ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54742— 2011

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение нарингина и неогесперидина в апельсиновом соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

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 Академическим центром сертификации и стандартизации продуктов питания (ОАО «Академсертификат»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки фруктов, овощей и грибов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 917-ст

4 В настоящем стандарте учтены:

основные положения международного стандарта CODEX-STAN 247—2005 «Общий стандарт на фруктовые соки и нектары» (CODEX-STAN 247—2005 «Codex general standard for fruit juices and nectars») в части методов анализа и отбора проб соковой продукции;

основные нормативные положения и метрологические характеристики документа АОАС Официальный метод 999.05 «Нарингин и неогесперидин в апельсиновом соке. Метод жидкостной хроматографии», 1999 (AOAC Official Method 999.05 «Naringin and Neohesperidin in Orange Juice. Liquid chromatography method», 1999)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемом информационном указателе «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, 2013

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 1
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы 2
5 Отбор проб 3
6 Подготовка к проведению определения 4
7 Проведение определения 5
8 Обработка результатов определения 5
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных испытаний по определению метрологических характеристик метода, проведенных AOAC International в 2000 г. [1] 6
Библиография 8

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение нарингина и неогесперидина в апельсиновом соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products. Determination of naringin and neohesperidin in orange juice by high-performance liquid chromatography

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на соковую продукцию в части апельсинового сока и устанавливает метод определения флавоноидов нарингина и неогесперидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ) в диапазоне содержания от 5 до 50 мкг/см^3.

Результаты межлабораторных испытаний приведены в таблицах А.1 и А.2 (приложение А) к настоящему стандарту.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 18270—72 Кислота уксусная особой чистоты. Технические условия

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

ГОСТ 26313—84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

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

Примечание — При использовании настоящего стандарта целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Метод основан на предварительном фильтровании анализируемой пробы для удаления нерастворимых частиц и последующем хроматографическом определении нарингина и неогесперидина на аналитической колонке, содержащей адсорбент — силикагель C_{18}. Детектирование нарингина и неогесперидина после выхода из аналитической колонки осуществляют спектрофотометрическим способом при длине волны 280 нм.

Издание официальное

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

4.1 Хроматограф для ВЭЖХ. Хроматографическая система для ВЭЖХ, состоящая из насоса, ручного или автоматического инжектора, спектрофотометрического детектора с возможностью регистрации фракций в ультрафиолетовой области спектра, интегратора или программно-аппаратного комплекса для обработки результатов хроматографического разделения.

Для проведения определения на хроматографе ВЭЖХ используют следующие режимы:

- скорость потока 1,0 $см^3$/мин;
- объем пробы 20 мкл (40 мкл в случае разбавления пробы перед определением);
- регистрация фракций спектрофотометрическим способом при длине волны 280 нм на детекторе с разрешением не хуже 0,05 ед. оптической плотности;
- термостатируемые условия хроматографического определения для обеспечения температурного интервала от 25 до 30° С.

4.2 Колонка аналитическая. Для хроматографического разделения используют аналитическую колонку, содержащую адсорбент C_{18} с иммобилизованным кварцевым наполнителем с высокой степенью очистки и низким уровнем металлических примесей.

Новая аналитическая колонка должна иметь следующие характеристики:

- эффективность колонки (N), рассчитываемая по формуле (1), равна для нарингина 2000:

$$N = 5,545 \times \left(\frac{t_r}{W_h}\right)^2, \quad (1)$$

где t_r — время удерживания пика, с;

W_h — ширина пика на половине высоты, с.

Разрешение колонки для двух пиков (R) нарингина и гесперидина составляет 1,5. Расчет значения разрешения колонки проводят по формуле

$$R = \frac{2 \times \left(t_{r(\text{нарингин})} - t_{r(\text{гесперидин})}\right)}{1,699 \times \left(W_{h(\text{нарингин})} - W_{h(\text{гесперидин})}\right)}. \quad (2)$$

Показатель симметричности пиков (S) для гесперидина принимает значения от 0,9 до 1,4. Расчет симметричности пиков проводят по формуле

$$S = \frac{A_{0,1h}}{B_{0,1h}}, \quad (3)$$

где $A_{0,1h}$ — ширина пика слева от перпендикуляра на 10 % высоты пика, с;

$B_{0,1h}$ — ширина пика справа от перпендикуляра на 10 % высоты пика, с.

Фактор удерживания (k') для неогесперидина не превышает 10. Расчет фактора удерживания проводят по формуле

$$k' = \frac{(t_r - t_d)}{t_d}, \quad (4)$$

где t_r — время удерживания пика, с;

t_d — нулевое время (время для прохождения растворителя через колонку от узла ввода пробы до кюветы детектора), с.

Для проведения хроматографического определения применяют следующие колонки (без использования уксусной кислоты в подвижной фазе):

- колонка аналитическая[1)] C_{18} с размером частиц 5 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 4,6 мм при скорости потока 1 $см^3$/мин ;

[1)] В качестве данной колонки может быть использована колонка модельного ряда Kromasil (Higgins Analytical, США, номер по каталогу изготовителя KS—1546—C185) или аналогичная. Указанное оборудование рекомендуется для применения. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что настоящий стандарт устанавливает требование об обязательном применении данного оборудования.

- колонка аналитическая[1] C_{18} с размером частиц 5 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 3 мм при скорости потока 0,5 $см^3$/мин;

- колонка аналитическая[2] ODS-2 с размером частиц 5 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 4 мм при скорости потока 0,8—1,0 $см^3$/мин.

Для хроматографического определения могут быть применены и другие колонки с адсорбентом C_{18}, но в этом случае необходимо добавлять уксусную кислоту в подвижную фазу для обеспечения требуемой симметрии пиков и эффективности хроматографического разделения.

4.3 Колонка предварительная. В качестве предварительной колонки может быть использована любая колонка, содержащая адсорбент C_{18} с иммобилизованным высококачественным кварцевым наполнителем с низким уровнем металлических примесей.

4.4 Фильтры мембранные размером 25 мм и порами диаметром 0,45 мкм, снабженные предварительным фильтром из стеклянного волокна (при разбавлении анализируемой пробы 40 %-ным водным раствором ацетонитрила в соотношении 1:1). Если анализируемые пробы фильтруют без предварительного разбавления, то для удаления нерастворимых частиц используют мембранные фильтры размером 25 мм и размером диаметра пор 0,2 мкм. Для фильтрования в этом случае применяют также мембранные фильтры из ацетата целлюлозы.

4.5 Центрифуга с возможностью центрифугирования жидких проб при 10000 g при температуре 25 °С.

4.6 Ацетонитрил, ч.д.а.

4.7 Деионизированная или бидистиллированная вода.

4.8 Кислота уксусная по ГОСТ 18270, о.с.ч.

4.9 Диметилформамид, ч.д.а.

4.10 Диметилсульфоксид, ч.д.а.

4.11 Подвижная фаза — смесь водного раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 81:19.

4.12 Гесперидин, ч.д.а.

4.13 Неогесперидин, ч.д.а.

4.14 Нарингин, ч.д.а.

4.15 Колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100, 1000 и 2000 $см^3$.

4.16 Весы лабораторные, обеспечивающие точность взвешивания с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,2 мг.

4.17 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336.

4.18 Пипетки градуированные 1—2—1, 1—2—2, 1—2—5 по ГОСТ 29227 вместимостью 1, 2 и 5 $см^3$ или дозаторы пипеточные с аналогичным или изменяемым объемом доз с относительной погрешностью дозирования ±1 %.

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

5 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26313.

---

[1] В качестве данной колонки может быть использована колонка модельного ряда Prodigy (Phenomenex, США, номер по каталогу изготовителя 00F—4097—Y0) или аналогичная. Указанное оборудование рекомендуется для применения. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что настоящий стандарт устанавливает требование об обязательном применении данного оборудования.

[2] В качестве данной колонки может быть использована колонка модельного ряда Intersil ODS—2 (SGE, США, номер по каталогу изготовителя 2070210) или аналогичная. Указанное оборудование рекомендуется для применения. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что настоящий стандарт устанавливает требование об обязательном применении данного оборудования.

6 Подготовка к проведению определения

6.1 Приготовление подвижной фазы

В мерную колбу вместимостью 2000 см^3 переносят 1—10 см^3 ледяной уксусной кислоты (4.8) и деионизированной водой (4.7) доводят объем раствора до метки. Затем в отдельной мерной колбе вместимостью 2000 см^3 смешивают 1620 см^3 деионизированной воды или приготовленного раствора уксусной кислоты с 380 см^3 ацетонитрила.

Срок хранения подвижной фазы в емкости вместимостью 2000 см^3 из темно-окрашенного стекла при комнатной температуре — не более 2 мес.

Примечание — Использование уксусной кислоты в подвижной фазе улучшает симметричность пиков и эффективность колонки. Количество добавленной уксусной кислоты зависит от используемой колонки. При этом необходимо учитывать, что добавление уксусной кислоты в подвижную фазу увеличивает вероятность влияния бензоата натрия и сорбата калия на пики анализируемых компонентов пробы.

6.2 Приготовление стандартного раствора А из нарингина, гесперидина и неогесперидина по 500 мкг каждого вещества в 1 г раствора

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 точно взвешивают по 0,05 г каждого стандартного вещества. В колбу добавляют 10 см^3 диметилформамида или диметилсульфоксида, перемешивают до полного растворения и доводят до метки с помощью подвижной фазы, подготовленной по 6.1.

Срок хранения стандартного раствора А при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.3 Приготовление стандартного раствора Б из бензоата натрия и сорбата калия по 500 мкг/см^3 каждого вещества в 1 г раствора

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 точно взвешивают по 0,05 г бензоата натрия и 0,05 г сорбата калия. Объем раствора в колбе доводят до метки подвижной фазой.

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

6.4 Приготовление рабочих стандартных растворов

Стандартный раствор А, подготовленный по 6.2, разбавляют подвижной фазой в соотношениях 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 и 1:100 и получают пять рабочих стандартных растворов с содержанием стандартных веществ 100, 50, 25, 10 и 5 мкг/г.

Срок хранения стандартных рабочих растворов при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.5 Для проверки работы подвижной фазы и стабильности колонки готовят поверочный раствор. Для этого в мерной колбе на 100 см^3 смешивают 10 см^3 стандартного раствора А и 10 см^3 стандартного раствора Б. Объем раствора в колбе доводят до метки подвижной фазой.

Срок хранения поверочного раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.6 Подготовка проб к определению

6.6.1 10—20 см^3 анализируемой пробы центрифугируют при 10000 g и температуре 25° С в течение 10 мин. Затем пробу фильтруют через мембранный фильтр размером 25 мм и размером диаметра пор 0,2 мкм.

Анализируемую пробу тщательно перемешивают, затем разбавляют в соотношении 1:1 водным раствором ацетонитрила (40:60). Пробу фильтруют через нейлоновый фильтр размером 25 мм и размером диаметра пор 0,45 мкм с использованием предварительного фильтра из стеклянного волокна. Ацетонитрил предотвращает адсорбцию флавоноидов разбавленной пробы на нейлоне. При расчете результатов определения (см. формулу 7) учитывают величину разбавления исходного образца ацетонитрилом (фактор разбавления *F*). Не допускается использование фильтров из ацетата целлюлозы или мембранных фильтров из полисульфона, так как они не устойчивы к ацетонитрилу. Также не допускается использование мембранных фильтров на основе поливинилиденфторида (PVDF) или политетрафторэтилена (PTFE), т. к. эти материалы адсорбируют флавоноиды, что приводит к снижению их содержания в анализируемой пробе.

7 Проведение определения

7.1 Перед проведением определения аналитов в пробах рекомендуется предварительно провести определение рабочего стандарта, состоящего из стандартного раствора Б. Состав подвижной фазы необходимо подобрать таким образом, чтобы значение показателя разрешения (R) составило не менее 1,5. Пики нарингина и неогесперидина в данных условиях будут достоверно отделяться от пиков бензоата натрия и сорбата калия (фактор удерживания k' для неогесперидина не будет превышать 10).

7.2 Пробу необходимо вносить в колонку в объемах 20, 10 и 5 мкл, соответственно, для колонок диаметром 4,6, 3,0 и 2,0 мм. Длительность хроматографического определения флавоноидов в одной пробе апельсинового сока составляет около 60 мин.

7.3 Пики мешающих веществ матрицы пробы элюируются между 25 и 60 мин при использовании аналитической колонки длиной не более 150 мм. Для колонок длиной 250—300 мм пики мешающих веществ могут не элюироваться в течение 80—100 мин. Интервал времени инжекции для поздних пиков не влияет на последующие определения.

7.4 Рекомендуется осуществлять температурный контроль аналитической колонки и использовать автоматическую систему инжекции.

7.5 Калибровку прибора для проверки линейности измерений проводят с применением стандартных растворов. Если не наблюдается линейная зависимость результатов измерений аналитов, то необходима калибровка с применением стандартных растворов (6.2—6.4) по нескольким точкам перед каждой серией определений. Если зависимость линейная, повторная инжекция раствора одного стандартного вещества (6.2—6.4) для калибровки будет достаточной для последующей серии определений.

8 Обработка результатов определения

Для идентификации пиков используют значение относительного времени удерживания *RRT*. При этом в качестве базисного значения используют время удерживания для гесперидина. Расчет относительного времени удерживания проводят по формуле

$$RRT_x = \frac{RT_x}{RT_{\text{гесперидин}}}, \quad (5)$$

где RRT_x — относительное время удерживания компонента x пробы;

RT_x — время удерживания компонента x пробы;

$RT_{\text{гесперидин}}$ — базисное значение — время удерживания гесперидина.

Количественное определение нарингина и неогесперидина проводят по площади пика. Расчет производят с помощью программно-аппаратного комплекса хроматографической системы или по калибровочным графикам.

Для линейной зависимости рассчитывают ответный фактор *RF* для каждого стандартного вещества (формула 6), затем определяют содержание нарингина и неогесперидина в анализируемой пробе по формуле 7

$$RF_x = \frac{S_x}{C_{x(\text{стандарт})}}, \quad (6)$$

где S_x — площадь пика компонента x;

$C_{x(\text{стандарт})}$ — содержание компонента x в стандартном растворе, мкг/г.

$$C_{x(\text{проба})} = \frac{S_{x(\text{проба})} \times F}{RF_x}. \quad (7)$$

где $C_{x(\text{проба})}$ — содержание компонента x в пробе, мкг/г;

$S_{x(\text{проба})}$ — площадь пика компонента x пробы;

F — фактор разбавления пробы (6.6.1);

RF_x — ответный фактор для компонента x.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний по определению метрологических характеристик метода, проведенных AOAC International в 2000 г. [1]

А.1 Результаты межлабораторных испытаний для нарингина приведены в таблице А.1.

Таблица А.1

Сведения о межлабораторных испытаниях	Добавлено в апельсиновый сок					Внесено нарингина		100 %-ный апельсиновый сок	100 %-ный апельсиновый сок
	1 %-ный грейпфрутовый сок	3 %-ный грейпфрутовый сок	5 %-ный грейпфрутовый сок	5 %-ный сок из кислых апельсинов	5 %-ный сок из апельсинов сорта K-Early	5 мг/кг	20 мг/кг		
Общее количество лабораторий	12	12	12	12	12	11	12	11	11
Добавленное количество (мкг/г)[а]	3,9	11,7	19,5	46,5	5,2	5,0	20,0	0,0	0,0
Общее среднее значение, мкг/г	3,43	10,24	16,87	44,76	7,21	5,20	17,57	—	—
Стандартное отклонение повторяемости, s_r	0,52	0,98	1,43	1,32	0,80	0,67	1,33	—	—
Стандартное отклонение воспроизводимости, S_R	1,10	1,92	3,04	5,07	1,40	1,19	3,54	—	—
Относительное стандартное отклонение повторяемости, RSD_r	15,23	9,55	8,40	2,95	11,04	12,94	7,57	—	—
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, RSD_R	1,94	18,73	18,00	11,34	19,39	22,85	20,12	—	—
Предел повторяемости, r	1,46	2,74	4,00	3,69	2,23	1,88	3,73	—	—
Предел воспроизводимости, R	3,07	5,37	8,50	14,21	3,92	3,33	9,90	—	—
Количество обнаружений[б]	12	12	12	12	12	11	12	4	4

Примечания:
[а] — количества, установленные в соке или стандартном растворе;
[б] — количество лабораторий с достоверным определением компонентов с правильным временем удерживания.

А.2. Результаты межлабораторных испытаний для неогесперидина приведены в таблице А.2.

Таблица А.2

Сведения о межлабораторных испытаниях	Добавлено в апельсиновый сок					Внесено неогесперидина		100 %-ный апельсиновый сок	100 %-ный апельсиновый сок
	1 %-ный грейпфрутовый сок	3 %-ный грейпфрутовый сок	5 %-ный грейпфрутовый сок	5 %-ный сок из кислых апельсинов	5 %-ный сок из апельсинов сорта K-Early	1,25 мг/кг	5 мг/кг		
Общее количество лабораторий	11	11	11	11	11	11	10	11	11
Добавленное количество (мкг/г)[а]	0,14	0,40	0,68	33,8	35,6	1,25	5,00	0,0	0,0
Общее среднее значение, мкг/г	—	—	—	31,71	35,45	—	4,85	0,0	0,0
Стандартное отклонение повторяемости, s_r	—	—	—	1,90	1,06	—	0,57	—	—
Стандартное отклонение воспроизводимости, S_R	—	—	—	3,50	3,71	—	1,27	—	—
Относительное стандартное отклонение повторяемости, RSD_r	—	—	—	6,00	3,00	—	11,74	—	—
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, RSD_R	—	—	—	11,03	10,45	—	26,17	—	—
Предел повторяемости, r	—	—	—	5,33	2,98	—	1,59	—	—
Предел воспроизводимости, R	—	—	—	9,79	10,37	—	3,55	—	—
Количество обнаружений[б]	0	1	3	11	11	10	11	0	0

Примечания:
[а] — количества, установленные в соке или стандартном растворе;
[б] — количество лабораторий с достоверным определением компонентов с правильным временем удерживания.

Библиография

[1] Widmer, W. Determination of Naringin and Neohesperidin in Orange Juice by Liquid Chromatography with UV Detection to Detect the Presence of Grapefruit Juice: Collaborative Study//Journal of AOAC International, 2000.— 83.— p. 1155—1166

УДК 664.863.001.4:006.354 ОКС 67.080.10 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: соковая продукция, апельсиновый сок, нарингин, неогесперидин, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, отбор проб, подготовка к проведению измерений, проведение измерений, обработка результатов определения

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

Сдано в набор 09.07.2013. Подписано в печать 23.08.2013 Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,85. Тираж 118 экз. Зак. 895.

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