МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31768— 2012

МЕД НАТУРАЛЬНЫЙ

Методы определения гидроксиметилфурфураля

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением «Научно-исследовательский институт пчеловодства» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ«НИИП» Россельхозакадемии) и Обществом с ограниченной ответственностью «Аналитический центр Апис»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 15 ноября 2012 г. № 42)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1664-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31768—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 52834—2007

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

В Российской Федерации 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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕД НАТУРАЛЬНЫЙ

Методы определения гидроксиметилфурфураля

Natural honey. Methods for determination of hydroxymethylfurfural

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на натуральный мед (далее — мед) и устанавливает следующие методы определения гидроксиметилфурфураля:

- высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (диапазон измеряемого содержания гидроксиметилфурфураля от 1,0 до 85,0 мг/кг);
- спектрофотометрический по Уайту (диапазон измеряемого содержания гидроксиметилфурфураля от 1,0 до 85,0 мг/кг);
- фотоколориметрический по Винклеру (диапазон измеряемого содержания гидроксиметилфурфураля от 1,0 до 85,0 мг/кг);
- реакция Селиванова — Фиге на гидроксиметилфурфураль.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 61 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4207 Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 5823 Цинк уксуснокислый 2-водный. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9805 Спирт изопропиловый. Технические условия

ГОСТ 9970 Резорцин технический. Технические условия

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17299 Спирт этиловый технический. Технические условия

ГОСТ 19792 Мед натуральный. Технические условия

ГОСТ 24104[1)] Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 28498 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29169 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

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

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

Издание официальное

ГОСТ 29228 (ИСО 835-2—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

ГОСТ ISO 5725-1 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ ISO 5725-6 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Методы определения содержания гидроксиметилфурфураля (ГМФ)

Методы позволяют определять содержание гидроксиметилфурфураля [5-(гидроксиметил-)-фуран-2-карбальдегида (ГМФ)] в натуральном меде.

3.1 Определение содержания гидроксиметилфурфураля (ГМФ) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Метод основан на применении обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Содержание ГМФ фиксируется спектрофотометрическим детектором в ультрафиолетовой области спектра.

Метод включает следующие этапы:

- построение калибровочной прямой;
- растворение навески меда в дистиллированной воде;
- добавление к раствору меда растворов Карреза I и II для осаждения протеинов и стабилизации ГМФ в водном растворе;
- фильтрацию полученного раствора;
- определение содержания ГМФ на жидкостном хроматографе, снабженном УФ-детектором. Диапазон определения содержания ГМФ в анализируемом меде от 1,0 до 85,0 мг/кг.

Метод применяют при возникновении разногласий в оценке качества продукции.

3.1.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

3.1.1.1 Хроматограф для жидкостной хроматографии, состоящий:

- из градиентного насоса высокого давления с подачей элюента от 0,1 до 5,0 $см^3$/мин;
- термостата колонок;
- инжектора или автосемплера;
- спектрофотометрического УФ-детектора;
- системы для сбора и обработки данных.

3.1.1.2 Колонка хроматографическая с силикагелем (С18) с привитыми октадецильными группами типа Eclipse XDB-C18 с размером частиц 5 мкм, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм.

3.1.1.3 Предколонка с картриджем Phenomenex C18 (ODS) 4 × 3 мм.

3.1.1.4 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерение оптической плотности при длине волны 210—380 нм.

3.1.1.5 Кюветы кварцевые с толщиной слоя раствора, поглощающего свет, равной 1 см.

3.1.1.6 Микрошприцы вместимостью от 10 до 50 мкл для жидкостной хроматографии (в случае использования инжектора).

3.1.1.7 Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С.

3.1.1.8 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 1,0 мг.

3.1.1.9 Система получения воды квалификации для ВЭЖХ Millipore Simplicity или аналогичная.

3.1.1.10 Колбы мерные наливные 2—50—1, 2—100—1 по ГОСТ 1770.

3.1.1.11 Пипетки 2—1—1—1 по ГОСТ 29227, ГОСТ 29228.

3.1.1.12 Пипетки 2—2—25 по ГОСТ 29169.

3.1.1.13 1-канальные механические дозаторы с варьируемыми объемами дозирования 10—100 мкл, 100—1000 мкл, 1—5 $см^3$ 1-го класса точности.

3.1.1.14 Фильтр нейлоновый импортный на шприце с размером пор 0,45 мкм [13 mm Nylon 0,45 μm (Waters)].

3.1.1.15 Баня водяная или шкаф сушильный по ГОСТ 14919.

3.1.1.16 Сито лабораторное из металлической сетки.

3.1.1.17 Шпатель лабораторный.

3.1.1.18 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии.

3.1.1.19 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.1.1.20 Вода для лабораторного анализа категории 1.

3.1.1.21 Калий железистосинеродистый 3-водный [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$], х. ч., по ГОСТ 4207.

3.1.1.22 Цинк уксуснокислый 2-водный [$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$], х. ч., по ГОСТ 5823.

3.1.1.23 5-Гидроксиметилфурфураль (ГМФ) с содержанием основного вещества не ниже 99 %, Aldrich, каталожный номер № H4080-7.

Допускается использование других средств измерений, вспомогательного оборудования, по метрологическим, техническим характеристикам не хуже указанных в настоящем стандарте.

Допускается использование других реактивов, по качеству и чистоте не ниже вышеуказанных.

3.1.2 Условия хроматографического анализа:

- колонка Eclipse XDB-C18, 5 мкм, 150 × 4,6 мм по 3.1.1.2;
- предколонка с картриджем Phenomenex C18 (ODS) 4 × 3 мм по 3.1.1.3;
- температура — (30 ± 1) °С;
- элюирование (градиент):
    - 0—7 мин — вода/ацетонитрил 97/3,
    - 7,0—7,5 мин — вода/ацетонитрил 97/3 — вода/ацетонитрил 0/100,
    - 7,5—12,0 мин — вода/ацетонитрил 0/100,
    - 12,0—12,5 мин — вода/ацетонитрил 0/100 — вода/ацетонитрил 97/3,
    - 12,5—17,0 мин — вода/ацетонитрил 97/3;
- скорость потока — 1,0 $см^3$/мин;
- объем вводимой пробы — 20 мкл;
- детектор — диодная матрица: диапазон одновременно детектируемых длин волн 210—380 нм с шагом 2 нм, рабочая длина волны — 283 нм;
- время удерживания ГМФ — (7,0 ± 0,3) мин.

3.1.3 Отбор проб

3.1.3.1 Отбор проб — по ГОСТ 19792.

3.1.4 Подготовка пробы меда к испытанию

3.1.4.1 Закристаллизованный мед предварительно размягчают на водяной бане или в сушильном шкафу (см. 3.1.1.15) при температуре не выше 40 °С и продавливают шпателем (см. 3.1.1.17) через металлическое сито (см. 3.1.1.16).

3.1.4.2 Сотовый мед распечатывают и отделяют от сот при помощи металлического сита без нагревания.

Анализируемую пробу меда тщательно перемешивают не менее 3 мин. При перемешивании обращают внимание на то, чтобы в мед попало меньше воздуха.

3.1.5 Подготовка к проведению анализа

3.1.5.1 Приготовление основного стандартного раствора ГМФ массовой концентрацией 500 мкг/$см^3$ (раствор А)

(0,050 ± 0,001) г ГМФ (см. 3.1.1.23) взвешивают и растворяют в воде для лабораторного анализа по 3.1.1.20, количественно переносят в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 $см^3$, доводят до метки водой для лабораторного анализа и тщательно перемешивают. Получают раствор А. Срок хранения раствора А в холодильнике при температуре 4 °С — не более 3 мес.

3.1.5.2 Приготовление рабочего стандартного раствора ГМФ массовой концентрацией 2 мкг/$см^3$ (раствор Б)

Аликвоту 0,2 $см^3$ раствора А переносят в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 50 $см^3$, доводят до метки водой для лабораторного анализа и тщательно перемешивают. Получают раствор Б, который используют при калибровке хроматографа.

Срок хранения раствора Б при комнатной температуре — не более 1 сут.

3.1.5.3 Определение точной массовой концентрации ГМФ в растворе Б

Определение точной массовой концентрации ГМФ в растворе Б проводят с помощью УФ-спектрофотометра (см. 3.1.1.4), измеряя оптическую плотность при длине волны 285 нм, раствором сравнения служит вода для лабораторного анализа (см. 3.1.1.12).

Точную массовую концентрацию гидроксиметилфурфураля в рабочем стандартном растворе C, мг/дм^3 или мкг/см^3, рассчитывают по формуле

$$C = \frac{AM \cdot 1000}{LE} = \frac{A \cdot 1000}{1 \cdot 133{,}57}, \quad (1)$$

где A — оптическая плотность раствора;

M — молекулярная масса ГМФ (М = 126 г/моль);

1000 — коэффициент пересчета мг в мкг;

L — толщина слоя раствора в кварцевой кювете (см. 3.1.1.5), равная 1 см;

E — коэффициент молярной экстинкции для водного раствора (E = 16 830 см^2/ммоль).

Значение относительной погрешности определения массовой концентрациии ГМФ в растворе с помощью УФ-спектрофотометрии не должно превышать 5 % при вероятности P = 0,95.

3.1.5.4 Приготовление раствора Карреза I

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют в дистиллированной воде (см. 3.1.1.19) (15,00 ± 0,01) г калия железистосинеродистого 3-водного (см. 3.1.1.21), доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. Срок хранения при комнатной температуре — 6 мес.

3.1.5.5 Приготовление раствора Карреза II

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют в дистиллированной воде (30,00 ± 0,01) г цинка уксуснокислого 2-водного (см. 3.1.1.22), доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. Срок хранения — 6 мес.

3.1.5.6 Построение калибровочного графика

В мерных колбах вместимостью 50 см^3 готовят растворы ГМФ массовой концентрацией 0,02; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 мкг/см^3 путем доведения до метки водой для лабораторного анализа соответствующих количеств раствора Б в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Концентрация калибровочного раствора, мкг/см^3	0,02	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0
Объем раствора Б, см^3	0,5	2,5	12,5	25,0	37,5	50,0

Каждый раствор хроматографируют не менее трех раз. При построении калибровочного графика на оси абсцисс откладывают концентрацию рабочего стандартного раствора в мкг/см^3, а по оси ординат — средние значения площадей пиков. Калибровочный график должен быть линейным в заданном диапазоне концентраций с коэффициентом корреляции 0,99. Воспроизводимость результатов проверяют следующим образом: вводят не менее пяти инжекций раствора ГМФ с концентрацией 0,5 мкг/см^3, относительная среднеквадратичная ошибка S_r (x) не должна превышать 2 %.

3.1.5.7 Подготовка пробы

(1,000 ± 0,001) г меда, подготовленного по 3.1.4, взвешивают в стакане по ГОСТ 25336 и растворяют в 25 см^3 воды для лабораторного анализа, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3, тщательно перемешивают до растворения и вносят последовательно по 10 мкл растворов Карреза I и II по 3.1.5.4, 3.1.5.5, каждый раз перемешивая смесь. Доводят до метки водой для лабораторного анализа и тщательно перемешивают. Полученную смесь фильтруют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (см. 3.1.1.14). Срок хранения пробы при комнатной температуре — 8 ч.

3.1.6 Выполнение измерений и обработка результатов анализа

3.1.6.1 Выполнение измерений

Фильтрованный раствор пробы, приготовленный по 3.1.5.7, хроматографируют не менее трех раз. Хроматограмма раствора меда, содержащего ГМФ, представлена на рисунке 1.

Разрешение между соседними с ГМФ пиками рассчитывают по формуле

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

где t_{R1} и t_{R2} — время удерживания веществ, мин;

W_1 и W_2 — ширина пиков у основания, мин;

R_s должно быть не менее 1,0.

По калибровочному графику, зная площадь пика ГМФ, находят концентрацию ГМФ в анализируемой пробе меда.

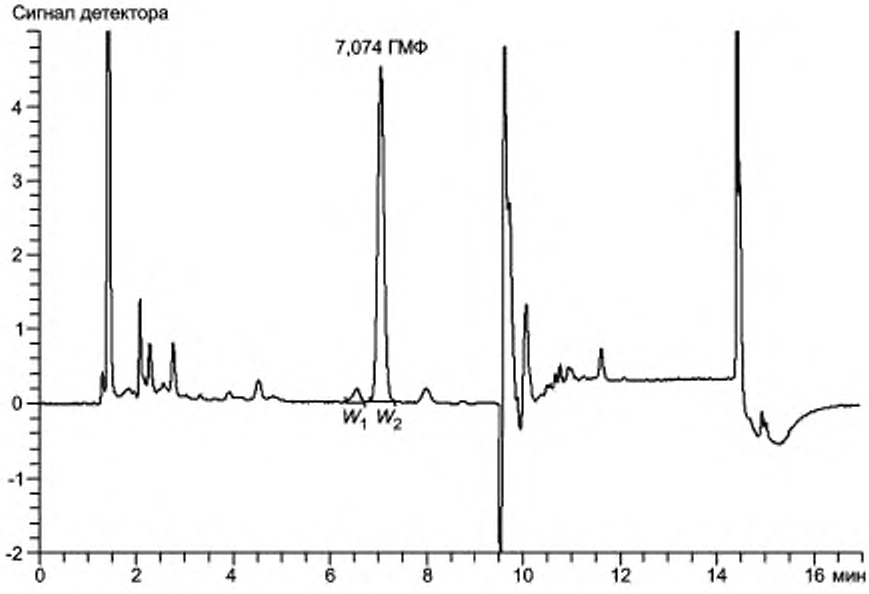

Рисунок 1 — Хроматограмма раствора меда, содержащего ГМФ

3.1.6.2 Обработка результатов анализа

Содержание гидроксиметилфурфураля в анализируемом меде $M_{ГМФ}$, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$M_{ГМФ} = \frac{C_{ГМФ} \cdot V_{обр}}{m_{меда}}, \quad (3)$$

где $C_{ГМФ}$ — концентрация ГМФ, найденная по калибровочному графику, мкг/см^3;

$V_{обр}$ — объем, в котором растворена анализируемая проба, см^3;

$m_{меда}$ — масса анализируемой пробы меда, г.

Примечание — Объемы инжекции раствора пробы меда и калибровочного раствора ГМФ должны быть одинаковыми.

Вычисления проводят с записью результата до второго десятичного знака. Окончательный результат записывают с точностью до первого десятичного знака.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, если выполняется условие приемлемости

$$M_{ГМФ,1} - M_{ГМФ,2} \le r,\ r = 2{,}8\ \sigma_r\ 0{,}01 M_{ГМФср}.$$

3.1.7 Точность метода

Статистический анализ результатов испытаний по оценке точности метода проводят в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 5725-1 и ГОСТ ISO 5725-6.

3.1.7.1 Повторяемость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений $M_{ГМФ,1}$ и $M_{ГМФ,2}$, которые получены в условиях повторяемости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, одна и та же лаборатория, один и тот же оператор, одно и то же оборудование, короткий промежуток времени), не должно превышать предела повторяемости $\sigma_r = 2{,}8\ \sigma_r 0{,}01 M_{ГМФср}$. Значения r и σ_r представлены в таблицах 2 и 3.

3.1.7.2 Воспроизводимость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых измерений $\bar{M}_{ГМФ,1}$ и $\bar{M}_{ГМФ,2}$, которые получены в условиях воспроизводимости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, разные лаборатории, разные операторы, различное оборудование), не должно превышать предела воспроизводимости $\left|\bar{M}_{ГМФ,1} - \bar{M}_{ГМФ,2}\right| \le R$, $R = 2{,}8\sigma_R 0{,}01\bar{M}_{ГМФср}$.

Значения R и σ_R представлены в таблицах 2 и 3.

3.1.7.3 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий характеристики погрешности результата измерения с вероятностью $P = 0{,}95$ не должны превышать значений, приведенных в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 — Диапазон измерений, значения характеристик погрешности и ее составляющих при доверительной вероятности $P = 0{,}95$

Диапазон измерений содержания ГМФ, мг/кг	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Показатель точности (границы относительной погрешности) $\pm\delta$, %
1,0—85,0	4	11	25

Таблица 3 — Диапазон измерений, значения пределов повторяемости и воспроизводимости при доверительной вероятности $P = 0{,}95$

Диапазон измерений содержания ГМФ, мг/кг	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) r, % отн.	Предел воспроизводимости (значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях) R, % отн.
1,0—85,0	10	30

3.1.8 Форма представления результата

Результат измерения в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$(M_{ср} \pm \Delta),\ мг/кг,\ P = 0{,}95,$$

где $\pm\Delta$ — границы характеристик абсолютной погрешности результатов измерения для данного содержания ГМФ, мг/кг;

$\pm\Delta = \pm\delta M_{ср}/100$, значение относительной погрешности $\pm\delta$ представлено в таблице 2.

3.2 Спектрофотометрический метод определения содержания гидроксиметилфурфураля (ГМФ) по Уайту

Метод основан на определении оптической плотности ГМФ в УФ-диапазоне при длине волны $\lambda = 284$ нм. Чтобы исключить влияние других компонентов в данной области спектра, определяют:

- оптическую плотность водного раствора меда по сравнению с таким же раствором после добавления в него 0,2%-ного раствора бисульфита натрия при длине волны 284 нм;
- оптическую плотность тех же растворов при длине волны 336 нм.

Содержание ГМФ вычисляют после вычитания оптической плотности фона, измеренной при длине волны 336 нм.

3.2.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

3.2.1.1 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения при длинах волн 284 и 336 нм с допустимой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %.

3.2.1.2 Кюветы кварцевые с толщиной поглощающего слоя 1 см.

3.2.1.3 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 1,0 мг.

3.2.1.4 Стаканы стеклянные исполнения 1 вместимостью 50 см^3 по ГОСТ 25336.

3.2.1.5 Пипетки 2—1—1—1 по ГОСТ 29227, ГОСТ 29228.

3.2.1.6 Пипетки 1—1—5, 2—2—25 по ГОСТ 29169.

3.2.1.7 Фильтры обеззоленные.

3.2.1.8 Колбы мерные исполнения 1 вместимостью 50 и 100 см^3 по ГОСТ 1770.

3.2.1.9 Пробирки вместимостью 15 см^3 по ГОСТ 1770.

3.2.1.10 Баня водяная.

3.2.1.11 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.2.1.12 Калий железистосинеродистый 3-водный [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$], х. ч., по ГОСТ 4207.

3.2.1.13 Цинк уксуснокислый 2-водный [$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$], х. ч., по ГОСТ 5823.

3.2.1.14 Натрия бисульфит [$NaHSO_3$] с содержанием основного вещества не ниже 99 %, Acros Organics, каталожный номер № 7631-90-5.

3.2.1.15 Спирт этиловый технический по ГОСТ 17299.

Допускается использование других средств измерений, вспомогательного оборудования, по метрологическим, техническим характеристикам не хуже указанных в настоящем стандарте.

Допускается использование других реактивов, по качеству и чистоте не ниже вышеуказанных.

3.2.2 Отбор и подготовка проб

3.2.2.1 Отбор проб — по ГОСТ 19792.

3.2.2.2 Подготовка проб — по 3.1.4.

3.2.3 Приготовление рабочих растворов

3.2.3.1 Приготовление растворов Карреза I и II

3.2.3.2 Приготовление растворов Карреза I и II осуществляют по 3.1.5.4, 3.1.5.5.

3.2.3.3 Приготовление раствора бисульфита натрия

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3 переносят (0,20 ± 0,01) г бисульфита натрия (см. 3.2.1.14), добавляют 20—30 см^3 дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения. Объем доводят до метки дистиллированной водой. Раствор готовят перед началом определения.

3.2.4 Проведение анализа и обработка результатов анализа

3.2.4.1 Проведение анализа

(5,00 ± 0,1) г меда, подготовленного по 3.1.4, взвешивают в стакане (см. 3.2.1.4) вместимостью 50 см^3, растворяют в 25 см^3 свежекипяченой и остывшей дистиллированной воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3. Пипеткой добавляют две капли (~ 0,05 см^3) раствора Карреза I по 3.1.5.4, перемешивают, добавляют две капли (~ 0,05 см^3) раствора Карреза II по 3.1.5.5, перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой. Для подавления пенообразования пипеткой можно добавить одну каплю этанола (см. 3.2.1.15). Затем раствор фильтруют через бумажный фильтр (см. 3.2.1.7), первые 10 см^3 фильтрата отбрасывают и получают раствор В.

В две пробирки (см. 3.2.1.9) пипеткой вносят по 5,0 см^3 раствора В. В первую пробирку добавляют 5 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают (анализируемый раствор). Во вторую пробирку добавляют 5 см^3 0,2%-ного раствора бисульфита натрия, приготовленного по 3.2.3.2, и тщательно перемешивают (раствор сравнения).

Приготовление анализируемого раствора и раствора сравнения проводят в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4

Растворы	Анализируемый раствор, см^3	Раствор сравнения, см^3
Раствор В	5,0	5,0
Вода дистиллированная	5,0	—
0,2%-ный раствор бисульфата натрия	—	5,0

3.2.4.2 Измерение оптической плотности

В течение часа измеряют оптическую плотность анализируемой пробы меда относительно раствора сравнения при длинах волн 284 и 336 нм. Если оптическая плотность при длине волны 284 нм превышает значение 0,6, то для получения более низкого значения оптической плотности и повышения точности измерения анализируемый раствор разбавляют дистиллированной водой, а раствор сравнения — бисульфитом натрия в равных объемах.

В случае разбавления применяют формулу

$$D = \frac{\text{Конечный объект исследуемого раствора}}{10}, \quad (4)$$

где D — фактор разбавления;

10 — коэффициент разбавления.

3.2.4.3 Обработка результатов измерений

Содержание гидроксиметилфурфураля в анализируемом меде $M_{ГМФ}$, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$M_{ГМФ} = (A_{284} - A_{336}) \cdot 149,7 \cdot D \cdot 5/m_{меда}, \quad (5)$$

где A_{284} — оптическая плотность при 284 нм;

A_{336} — оптическая плотность при 336 нм;

$$149,7 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 1000}{16830 \cdot 10 \cdot 5},$$

где 126 — молекулярный вес ГМФ, г/моль;

16 830 — коэффициент молярной экстинкции водного раствора при λ = 284 нм, см^2/ммоль;

10 — перевод 5 см^3 в 50 см^3;

1000 — перевод г в мг;

1000 — перевод г меда в кг;

5 — объем раствора В, см^3;

D — фактор разбавления;

5 — теоретическая номинальная масса пробы, г;

$m_{меда}$ — масса анализируемой пробы меда, г.

Вычисления проводят с записью результата до второго десятичного знака.

Окончательный результат записывают с точностью до первого десятичного знака.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, если выполняется условие приемлемости

$$|M_{ГМФ,1} - M_{ГМФ,2}| \le r,\ r = 2,8\ \sigma_r\ 0,01 M_{ГМФср}.$$

3.2.5 Точность метода

Статистический анализ результатов испытаний по оценке точности метода проводят в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 5725-1 и ГОСТ ISO 5725-6.

3.2.5.1 Повторяемость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений $M_{ГМФ,1}$ и $M_{ГМФ,2}$, которые получены в условиях повторяемости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, одна и та же лаборатория, один и тот же оператор, одно и то же оборудование, короткий промежуток времени), не должно превышать предела повторяемости $r = 2,8\ \sigma_r\ 0,01 M_{ГМФср}$. Значения r и σ_r представлены в таблицах 5 и 6.

3.2.5.2 Воспроизводимость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых измерений $\bar{M}_{ГМФ,1}$ и $\bar{M}_{ГМФ,2}$, которые получены в условиях воспроизводимости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, разные лаборатории, разные операторы, различное оборудование), не должно превышать предела воспроизводимости

$$\left|\bar{M}_{ГМФ,1} - \bar{M}_{ГМФ,2}\right| \le R,\ R = 2,8\sigma_R\ 0,01\bar{M}_{ГМФср}.$$

Значения R и σ_R представлены в таблицах 5 и 6.

3.2.5.3 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий проведения измерений характеристики погрешности результата измерения с вероятностью P = 0,95 не должны превышать значений, приведенных в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 — Диапазон измерений, значения характеристик погрешности и ее составляющих при доверительной вероятности P = 0,95

Диапазон измерений содержания ГМФ, мг/кг	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Показатель точности (границы относительной погрешности) ± δ, %
1,0—85,0	5,0	11,0	27,0

Таблица 6 — Диапазон измерений, значения пределов повторяемости и воспроизводимости при доверительной вероятности $P = 0,95$

Диапазон измерений содержания ГМФ, мг/кг	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) r, % отн.	Предел воспроизводимости (значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях) R, % отн.
1,0—85,0	10	30

3.2.6 Форма представления результата

Результат измерения в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$(M_{ср} \pm \Delta),\ мг/кг,\ P = 0,95,$$

где $\pm \Delta$ — границы характеристик абсолютной погрешности результатов измерения для данного содержания ГМФ, мг/кг;

$\pm \Delta = \pm \delta M_{ср}/100$, значение относительной погрешности $\pm \delta$ представлено в таблице 5.

3.3 Определение содержания гидроксиметилфурфураля (ГМФ) по методу Винклера

Метод основан на колориметрическом определении окраски, полученной в результате взаимодействия ГМФ с барбитуровой кислотой и п-толуидином, относительно раствора сравнения. Диапазон измерений содержания ГМФ в меде от 1,0 до 85 мг/кг.

3.3.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

3.3.1.1 Колориметр фотоэлектрический, снабженный светофильтром с максимумом пропускания при длине волны (540 ± 10) нм.

3.3.1.2 Кюветы кварцевые с толщиной поглощающего слоя 1 см.

3.3.1.3 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,1 мг.

3.3.1.4 Баня водяная.

3.3.1.5 Секундомер.

3.3.1.6 Электроплитка, шкаф сушильный по ГОСТ 14919.

3.3.1.7 Термометр ртутный стеклянный лабораторный до 100 °С по ГОСТ 28498.

3.3.1.8 Колбы мерные исполнений 1, 2, вместимостью 50, 100 $см^3$, 2-го класса точности по ГОСТ 1770.

3.3.1.9 Стаканы стеклянные исполнения 1 вместимостью 50 $см^3$ по ГОСТ 25336.

3.3.1.10 Пробирки стеклянные с притертой пробкой вместимостью 10 $см^3$ по ГОСТ 25336.

3.3.1.11 Пипетки 2—2—1—1, 2—2—1—2, 2—2—1—5 по ГОСТ 29227, ГОСТ 29228.

3.3.1.12 Пипетки 2—2—10, 2а-2—20, 2а-2—50 по ГОСТ 29169.

3.3.1.13 Фильтры обеззоленные.

3.3.1.14 Барбитуровая кислота.

3.3.1.15 п-толуидин.

3.3.1.16 Изопропиловый спирт по ГОСТ 9805.

3.3.1.17 Кислота уксусная ледяная, х. ч., по ГОСТ 61.

3.3.1.18 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709, освобожденная от кислорода путем кипячения.

3.3.1.19 Калий железистосинеродистый 3-водный [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$], х. ч., по ГОСТ 4207.

3.3.1.20 Цинк уксуснокислый 2-водный [$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$], х. ч., по ГОСТ 5823.

3.3.1.21 Спирт этиловый технический по ГОСТ 17299.

Допускается использование других средств измерений, вспомогательного оборудования, по метрологическим, техническим характеристикам не хуже указанных в настоящем стандарте.

Допускается использование других реактивов, по качеству и чистоте не ниже вышеуказанных.

3.3.2 Подготовка к испытанию

3.3.2.1 Отбор проб — по ГОСТ 19792.

3.3.2.2 Подготовка пробы — по 3.1.4.

3.3.2.3 Приготовление раствора барбитуровой кислоты

(0,500 ± 0,01) г барбитуровой кислоты (см. 3.3.1.14), высушенной в сушильном шкафу (см. 3.3.1.6) при 105 °С в течение 1 ч, быстро смешивают с 70 $см^3$ дистиллированной воды (см. 3.3.1.18), количественно

переносят в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3, растворяют при нагревании на водяной бане, охлаждают до 20 °С и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в холодильнике не более 1 мес. В случае образования кристаллов раствор нагревают на водяной бане примерно до 60 °С до полного растворения кристаллов.

3.3.2.4 Приготовление раствора п-толуидина

(10,00 ± 0,1) г п-толуидина (см. 3.3.1.15) растворяют в 50 см^3 изопропилового спирта (см. 3.3.1.16) при температуре 44 °С — 45 °С на водяной бане, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 с небольшим количеством изопропилового спирта, охлаждают до 20 °С и смешивают с 10 см^3 ледяной уксусной кислоты (см. 3.3.1.17), доводят до метки изопропиловым спиртом. Раствор ставят в темное место и используют через 24 ч после приготовления. Срок хранения в прохладном темном месте — 1 мес.

3.3.2.5 Приготовление растворов Карреза I и II

Приготовление растворов Карреза I и II — по 3.1.5.4 и 3.1.5.5.

3.3.2.6 Приготовление раствора меда

(10,00 ± 0,1) г меда, подготовленного по 3.1.4, растворяют в 20 см^3 свежепрокипяченой и остывшей дистиллированной воды (см. 3.3.1.18), количественно переносят в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 50 см^3.

Добавляют пипеткой три капли (~ 0,1 см^3) раствора Карреза I по 3.1.5.4, перемешивают, добавляют пипеткой три капли (~ 0,1 см^3) раствора Карреза II по 3.1.5.5, перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой. В случае пенообразования пипеткой добавляют одну каплю этанола (см. 3.3.1.21).

Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (см. 3.3.1.13), первые 10 см^3 фильтрата отбрасывают. Раствор используют немедленно. Хранению не подлежит.

3.3.3 Проведение испытания

В две пробирки (см. 3.3.1.10) наливают по 2,0 см^3 раствора меда и 5,0 см^3 раствора п-толуидина по 3.3.2.4. В первую пробирку (раствор сравнения) добавляют 1,0 см^3 дистиллированной воды (см. 3.3.1.18), перемешивают, во вторую пробирку приливают 1,0 см^3 раствора барбитуровой кислоты по 3.3.2.3, осторожно перемешивают. Смешивание растворов проводят быстро в течение 1—2 мин.

Измерение оптической плотности анализируемого раствора проводят на фотоэлектроколориметре (см. 3.3.1.1) при длине волны 550 нм относительно раствора сравнения ежеминутно (или чаще) в течение 6 мин. Наибольшая интенсивность окраски достигается через 3—4 мин после добавления барбитуровой кислоты.

3.3.4 Обработка результатов

Содержание гидроксиметилфурфураля в анализируемом меде $M_{ГМФ}$, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$M_{ГМФ} = \frac{A \cdot 192 \cdot 10 \cdot 0,8}{m_{меда}}, \quad (6)$$

где A — максимальное значение оптической плотности;

192 — постоянный коэффициент, учитывающий фактор разбавления и коэффициент экстинкции, вычисляемый по формуле

$$192 = \frac{126 \cdot 1000 \cdot 50 \cdot 8 \cdot 1000}{1 \cdot 13125 \cdot 2 \cdot 10 \cdot 1000}, \quad (7)$$

где 126 — молекулярный вес ГМФ, г/моль;

1000 — перевод г в мг, мг/г;

50 — объем, в котором растворена анализируемая проба, см^3,

8 — объем анализируемого раствора, см^3;

1000 — перевод г меда в кг, г/кг;

1 — толщина слоя раствора в кварцевой кювете, см;

13 125 — коэффициент молярной экстинкции водного раствора при λ = 550 нм, см^2/ммоль;

2 — объем раствора меда, взятый для анализа, см^3;

10 — теоретическая номинальная масса пробы меда, г;

1000 — перевод ммоль в моль, моль/моль;

0,8 — поправочный коэффициент;

$m_{меда}$ — масса анализируемой пробы меда, г.

Вычисления проводят до второго десятичного знака с последующим округлением до первого знака. За результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, если выполняется условие приемлемости

$$|M_{ГМФ,1} - M_{ГМФ,2}| \le r,\ r = 2{,}8\sigma_r\ 0{,}01M_{ГМФср}.$$

3.3.5 Точность метода

Статистический анализ результатов испытаний по оценке точности метода проводят в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 5725-1 и ГОСТ ISO 5725-6.

3.3.5.1 Повторяемость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений $M_{ГМФ,1}$ и $M_{ГМФ,2}$, которые получены в условиях повторяемости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, одна и та же лаборатория, один и тот же оператор, одно и то же оборудование, короткий промежуток времени), не должно превышать предела повторяемости $r = 2{,}8\ \sigma_r\ 0{,}01M_{ГМФср}$. Значения r и σ_r представлены в таблицах 7 и 8.

3.3.5.2 Воспроизводимость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых измерений $\bar{M}_{ГМФ,1}$ и $\bar{M}_{ГМФ,2}$, которые получены в условиях воспроизводимости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, разные лаборатории, разные операторы, различное оборудование), не должно превышать предела воспроизводимости

$$\left|\bar{M}_{ГМФ,1} - \bar{M}_{ГМФ,2}\right| \le R,\ R = 2{,}8\sigma_R\ 0{,}01\bar{M}_{ГМФср}.$$

Значения R и σ_R представлены в таблицах 7 и 8.

3.3.5.3 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий проведения измерений характеристики погрешности результата измерения с вероятностью $P = 0{,}95$ не должны превышать значений, приведенных в таблицах 7 и 8.

Таблица 7 — Диапазон измерений, значения характеристик погрешности и ее составляющих при доверительной вероятности $P = 0{,}95$

Диапазон измерений содержания ГМФ, мг/кг	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Показатель точности (границы относительной погрешности) ± δ, %
1,0—85,0	6,0	12,0	28,0

Таблица 8 — Диапазон измерений, значения пределов повторяемости и воспроизводимости при доверительной вероятности $P = 0{,}95$

Диапазон измерений содержания ГМФ, мг/кг	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) r, % отн.	Предел воспроизводимости (значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях) R, % отн.
1,0—85,0	11	29

3.3.6 Форма представления результата

Результат измерения в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$(M_{ср} \pm \Delta),\ мг/кг,\ P = 0{,}95,$$

где $\pm\Delta$ — границы характеристик абсолютной погрешности результатов измерения для данного содержания ГМФ, мг/кг;

$\pm\Delta = \pm 5\ M_{ср}/100$, значение относительной погрешности ± δ представлено в таблице 7.

3.4 Реакция Селиванова — Фиге на гидроксиметилфурфураль (ГМФ)

Метод основан на образовании в кислой среде продукта взаимодействия ГМФ с резорцином, окрашенного в вишнево-красный цвет.

Диапазон определения массовой доли ГМФ в меде: не более 25,0 мг/кг — реакция отрицательная, не менее 25,0 мг/кг — реакция положительная.

3.4.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

3.4.1.1 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,1 мг.

3.4.1.2 Ступки фарфоровые диаметром 70 мм с пестиком по ГОСТ 9147.

3.4.1.3 Чашки фарфоровые диаметром 50 мм по ГОСТ 9147.

3.4.1.4 Эфир для наркоза стабилизированный.

3.4.1.5 Резорцин по ГОСТ 9970.

3.4.1.6 Кислота соляная концентрированная, х. ч., по ГОСТ 3118.

3.4.2 Подготовка к испытанию

3.4.2.1 Приготовление раствора резорцина

(1,00 ± 0,10) г резорцина (см. 3.4.1.5) растворяют в 100 $см^3$ концентрированной соляной кислоты (см. 3.4.1.6). Раствор должен быть бесцветным. Раствор хранят в прохладном месте в склянке из оранжевого стекла с притертой пробкой.

3.4.2.2 Проведение испытания

(3,00 ± 0,10) г меда, подготовленного по 3.1.3, и 15 $см^3$ эфира (см. 3.4.1.4) тщательно перемешивают пестиком в сухой фарфоровой ступке (см. 3.4.1.2) в течение 2—3 мин. Эфирную вытяжку переносят в сухую фарфоровую чашку по 3.4.1.3. В фарфоровую ступку добавляют 15 $см^3$ эфира и повторяют перемешивание меда с новой порцией эфира. Эфирные вытяжки объединяют, эфиру дают испариться под тягой при комнатной температуре. К остатку добавляют две-три капли раствора резорцина по 3.4.2.1 и наблюдают изменение окраски в течение 5 мин.

Зеленовато-желтое, желтое или темно-желтое окрашивание свидетельствует о содержании гидроксиметилфурфураля не более 25 мг/кг. Реакция отрицательная.

Вишневое окрашивание свидетельствует о содержании гидроксиметилфурфураля не менее 25 мг/кг — реакция положительная.

УДК 638.16:006.354 МКС 67.180.10

Ключевые слова: мед натуральный, гидроксиметилфурфураль, высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрический метод по Уайту, фотоколориметрический метод по Винклеру, реакция Селиванова — Фиге

Редактор *Ю.А. Расторгуева*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.М. Поляченко*
Компьютерная верстка *Д.В. Кардановской*

Сдано в набор 15.11.2019. Подписано в печать 29.11.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,27.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru stinfo.ru

gost.e-ecolog.ru