повторяют.

4.5.6 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию схизандрина и γ-схизандрина в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных с использованием градуировочной зависимости

$$c(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1}, \tag{40}$$

или по формуле с использованием стандартного градуировочного раствора схизандрина и γ-схизандрина

$$c(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \tag{41}$$

где $c(X)$ — массовая концентрация схизандрина и γ-схизандрина в анализируемой пробе, мг/дм³;

S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

V_2 — объем метилового спирта, которым смыли с патрона образец, см³;

k — градуировочный коэффициент, [мг/дм³/mV · с]$^{-1}$;

V_1 — объем наносимого на патрон образца напитка, см³;

$c_{ст}$ — массовая концентрация схизандрина и γ-схизандрина в стандартном растворе, мг/дм³;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя методами (программно-аппаратным и расчетным) должны совпадать.

4.5.7 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r_{отн}, \tag{42}$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм³;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (43)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм^3;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0{,}95$ относительная погрешность измерений $\pm\,\delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta) \text{ мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0{,}95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3;

$\pm\,\Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм^3, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \quad (44)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$).

4.5.8 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости с пределом повторяемости, приведенным в таблице.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \quad (45)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.5.9 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации схизандрина и γ-схизандрина

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации схизандрина и γ-схизандрина при $P = 0{,}95$ приведены в таблице 10.

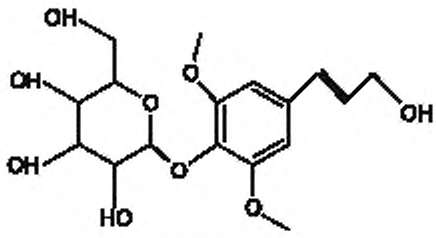
Таблица 10

Метрологическая характеристика ($P = 0{,}95$)	Значения	
Диапазон измерений, мг/дм^3	От 10 до 200 включ.	Св. 200 до 1000
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	35	28
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	43	37
Границы относительной погрешности $\pm\,\delta$, %	30	26

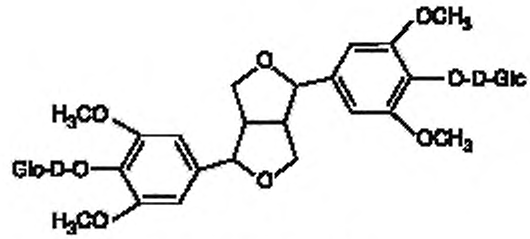
4.6 Метод определения элеутерозидов

4.6.1 Сущность метода

Определение элеутерозидов В и Е в напитках проводится методом ВЭЖХ с фотометрическим детектированием при $\lambda = 215$ нм.



Элеутерозид В



Элеутерозид Е

4.6.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\%}_{-15\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

4.6.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Жидкостной хроматограф с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5 $см^3$/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки 250 мм, диаметр 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем с размером частиц 5 мкм.

Спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы, диапазон длин волн от 190 до 950 нм.

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Ультразвуковая установка с частотой ультразвука 43—45 кГц.

Аппарат для встряхивания проб.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Ацетонитрил для ВЭЖХ.

Бумажные фильтры «синяя лента».

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Патрон Диапак С18.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Элеутерозид В массовой долей основного вещества не менее 96,0 %.

Элеутерозид Е массовой долей основного вещества не менее 97,0 %.

Метанол ч. д. а. по ГОСТ 4199.

Ортофосфорная (фосфорная) кислота массовой долей 85 % по ГОСТ 6552.

4.6.4 Приготовление реактивов

4.6.4.1 Приготовление стандартных градуировочных растворов элеутерозидов Е и В

Стандартные градуировочные растворы элеутерозидов Е и В готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы элеутерозидов Е и В хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навески элеутерозидов Е и В массой 10 мг помещают в мерные колбы вместимостью 50 $см^3$, до половины заполненные метанолом, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают.

Для приготовления градуировочных растворов №№ 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуировочного раствора № 1 в соответствии с таблицей 11, помещают их в мерные колбы и доводят метанолом до метки, тщательно перемешивая.

Таблица 11 — Приготовление стандартных градуировочных растворов

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, $см^3$	Способ приготовления	Массовая концентрация, $мг/дм^3$
1	1 (основной)	50	Навеску элеутерозидов Е и В массой 10 мг помещают в мерные колбы вместимостью 50 $см^3$, до половины заполненные метанолом, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	200
2	2	25	Отбирают 10 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	80
3	3	25	Отбирают 5 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	40
4	4	25	Отбирают 1 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	8
Примечание — Раствор № 3 используют в качестве одного из контрольных растворов в повседневных анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию элеутерозидов Е и В в анализируемых пробах.				

4.6.4.2 Подготовка образца

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 $см^3$ и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка 20 $см^3$ наносят на патрон Диапак С18, предварительно активированный 10 $см^3$ метилового спирта и 20 $см^3$ дистиллированной воды. Патрон промывают 30 $см^3$ дистиллированной воды. Элеутерозиды смывают 5 $см^3$ метилового спирта. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента», затем через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

4.6.4.3 Приготовление раствора 1 %—2 % фосфорной кислоты

1—2 г фосфорной кислоты помещают в мерную колбу на 100 $см^3$, наполовину заполненную дистиллированной водой, доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

4.6.5 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.6.5.1 Приготовление подвижной фазы

Для приготовления раствора фосфорной кислоты с pH 2,5 500 $см^3$ дистиллированной воды помещают в стакан и доводят pH до 2,5 с помощью 1 %—2 % ортофосфорной кислоты. Полученный раствор фильтруют через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (подвижная фаза А). В качестве подвижной фазы В используют ацетонитрил.

4.6.5.2 Условия хроматографического анализа

Условия хроматографического анализа.

колонка по 4.6.3.2;

подвижная фаза:

Длительность, мин	А Раствор H_3PO_4 pH = 2,5, % по объему	В Ацетонитрил, % по объему
0	90	10
2	90	10
20	70	30

скорость подачи элюента 0,8 $см^3$/мин;

детектирование УФ λ = 215 нм;

объем пробы 10 $мм^3$;

ориентировочные времена удерживания элеутерозида В 3,7 мин и элеутерозида Е 8,8 мин.

4.6.5.3 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов элеутерозидов.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации элеутерозидов Е и В 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

$$y = kx. \tag{46}$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (46) следует, что площадь пиков градуировочных растворов элеутерозидов Е и В S (mV · с или V · с) и их массовая концентрация c (мг/дм^3) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \tag{47}$$

где k — градуировочный коэффициент, [мг/дм^3/mV · с].

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \tag{48}$$

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

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм^3.

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

4.6.5.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.5.4.2. Каждую пробу продукта 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 пиков элеутерозидов. В случае, если площадь пиков выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую менее или более разбавленную пробу и анализ повторяют.

4.6.6 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию элеутерозидов Е и В в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c\,(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1} \tag{49}$$

или по формуле с использованием стандартных градуировочных растворов элеутерозидов

$$c\,(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \tag{50}$$

где $c\,(X)$ — массовая концентрация элеутерозидов Е и В в анализируемой пробе, мг/дм^3;

S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

V_2 — объем метилового спирта, которым смыли с патрона образец, см^3;

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

V_1 — объем наносимого на патрон образца напитка, см^3;

$c_{ст}$ — массовая концентрация элеутерозидов Е и В в стандартном растворе, мг/дм^3;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя методами (программно-аппаратным и расчетным) должны совпадать.

4.6.7 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r_{отн}, \quad (51)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм³;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (52)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм³;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0,95$ относительная погрешность измерений $\pm \delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta) \text{ мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0,95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм³;

$\pm \Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм³, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \quad (53)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$).

4.6.8 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости с пределом повторяемости, приведенным в таблице 12.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \quad (54)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.6.9 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации элеутерозидов Е и В

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации элеутерозидов Е и В при $P = 0,95$ приведены в таблице 12.

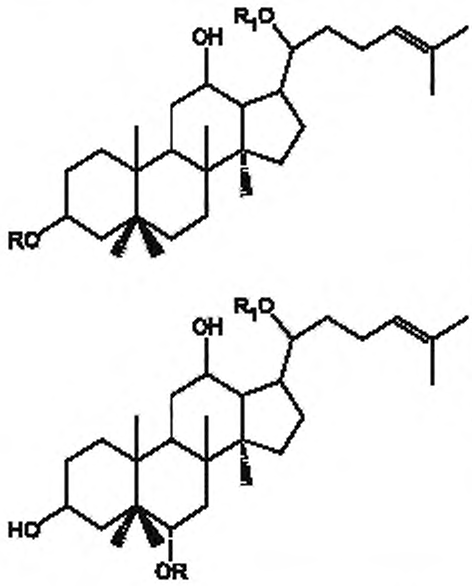
Таблица 12

Метрологическая характеристика ($P = 0,95$)	Значение	
Диапазон измерений, мг/дм³	От 3 до 200 включ.	Св. 200 до 1000
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	51	40
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	59	45
Границы относительной погрешности $\pm \delta$, %	42	32

4.7 Метод определения гинсенозидов

4.7.1 Сущность метода

Определение панаксозидов (гинсенозидов) в напитках проводится методом ВЭЖХ с фотометрическим детектированием при $\lambda = 203$ нм. Для исследования используют следующие панаксозиды:



Название	R	R_1
Rb_1	D-Glc-β-(1→ 2)-D-Glc	D-Glc-β-(1→ 6)-D-Glc
Rb_2	D-Glc-β-(1→ 2)-D-Glc	L-Ara(пираноза)(1→ 6)-D-Glc
Rc	D-Glc-β-(1→ 2)-D-Glc	L-Ara(фураноза)(1→ 6)-D-Glc
Rd	D-Glc-β-(1→ 2)-D-Glc	D-Glc
Rg_1	D-Glc	D-Glc
Re	L-Rha (1→ 6)-D-Glc	D-Glc

4.7.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\,\%}_{-15\,\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

4.7.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы:

Жидкостной хроматограф с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5 $см^3$/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки 250 мм, диаметр 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем размером частиц 5 мкм.

Спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы, диапазон длин волн от 190 до 950 нм.

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Ультразвуковая установка с частотой ульразвука 43—45 кГц.

Аппарат для встряхивания проб.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Ацетонитрил для ВЭЖХ.

Патрон Диапак С18.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Бумага фильтровальная с размером пор 0,5 мкм по ГОСТ 12069.

Бумажные фильтры «синяя лента».

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Панаксозид Rb1 массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.
Панаксозид Rb2 массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.
Панаксозид Rc массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.
Панаксозид Rd массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.
Панаксозид Re массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.
Панаксозид Rg1 массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.

4.7.4 Приготовление реактивов

4.7.4.1 Приготовление стандартных градуировочных растворов гинсенозидов

Стандартные градуировочные растворы гинсенозидов готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы гинсенозидов хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навески гинсенозидов массой 10 мг помещают в мерные колбы вместимостью 50 $см^3$, до половины заполненные метанолом, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают.

Для приготовления градуировочных растворов №№ 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуировочного раствора № 1 в соответствии с таблицей 13, помещают их в мерные колбы и доводят метанолом до метки, тщательно перемешивая.

Таблица 13 — Приготовление стандартных градуировочных растворов

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, $см^3$	Способ приготовления	Массовая концентрация, $мг/дм^3$
1	1 (основной)	50	Навеску гинсенозидов массой 10 мг помещают в мерные колбы вместимостью 50 $см^3$, до половины заполненные метанолом, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	200
2	2	25	Отбирают 10 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	80
3	3	25	Отбирают 5 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	40
4	4	25	Отбирают 1 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят метанолом до метки и тщательно перемешивают	8
Примечание — Раствор № 3 используют в качестве одного из контрольных растворов в повседневных анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию гинсенозидов в анализируемых пробах.				

4.7.4.2 Подготовка образца

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 $см^3$ и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка 20 $см^3$ наносят на патрон Диапак С18, предварительно активированный 10 $см^3$ метилового спирта и 20 $см^3$ дистиллированной воды. Патрон промывают 30 $см^3$ дистиллированной воды. Панаксозиды смывают 5 $см^3$ метилового спирта. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента», затем через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

4.7.5 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.7.5.1 Условия хроматографического анализа

Условия хроматографического анализа:

колонка по 4.7.3.2;

подвижная фаза:

Длительность, мин	Дистиллированная вода, % по объему	Ацетонитрил, % по объему
0	90	10
20	75	25
60	40	60

скорость подачи элюента: 1,0 см³/мин;

детектирование: УФ λ = 215 нм;

объем пробы 10 мм³;

ориентировочные времена удерживания панаксозидов: Rg1 — 24,3; Re — 24,7; Rb1 — 34,5; Rc — 35,5; Rb2 — 36,5; Rd — 38,0 мин.

4.7.5.2 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов гинсенозидов.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации гинсенозидов 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

$$y = kx. \tag{55}$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (55) следует, что площадь пиков градуировочных растворов гинсенозидов S (mV · с или V · с) и их массовая концентрация c (мг/дм³) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \tag{56}$$

где k — градуировочный коэффициент, [мг/дм³/mV · с]$^{-1}$.

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \tag{57}$$

S_i — площадь пика соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, mAU · с или AU · с;

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм³.

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

4.7.5.3 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.7.4.2. Каждую пробу продукта 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 пиков гинсенозидов. В случае, если площадь пиков выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую менее или более разбавленную пробу и анализ повторяют.

4.7.6 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию гинсенозидов в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1}, \tag{58}$$

или по формуле с использованием стандартных градуировочных растворов гинсенозидов

$$c(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \tag{59}$$

где $c(X)$ — массовая концентрация гинсенозида в анализируемой пробе, мг/дм³;

S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

V_2 — объем метилового спирта, которым смыли с патрона образец, см³;

k — градуировочный коэффициент, [мг/дм³/mV · с]$^{-1}$;

V_1 — объем наносимого на патрон образца напитка, см³;

$c_{ст}$ — массовая концентрация гинсенозида в стандартном растворе, мг/дм³;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя методами (программно-аппаратным и расчетным) должны совпадать.

4.7.7 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r_{отн}, \quad (60)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм³;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (61)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм³;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0,95$ относительная погрешность измерений $\pm \delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta) \text{ мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0,95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм³;

$\pm \Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм³, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \quad (62)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$).

4.7.8 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости с пределом повторяемости, приведенным в таблице 14.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \quad (63)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.7.9 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации гинсенозидов

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации гинсенозидов при $P = 0,95$ приведены в таблице 14.

Таблица 14

Метрологическая характеристика ($P = 0,95$)	Значения	
Диапазон концентраций, мг/дм³	От 3 до 200 включ.	Св. 200 до 1000
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	52	40
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	61	47
Границы относительной погрешности $\pm \delta$, %	43	34

4.8 Метод определения кофеина

4.8.1 Сущность метода

Метод основан на идентификации и количественном определении кофеина (пуринового алкалоида) с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением ультрафиолетового детектирования.

4.8.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\%}_{-15\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

4.8.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Жидкостной хроматограф с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5 $см^3$/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки 250 мм, диаметр 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем с размером частиц 5 мкм.

Спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы, диапазон длин волн от 190 до 950 нм.

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Ацетонитрил для ВЭЖХ.

Ледяная уксусная кислота х. ч. по ГОСТ 19814.

Шкаф сушильный, обеспечивающий нагрев до 150 °С.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Бумага фильтровальная с размером пор 0,5 мкм по ГОСТ 12069.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Установка для фильтрования растворов.

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) кристаллический массовой долей основного вещества не менее 99,0 % или по действующей нормативно-технической документации.

4.8.4 Приготовление растворов

4.8.4.1 Приготовление стандартных градуировочных растворов кофеина

Стандартные градуировочные растворы кофеина готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы кофеина хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навеску кофеина массой 40 мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, до половины заполненную дистиллированной водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают.

Для приготовления градуировочных растворов №№ 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуровочного раствора № 1 в соответствии с таблицей 15, помещают их в мерные колбы и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивая.

Таблица 15 — Приготовление стандартных градуировочных растворов кофеина

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, $см^3$	Способ приготовления	Массовая концентрация, $мг/дм^3$
1	1 (основной)	100	Навеску кофеина массой 100 мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, до половины заполненную дистиллированной водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	400
2	2	25	Отбирают 10 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	160
3	3	25	Отбирают 5 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	80
4	4	25	Отбирают 1 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	16
Примечание — Раствор № 2 используют в качестве одного из контрольных растворов в повседневных анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию кофеина в анализируемых пробах.				

4.8.4.2 Подготовка образца

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 $см^3$ и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка в 5 $см^3$ помещают в мерную колбу вместимостью 250 $см^3$, доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и отфильтровывают через бумажный фильтр с размером пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

4.8.5 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.8.5.1 Приготовление подвижной фазы

150 $см^3$ ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, добавляют 10 $см^3$ уксусной кислоты, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтровальную бумагу с диаметром пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

4.8.5.2 Условия хроматографического анализа

Условия ВЭЖХ для анализа кофеина:

подвижная фаза ацетонитрил: дистиллированная вода: уксусная кислота (15:84:1) в процентах по объему;

колонка по 4.8.3.2;

скорость потока 1,0 $см^3/мин$;

детектирование: УФ при длине волны $\lambda = 272$ нм;

вводимый объем пробы 10,0 $мм^3$;

ориентировочное время удерживания кофеина (9,8 ± 0,2) мин.

4.8.5.3 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов кофеина.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации кофеина 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

$$y = kx. \qquad (64)$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (64) следует, что площадь пиков градуировочных растворов кофеина S ($mV \cdot c$ или $V \cdot c$) и их массовая концентрация c ($мг/дм^3$) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \quad (65)$$

где k — градуировочный коэффициент, [мг/дм³/mV · с]

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \quad (66)$$

S_i — площадь пика соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, mAU · с или AU · с;

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм³.

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

4.8.5.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.8.4.2. Каждую пробу продукта 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 кофеина. В случае, если площадь пика выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую, менее или более разбавленную пробу, и анализ повторяют.

4.8.6 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию кофеина в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1}, \quad (67)$$

или по формуле с использованием стандартного градуировочного раствора кофеина

$$c(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \quad (68)$$

где $c(X)$ — массовая концентрация кофеина в анализируемой пробе, мг/дм³;

S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

V_2 — вместимость мерной колбы, взятой для разбавления, см³;

k — градуировочный коэффициент, [мг/дм³/mV · с];

V_1 — объем пробы, отобранный для измерения, см³;

$c_{ст}$ — массовая концентрация кофеина в стандартном растворе, мг/дм³;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя способами (программно-аппаратным и расчетным) должны сходиться.

4.8.7 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r_{отн}, \quad (69)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм³;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (70)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм³;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0,95$ относительная погрешность измерений $\pm \delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta) \text{ мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0,95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3;

$\pm \Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм^3, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \quad (71)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$).

4.8.8 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, с пределом повторяемости, приведенным в таблице 16.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \quad (72)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.8.9 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации кофеина

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации кофеина при $P = 0,95$ приведены в таблице 16.

Таблица 16

Метрологическая характеристика ($P = 0,95$)	Значение	
Диапазон измерений, мг/дм^3	От 1 до 200 включ.	Св. 200 до 5000
Предел повторяемости r, %	27	18
Предел воспроизводимости R, %	33	20
Границы относительной погрешности $\pm \delta$, %	24	14

4.9 Метод определения витамина B_3 (ниацина)

4.9.1 Сущность метода

Метод основан на идентификации и количественном определении витамина B_3 (ниацина) с помощью метода ион-парной ВЭЖХ в изократическом режиме со спектрофотометрическим детектированием.

4.9.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\%}_{-15\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

4.9.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Жидкостной хроматограф с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5 см^3/мин.

Хроматографическая аналитическая колонка: длина колонки 150 мм, диаметр 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем с размером частиц 5 мкм.

Спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы, диапазон длин волн от 190 до 950 нм.

Микрошприц МШ-25 для жидкостной хроматографии.

Баня водяная с терморегулятором с погрешностью ± 1 °С в интервале температур от 25 °С до 100 °С.

Соляная кислота, концентрированная, х. ч. по ГОСТ 3118.

Гептилсульфонат натрия массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-500-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Ниацин ч. д. а. по [1].

Ледяная уксусная кислота х. ч. по ГОСТ 19814.

Триэтиламин.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Метанол ч. д. а. по ГОСТ 6995.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Соляная кислота, концентрированная х. ч. по ГОСТ 3118.

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

4.9.4 Приготовление реактивов

4.9.4.1 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,5 моль/дм^3

К 400 см^3 дистиллированной воды добавляют 20 см^3 концентрированной соляной кислоты (плотностью 1,19 г/см^3), объем раствора доводят до метки в мерной колбе вместимостью 500 см^3.

4.9.4.2 Приготовление стандартных градуировочных растворов ниацина

Стандартные градуировочные растворы ниацина готовят для расчета градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации к большей, из основного стандартного раствора № 1.

Стандартные градуировочные растворы ниацина хранят не более трех месяцев.

Для приготовления градуировочного раствора № 1 (основного) навеску ниацина массой 20 мг количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в растворе соляной кислоты молярной концентрацией 0,5 моль/дм^3 и доводят объем этим же раствором до метки. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Приготовленный раствор можно хранить в холодильнике в течение 2—3 мес.

Для приготовления градуировочных растворов №№ 2—4 отбирают пипетками соответствующие аликвоты градуировочного раствора № 1 в соответствии с таблицей 17, помещают их в мерные колбы и доводят раствором соляной кислоты молярной концентрацией 0,5 моль/дм^3 до метки, тщательно перемешивая.

Таблица 17 — Приготовление стандартных градуировочных растворов ниацина

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, см^3	Способ приготовления	Массовая концентрация, мг/дм^3
1	1 (основной)	100	Навеску ниацина массой 100 мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, до половины заполненную дистиллированой водой, перемешивают до полного растворения вещества, доводят до метки и тщательно перемешивают	200
2	2	25	Отбирают 10 см^3 раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	80

Окончание таблицы 17

№ п/п	№ стандартного раствора	Вместимость мерной колбы, $см^3$	Способ приготовления	Массовая концентрация, $мг/дм^3$
3	3	25	Отбирают 5 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	40
4	4	25	Отбирают 1 $см^3$ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают	8
Примечание — Раствор № 2 используют в качестве одного из контрольных растворов в повседневных анализах, поскольку его массовая концентрация наиболее близка к среднему содержанию ниацина в анализируемых пробах.				

4.9.4.3 Подготовка образца

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 $см^3$ и удаляют газ в токе азота. Аликвоту напитка в 50 см помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и отфильтровывают через бумажный фильтр с размером пор 0,5 мкм или через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

4.9.5 Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

4.9.5.1 Приготовление подвижной фазы

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ добавляют 150—200 $см^3$ дистиллированной воды, 2 г гептилсульфоната натрия, 150 $см^3$ метанола, 10 $см^3$ ледяной уксусной кислоты, 0,4 $см^3$ триэтиламина и доводят объем до метки дистиллированной водой, раствор тщательно перемешивают.

4.9.5.2 Условия хроматографического анализа

Условия ВЭЖХ для анализа ниацина:

подвижная фаза метанол: ледяная уксусная кислота: вода (15:1:84), об. %, содержащая 0,01 моль гептилсульфоната натрия;

колонка по 4.9.3.2;

скорость потока 1,0 $см^3/мин$;

детектирование: УФ при длине волны $\lambda = 262$ нм;

вводимый объем образца 10,0 $мм^3$;

ориентировочное время удерживания ниацина (8,0 ± 0,5) мин.

4.9.5.3 Построение градуировочной зависимости

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов ниацина.

Регистрируют площади пиков и строят градуировочный график — зависимость площади пика от массовой концентрации ниацина 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

$$y = kx. \tag{73}$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R_2)

$$R_2 \geq 0{,}9997.$$

Из уравнения (73) следует, что площадь пиков градуировочных растворов ниацина S (mV · с или V · с) и их массовая концентрация c ($мг/дм^3$) находятся в соответствующей функциональной зависимости

$$c = \frac{S}{k}, \tag{74}$$

где k — градуировочный коэффициент, $[мг/дм^3/mV \cdot с]^{-1}$

$$k = \frac{\Sigma (S_i \cdot c_i)}{\Sigma c_i^2}, \tag{75}$$

S_i — площадь пика соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, mAU · с или AU · с;

c_i — массовая концентрация соответствующего вещества при анализе i-го стандартного раствора, мг/дм^3.

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

4.9.5.4 Анализ проб

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб по 4.9.4.3. Каждую пробу продукта 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 ниацина. В случае, если площадь пика выходит за границы диапазона градуировки хроматографа, готовят новую, менее или более разбавленную пробу, и анализ повторяют.

4.9.6 Обработка результатов определения

Массовую концентрацию ниацина в пробе продукта рассчитывают по градуировочным зависимостям с учетом степени разведения. Вычисления проводят до третьего десятичного знака.

Обработку хроматограмм и расчет количественных характеристик проводят с помощью программно-аппаратного комплекса сбора и обработки данных, с использованием градуировочной зависимости

$$c\,(X) = \frac{S_x \cdot V_2}{k \cdot V_1} \qquad (76)$$

или по формуле с использованием стандартного градуировочного раствора ниацина

$$c\,(X) = \frac{c_{ст} \cdot S_x \cdot V_2}{S_{ст} \cdot V_1}, \qquad (77)$$

где $c\,(X)$ — массовая концентрация ниацина в анализируемой пробе, мг/дм^3;

S_x — площадь пика анализируемого вещества, mV · с или V · с;

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

k — градуировочный коэффициент, [мг/дм^3/mV · с];

V_1 — объем пробы, отобранный для измерения см^3;

$c_{ст}$ — массовая концентрация ниацина в стандартном растворе, мг/дм^3;

$S_{ст}$ — площадь пика анализируемого вещества в стандартном растворе, mV · с или V · с.

Результаты обработки двумя способами (программно-аппаратным и расчетным) должны сходиться.

4.9.7 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r_{отн}, \qquad (78)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм^3;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \qquad (79)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм^3;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0{,}95$ относительная погрешность измерений $\pm\,\delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta)\ \text{мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0{,}95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3;

$\pm\Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм^3, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \qquad (80)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$).

4.9.8 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, с пределом повторяемости, приведенным в таблице 18.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \qquad (81)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.9.9 Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации ниацина

Показатели точности и прецизионности измерений массовой концентрации ниацина при $P = 0{,}95$ приведены в таблице 18.

Таблица 18

Метрологическая характеристика ($P = 0{,}95$)	Значение	
Диапазон измерений, мг/дм^3	От 2 до 200 включ.	Св. 200 до 2000
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	35	26
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	44	35
Границы относительной погрешности $\pm\delta$, %	31	25

4.10 Метод определения витамина B_5 (пантотеновой кислоты)

4.10.1 Сущность метода

Метод основан на колориметрическом определении по реакции пантотеновой кислоты с 2,5-диметокситетрагидрофураном и 4-диметиламинобензальдегидом.

4.10.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\%}_{-15\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

4.10.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

4-Диметиламинобензальдегид массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Пантотеновая кислота массовой долей основного вещества не менее 98,0 %.

Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длинах волн от $\lambda = 200$ нм до $\lambda = 900$ нм, с допускаемой абсолютной погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 %.

Катионит в Н-форме.

Баня водяная с терморегулятором с погрешностью 1 °С в интервале температур от 25 °С до 100 °С.

Соляная кислота концентрированная х. ч. по ГОСТ 3118.

Ледяная уксусная кислота х. ч. по ГОСТ 19814.

2,5-Диметокситетрагидрофуран массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами абсолютной допускаемой погрешности однократного взвешивания не более $\pm$ 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-500-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Натрия гидроокись ч. д. а. по ГОСТ 4328.

Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N'N'-тетрауксусной кислоты, 2-водная (трилон Б, ЭДТА) по ГОСТ 10652.

Пропиленгликоль по ГОСТ 19710.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Спирт изобутиловый ч. д. а. по ГОСТ 6061.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Стакан фарфоровый 150 по ГОСТ 9147.

Колба коническая КН-1-100-14/23 по ГОСТ 25336.

Шейкер лабораторный ЛАБ-ПУ-04.

Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (g-фактор) 800—1500.

Термометр стеклянный ртутный с диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С.

Стаканы химические вместимостью 50 и 1000 см³ по ГОСТ 25336.

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

4.10.4 Приготовление растворов

4.10.4.1 Приготовление раствора гидроокиси натрия массовой концентрацией 0,01 г/см³

1,0 г гидроокиси натрия растворяют в 20—40 см³ дистиллированной воды в фарфоровом стакане, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят объем дистиллированной водой до метки и перемешивают.

4.10.4.2 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,01 моль/дм³

Осторожно помещают 8,5 см³ концентрированной соляной кислоты с плотностью 1,1 г/см³ в мерный стакан вместимостью 1000 см³, до половины заполненный дистиллированной водой. Перемешивают и доводят объем до 1000 см³.

4.10.4.3 Приготовление реагента I

0,5 см³ 2,5-диметокситетрагидрофурана помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 40 см³ ледяной уксусной кислоты, 40 см³ изобутилового спирта, доводят объем до метки ледяной уксусной кислотой и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед проведением испытания.

4.10.4.4 Приготовление реагента II

Точную навеску 4-диметиламинобензальдегида 5 г в мерной колбе вместимостью 250 см³ растворяют в 20 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,01 моль/дм³, доводят объем до метки ледяной уксусной кислотой и перемешивают.

4.10.4.5 Приготовление стандартного раствора пантотеновой кислоты с массовой концентрацией 1,0 мг/см³

Навеску пантотеновой кислоты массой 100 мг количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Приготовленный раствор можно хранить в холодильнике в течение двух — трех месяцев.

4.10.5 Приготовление рабочего стандартного раствора пантотеновой кислоты

Для приготовления рабочего стандартного раствора в мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают аликвоту 1,0 см³ раствора пантотеновой кислоты массовой концентрацией 1,0 мг/см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Массовая концентрация рабочего стандартного раствора пантотеновой кислоты составляет 0,01 мг/см³.

4.10.6 Подготовка к анализу

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 см³ и удаляют газ в токе азота. 25 см³ полученного раствора используют для проведения калориметрической реакции.

4.10.7 Проведение анализа

В конические колбы вместимостью 100 см³ помещают по 25 см³ стандартного рабочего раствора и испытуемого образца, добавляют по 2,0 г катионита в каждую и интенсивно перемешивают на шейкере в течение 10 мин. Затем полученные смеси центрифугируют в течение 5 мин при 1500g. Полученный супернатант используют в ходе дальнейшего исследования.

Аликвоты стандартного рабочего раствора (*St*) пантотеновой кислоты и испытуемого образца (*Sa*) помещают в мерные колбы вместимостью 25 см³.

Состав исследуемых проб и порядок добавления к ним реагентов приведены в таблице 19.

Таблица 19

Реагент	*St*	*Sa*	Контроль
Объем стандартного рабочего раствора пантотеновой кислоты, $см^3$	5,0	—	—
Объем испытуемого образца, $см^3$	—	5,0	—
Объем дистиллированной воды, $см^3$	—	—	5,0
Объем раствора гидроокиси натрия массовой концентрацией 0,01 $г/см^3$, $см^3$	5,0	5,0	5,0

Колбы закрывают пробками и помещают в баню с пропиленгликолем при температуре 85 °С на 15 мин, добавляют в каждую колбу 5,0 $см^3$ раствора реагента I и быстро перемешивают, не вынимая колбы из бани. Через 10 мин после добавления реагента колбы вынимают, тщательно вытирают и помещают в водяную баню при температуре 20 °С. Доводят объем до метки в каждой колбе раствором реагента II. Через 15 мин колбы вынимают и измеряют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре при длине волны $\lambda = 560$ нм, используя в качестве контроля смесь дистиллированной воды и раствора гидроокиси натрия молярной концентрации 0,01 $г/см^3$ в соотношении 1:1.

4.10.8 Обработка результатов

Массовую концентрацию пантотеновой кислоты в напитке X, $мг/дм^3$, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{A_{Sa} \cdot C_{St}}{A_{St}} 1000, \quad (82)$$

где A_{Sa} — оптическая плотность испытуемого раствора;

A_{St} — оптическая плотность стандартного рабочего раствора пантотеновой кислоты;

C_{St} — массовая концентрация стандартного рабочего раствора, $мг/см^3$;

1000 — коэффициент пересчета $см^3$ на $дм^3$.

Вычисления проводят до второго десятичного знака.

4.10.9 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 - X_2)} \le r_{отн}, \quad (83)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, $мг/дм^3$;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (84)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, $мг/дм^3$;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0,95$ относительная погрешность измерений $\pm \delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta)\ \text{мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0{,}95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм^3;

$\pm\,\Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм^3, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \qquad (85)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0{,}95$).

4.10.10 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, с пределом повторяемости, приведенным в таблице.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \qquad (86)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.10.11 Показатели точности и прецизионности массовой концентрации измерений пантотеновой кислоты

Показатели точности и прецизионности измерений пантотеновой кислоты в диапазоне измерений от 5 до 50 мг/дм^3 при $P = 0{,}95$ приведены в таблице 20.

Таблица 20

Метрологическая характеристика ($P = 0{,}95$)	Значение
Диапазон измерений, мг/дм^3	От 5 до 50
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	43
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	56
Границы относительной погрешности $\pm\,\delta$, %	40

4.11 Метод определения витамина B_6 (пиридоксина гидрохлорида)

4.11.1 Сущность метода

Метод основан на колориметрическом определении по реакции пиридоксина гидрохлорида с N-диэтилпарафенилендиамином.

4.11.2 Условия проведения анализа

При подготовке и проведении измерения должны быть соблюдены следующие условия:

температура окружающего воздуха . . . . . от 10 °С до 35 °С;

относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 95 %;

напряжение в электросети . . . . . $220^{+10\%}_{-15\%}$ В.

Помещение, где проводят работы с реактивами, должно быть обеспечено приточно-вытяжной вентиляцией.

Все операции с реактивами следует проводить в вытяжном шкафу.

4.11.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Пробирки стеклянные центрифужные вместимостью до 35 см^3 с плотными пробками.

pH-метр с диапазоном измерений pH от 2 до 18; погрешность измерений $\pm$ 0,01 ед. pH.

Спектрофотометр, обеспечивающий измерения при длинах волн от 200 до 900 нм с допускаемой абсолютной погрешностью измерения коэффициента пропускания не более 1 %.

Стакан фарфоровый вместимостью 500 см^3 по ГОСТ 9147.

Баня водяная с терморегулятором с погрешностью 1 °С в интервале температур от 25 °С до 100 °С.

Эксикатор исполнения 2 по ГОСТ 25336.

N,N-диэтилпарафинилендиамин сернокислый с содержанием основного вещества не менее 90 %.

Калий железосинеродистый ч. д. а. по ГОСТ 4206.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,0001 г.

Колбы мерные наливные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 1-500-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 4-1-2-2 или 5-1-2-2, 4-2-2-10 или 5-2-2-10, 4-2-2-25 или 5-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Натрия гидроокись ч. д. а. по ГОСТ 4328.

Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N'N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б, ЭДТА) по ГОСТ 10652.

Калий фосфорнокислый однозамещенный ч. д. а. по ГОСТ 4198.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или дистиллированная, фильтрованная через капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Кислота борная по ГОСТ 18704.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ.

Капроновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Соляная кислота, концентрированная, квалификации х. ч. по ГОСТ 3118.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный 2-водный ч. д. а. по ГОСТ 4172.

Пиридоксин гидрохлорид с содержанием основного вещества не менее 95 %.

Толуол ч. д. а. по ГОСТ 5789.

Стаканы химические вместимостью 50 и 1000 см³ по ГОСТ 25336.

Шейкер лабораторный ЛАБ-ПУ-04.

Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (g-фактор) 800—1500.

Кварцевая кювета вместимостью 3,0 см³ и длиной оптического пути 1,0 см по ГОСТ 20903.

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

4.11.4 Приготовление растворов

4.11.4.1 Приготовление фосфатного буфера I

11,88 г натрия фосфорнокислого двухзамещенного дигидрата растворяют в 500 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см³, доводят водой объем до метки и перемешивают.

4.11.4.2 Приготовление фосфатного буфера II

9,08 г калия фосфорнокислого однозамещенного растворяют в 500 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см³, доводят водой объем до метки и перемешивают.

4.11.4.3 Приготовление раствора железосинеродистого калия массовой концентрации 0,05 г/см³

1,25 г железосинеродистого калия растворяют в 10—15 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 25 см³, доводят объем этим же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в темном месте не более трех часов.

4.11.4.4 Приготовление стандартного раствора пиридоксина гидрохлорида с массовой концентрацией 1,0 мг/см³

Навеску пиридоксина гидрохлорида массой 100 мг, высушенного в эксикаторе над фосфорным ангидридом в течение 10 сут, растворяют в 20—30 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 см³, доводят объем водой и перемешивают. Раствор хранят в холодильнике в течение двух месяцев.

4.11.4.5 Приготовление раствора N,N-диэтилпарафенилендиамина массовой концентрацией 0,01 г/см³

Навеску N,N-диэтилпарафенилендиамина массой 100,0 мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, доводят объем до метки дистиллированной водой и перемешивают. Для предотвращения разрушения N,N-диэтилпарафенилендиамина под действием света раствор готовят непосредственно перед использованием.

4.11.4.6 Приготовление фосфатного буфера pH 7,0

500 см³ фосфатного буфера I переносят в стакан вместимостью 1000 см³, добавляют приблизительно 250 см³ фосфатного буфера II и доводят pH до значения 7,0 ед. pH.

4.11.4.7 Приготовление раствора борной кислоты массовой концентрацией 0,05 г/см³

5,0 г кристаллической борной кислоты растворяют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 100 см³, доводят объем до метки водой и перемешивают.

4.11.5 Приготовление рабочего стандартного раствора пиридоксина гидрохлорида

1 см³ полученного стандартного раствора пиридоксина гидрохлорида массовой концентрацией 1,0 мг/см³ пипеткой переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Массовая концентрация рабочего стандартного раствора пиридоксина гидрохлорида составляет 0,01 мг/см³.

4.11.6 Подготовка к анализу

Энергетический напиток наливают в химический стакан вместимостью 50 см^3 и удаляют газ в токе азота. Для проведения колориметрической реакции используют 2 см^3 подготовленной пробы напитка.

4.11.7 Проведение анализа

Колориметрическую реакцию стандартного рабочего раствора (*St*) и испытуемого образца (*Sa*) проводят в центрифужных пробирках с пробками. Состав исследуемых проб и порядок добавления к ним реагентов приведены в таблице 21.

Таблица 21

Реагент	*St*	*Sa*	Контроль
Дистиллированная вода, см^3	—	—	2,0
Экстракт испытуемого образца, см^3	—	2,0	—
Стандартный рабочий раствор пиридоксина гидрохлорида, см^3	2,0	—	—
Фосфатный буфер pH 7,0, см^3	10,0	10,0	10,0
Раствор диэтилпарафенилендиамина массовой концентрации 0,01 г/см^3, см^3	1,0	1,0	1,0
Толуол, см^3	10,0	10,0	10,0
Раствор железосинеродистого калия массовой концентрации 0,05 г/см^3, см^3	1,0	1,0	1,0

При добавлении раствора N,N-диэтилпарафенилендиамина содержимое каждой пробирки быстро перемешивают на шейкере в течение 30 с, после чего пробирки центрифугируют в течение 2 мин при 1500 g для более четкого разделения органической и водной фаз.

Для проведения колориметической реакции в каждую пробирку быстро добавляют 1,0 см^3 раствора железосинеродистого калия с массовой концентрацией 0,05 г/см^3, интенсивно перемешивают в течение 30 с и центрифугируют в течение 2 мин при 1500 g до четкого разделения органического и водного слоев.

Пипеткой переносят 2,5 см^3 толуольного слоя, окрашенного в синий цвет, в кварцевую кювету вместимостью 3,0 см^3 и длиной оптического пути 1,0 см. Оптическую плотность измеряют при длине волны λ = 605 нм, используя в качестве контроля толуольный слой контрольной пробы.

Для устранения мешающего влияния примесей, поглощающих при данной длине волны, 5,0 см^3 образца (*Sa*) и стандартного рабочего раствора (*St*) смешивают с 5,0 см^3 раствора борной кислоты с массовой концентрацией 0,05 г/см^3, встряхивают в течение 1 мин на шейкере, центрифугируют при 1500 g и измеряют оптическую плотность, как описано выше. При расчете полученные таким образом оптические плотности (A_{Sab} и A_{Stb}) вычитают из полученных выше соответственно. После каждого измерения кювету немедленно промывают толуолом.

4.11.8 Обработка результатов

Массовую концентрацию пиридоксина гидрохлорида в напитке *X*, мг/дм^3, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{(A_{Sa} - A_{Sab}) \cdot C_{St}}{(A_{St} - A_{Stb})} 1000, \quad (87)$$

где A_{Sa} — оптическая плотность анализируемой пробы;

A_{Sab} — оптическая плотность испытуемого раствора после реакции с борной кислотой;

A_{St} — оптическая плотность стандартного рабочего раствора пиридоксина гидрохлорида;

A_{Stb} — оптическая плотность стандартного рабочего раствора после реакции с борной кислотой;

C_{St} — массовая концентрация стандартного рабочего раствора, мг/см^3;

1000 — коэффициент пересчета см^3 на дм^3.

Вычисления проводят до второго десятичного знака.

4.11.9 Оформление результатов измерений

За окончательный результат измерений принимают среднеарифметическое двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r_{отн}, \quad (88)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/дм³;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

Предел воспроизводимости R — значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышается абсолютной величиной разности между результатами двух измерений, полученными в условиях воспроизводимости

$$|X_1 - X_2| \leq 0,01 \cdot R_{отн} \cdot X_{ср}, \quad (89)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое двух результатов измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, мг/дм³;

$R_{отн}$ — значение предела воспроизводимости (в процентах от среднеарифметического значения), приведенное в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$.

При соблюдении условий, регламентированных методиками (методами) измерений настоящего стандарта, при вероятности $P = 0,95$ относительная погрешность измерений $\pm \delta$ % не должна превышать значений, приведенных в таблицах метрологических характеристик для каждой методики (метода) измерений.

Результат анализа представляют в виде

$$(\overline{X} \pm \Delta) \text{ мг/дм}^3 \text{ при вероятности } P = 0,95,$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значение результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм³;

$\pm \Delta$ — абсолютная погрешность измерений, мг/дм³, рассчитанная по формуле

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \quad (90)$$

где δ — границы относительной погрешности методики (метода) измерений, % (значения приведены в таблицах метрологических характеристик для каждой методики при вероятности $P = 0,95$).

4.11.10 Контроль повторяемости (сходимости) результатов измерений проводят путем сравнения абсолютного расхождения между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, с пределом повторяемости, приведенным в таблице.

Сходимость результатов признают удовлетворительной при условии

$$|X_1 - X_2| \leq 0,01 \cdot r_{отн} \cdot X_{ср}. \quad (91)$$

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

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

4.11.11 Показатели точности и прецизионности измерений пиридоксина гидрохлорида, мг/дм³

Показатели точности и прецизионности измерений пиридоксина гидрохлорида в диапазоне измерений от 5 от 50 мг/дм³ при $P = 0,95$ приведены в таблице 22.

Таблица 22

Метрологическая характеристика ($P = 0,95$)	Значение
Диапазон измерений, мг/дм³	От 5 до 50 включ.
Предел повторяемости $r_{отн}$, %	26
Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	35
Границы относительной погрешности $\pm \delta$, %	25

Библиография

[1] Госфармакопея, XI издание, вып. 2

УДК 663.86:006.354 ОКС 67.160.20 Н79 ОКСТУ 9185

Ключевые слова: напитки безалкогольные и слабоалкогольные тонизирующие, тонизирующие ингредиенты, методы определения, кофеин, гингозиды, схизандрин, элеутерозиды, таурин, глюкуронолактон, карнитин, инозитол, витамины, обработка результатов

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 21.07.2010. Подписано в печать 09.09.2010. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 5,10. Тираж 361 экз. Зак. 710.

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