МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 9167-1— 2015

РАПС

Определение содержания глюкозинолатов

Часть 1

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 9167-1:1992, IDT)

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 Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО ВНИИС) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 18 июня 2015 г. № 47)

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
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 21 июля 2015 г. № 947-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 9167-1-2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 9167-1:1992 «Рапс. Определение содержания глюкозинолатов. Часть 1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии» («Rapeseed. Determination of glucosinolates content. Part 1: Method using high-performance liquid chromatography», IDT), с учетом изменения ISO 9167-1:1992/Amd.1:2013.

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 2 «Семена и плоды масличных культур и мука из жмыха льняного семени» Технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА.

Изменение к международному стандарту, принятое после его официальной публикации, внесено в текст настоящего стандарта и выделено двойной вертикальной линией на полях справа от соответствующего текста.

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»

© ISO, 1992 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2016, 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

РАПС

Определение содержания глюкозинолатов

Часть 1

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Rapeseed.
Determination of glucosinolates content.
Part 1.
Method using high-performance liquid chromatography

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на рапс и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения содержания глюкозинолатов.

Примечание — Настоящий метод не позволяет определять глюкозинолаты, молекула глюкозы в которых замещена, однако содержание этих веществ в коммерчески доступном рапсе незначительное.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения).

ISO 664:1990[1)], Oilseeds. Reduction of laboratory sample to test sample (Семена масличных культур — Разделение лабораторных образцов на пробы для испытаний)

ISO 665:1977[2)], Oilseeds. Determination of moisture and volatile matter content (Семена масличных культур — Определение влаги и летучих веществ)

ISO 3696:1987, Water for analytical laboratory use; Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа — Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Глюкозинолаты экстрагируют метанолом, затем проводят их очистку и ферментативную десульфатацию на ионообменных смолах. Содержание глюкозинолатов определяют методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с градиентным элюированием и ультрафиолетовым детектированием.

4 Реактивы

Применяют только реактивы признанной аналитической чистоты, если не указано иное, и воду, соответствующую классу 2 по ISO 3696.

4.1 Метанол, для ВЭЖХ, раствор в воде объемной доли 70 % .

4.2 Ацетат натрия, раствор молярной концентрации 0,02 моль/дм^3, pH = 4,0.

4.3 Ацетат натрия, раствор молярной концентрации 0,2 моль/дм^3.

[1)] Заменен на ISO 664:2008.

[2)] Заменен на ISO 665:2000.

Издание официальное

4.4 Имидазола формиат, раствор молярной концентрации 6 моль/дм^3.

Растворяют 204 г имидазола в 113 см^3 муравьиной кислоты в мерной колбе с одной меткой вместимостью 500 см^3. Доводят объем водой до метки.

4.5 Внутренний стандарт, используют синигрин моногидрат (моногидрат аллилглюкозинолата калия M_r = 415,49) (4.5.1) или, для семян рапса (культивированных или выросших самостоятельно), в которых содержится естественный синигрин, глюкотропаеолин (бензилглюкозинолат, калиевая соль, M_r = 447,52) (4.5.2).

Для семян рапса с низким содержанием глюкозинолата (менее 20 мкмоль/г) снижают концентрацию внутреннего стандарта (1–3 ммоль/дм^3) в соответствии с 4.5.1 и 4.5.2.1.

4.5.1 Синигрин моногидрат

4.5.1.1 Синигрин моногидрат, раствор молярной концентрации 5 ммоль/дм^3.

Растворяют 207,7 мг моногидрата аллилглюкозинолата калия в воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Доводят объем водой до метки.

Приготовленный раствор хранят в холодильнике при температуре приблизительно 4 °С не более одной недели или в морозильной камере, в термоустойчивой колбе, при температуре минус 18 °С в течение месяца.

4.5.1.2 Синигрин моногидрат, раствор концентрации 20 ммоль/дм^3.

Растворяют 831,0 мг моногидрата аллилглюкозинолата калия в воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Доводят объем водой до метки.

Приготовленный раствор хранят в холодильнике при температуре 4 °С не более одной недели или в морозильной камере, в термоустойчивой колбе, при температуре минус 18 °С в течение месяца.

4.5.1.3 Контроль чистоты

Используют один или несколько из следующих трех тестов:

- ВЭЖХ анализ с использованием метода, установленного в настоящем стандарте;
- анализ неизмененного синигрина методом ион-парной ВЭЖХ;
- анализ десульфированного и силилированного синигрина методом газовой хроматографии.

В случае каждого испытания хроматограмма должна содержать только один основной пик, площадь которого должна составлять не менее 98 % от суммы площадей пиков всех компонентов.

Подтверждение отсутствия посторонних примесей проводят путем определения количества глюкозы, высвобожденной в результате гидролиза при участии мирозиназы (тиоглюкозид глюкогидролазы, КФ 3.2.3.1). Количество глюкозы определяют ферментативным методом. Использование коммерчески доступных тест-наборов облегчает определение. Учитывают все количество свободной глюкозы; определение проводят тем же способом, но без добавления мирозиназы. Измеренная молярная концентрация глюкозы должна составлять не менее 98 % молярной концентрации анализируемого раствора синигрина.

4.5.2 Глюкотропаеолин

Примечание – Глюкотропаеолин сложно отделим от других естественных второстепенных глюкозинолатов.

4.5.2.1 Глюкотропаеолин, раствор молярной концентрации 5 ммоль/дм^3

Растворяют 233,8 мг глюкотропаеолина в воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Доводят объем водой до метки.

4.5.2.2 Глюкотропаеолин, раствор молярной концентрации 20 ммоль/дм^3

Растворяют 895,0 мг глюкотропаеолина в воде в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Доводят водой до метки.

4.5.2.3 Контроль чистоты

Проверяют чистоту глюкотропаеолина в соответствии с методикой, описанной в 4.5.1.3.

4.5.2.4 Коэффициент отклика

Проверяют, соответствует ли коэффициент отклика глюкотропаеолина по отношению к синигрину, указанному в 9.2.

4.6 Подвижные фазы

4.6.1 Элюент А: вода, очищенная путем пропускания через картридж с активированным углем (например, система Norganic Millipore[1)] или вода эквивалентной чистоты).

4.6.2 Элюент В: раствор ацетонитрила для ВЭЖХ в очищенной воде объемной доли 20 %. Концентрация может меняться в зависимости от используемой колонки.

[1)] Norganic Millipore — система-пример коммерчески доступного продукта. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не означает рекламу данного продукта.

4.7 Ионообменная смола в соответствии с 4.7.1 или 4.7.2.

4.7.1 Суспензия DEAE Sepharose CL-6B[1)], имеющаяся в продаже и готовая к использованию, или аналогичный продукт.

4.7.2 Суспензия DEAE Sephadex A25[1)], подготовленная следующим образом.

Смешивают 10 г смолы DEAE Sephadex A25 (или аналогичной смолы) в избытке раствора уксусной кислоты молярной концентрации 2 моль/дм^3. Дают отстояться. Добавляют раствор уксусной кислоты 2 моль/дм^3, пока объем жидкости не будет равен двойному объему осадка.

4.8 Сульфатаза, Helix pomatia тип H1 (3.1.6.1), имеющая активность более чем 0,5 единиц активности на кубический сантиметр раствора очищенной сульфатазы

Очистку, определение активности и разведение сульфатазы проводят в соответствии с методом, установленным в 4.8.1–4.8.4.

4.8.1 Подготовка ионообменных колонок

Обрезают пять пипеток Пастера (5.9) на 7 см выше кончика и вкладывают тампон из стекловаты (5.8) в отверстие пипетки. Пипетки ставят в вертикальном положении в штативе и вносят в каждую достаточное количество ионообменной смолы (4.7) таким образом, чтобы после стекания воды объем ионообменной смолы составлял 500 мм^3.

В каждую пипетку добавляют 1 см^3 раствора формиата имидазола (4.4) и промывают дважды порциями воды по 1 см^3.

4.8.2 Очистка

Взвешивают с точностью до 0,1 мг 25 мг Helix pomatia типа H1 (4.8), растворяют в 2,5 см^3 воды и переносят 500 мм^3 полученного раствора в каждую колонку, подготовленную по 4.8.1. Промывают каждую колонку 1,5 см^3 воды и элюат отбрасывают. Затем добавляют 1,5 см^3 раствора ацетата натрия (4.3) и собирают элюаты из пяти колонок в пробирку.

Концентрируют элюаты путем фильтрования, используя иммерсионный фильтр Millipore PTGC 11K25[2)], до тех пор, пока не останется приблизительно 100 мм^3 жидкости (сульфатаза с молярной массой более 5000 не удаляется). Вносят 2,5 см^3 воды и концентрируют еще раз с помощью фильтрации, пока не останется приблизительно 100 мм^3 жидкости. Разводят до 2,5 см^3 водой и хранят очищенную сульфатазу в морозильной камере при температуре минус 18 °С в небольших количествах для того, чтобы было удобно размораживать небольшое количество перед непосредственным использованием.

4.8.3 Определение активности сульфатазы

4.8.3.1 Приготовление раствора синигрина молярной концентрации 0,15 ммоль/дм^3, с pH 5,8

Приготавливают три раствора в следующей последовательности:

a) вносят 1 см^3 уксусной кислоты в мерную колбу вместимостью 500 см^3 и доводят водой до метки;

b) вносят 1 см^3 этилендиамина в мерную колбу вместимостью 500 см^3 и доводят водой до метки;

c) смешивают 73 см^3 раствора a) с 40 см^3 раствора b) и регулируют pH на уровне 5,8, используя раствор a) или b) по мере необходимости.

Вносят 3 см^3 раствора синигрина молярной концентрации 5 ммоль/дм^3 (4.5.1.1) в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки раствором c).

4.8.3.2 Определение активности

Используя пипетку, переносят 2 см^3 раствора синигрина (4.8.3.1) в сравнительную и измерительную ячейки спектрофотометра (5.3) с установленной длиной волны, равной 229 нм, и с температурой ячеек 30 °С. В момент времени t = 0 вносят 50 мм^3 очищенной сульфатазы (4.8.2) в измерительную ячейку и незамедлительно включают регистрацию. Останавливают регистрацию, когда оптическая плотность более не изменяется (A_e), строят касательную к точке t = 0 и измеряют градиент $\Delta A/\Delta t$.

Активность сульфатазы (т. е. высвобождение 1 мкмоль десульфированного синигрина в минуту при температуре 30 °С и pH = 5,8), выраженная в единицах активности на кубический сантиметр раствора сульфатазы, вычисляют по формуле

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\Delta \varepsilon} \cdot \frac{1000}{50} \cdot 10^6,$$

где $\Delta A/\Delta t$ — градиент касательной к точке t = 0, в единицах оптической плотности в минуту;

V — объем содержимого в процессе реакции, дм^3 (т. е. 2,05 10^{-3} дм^3);

[1)] DEAE Sepharose и Sephadex — пример коммерчески доступных продуктов. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не означает рекламу данных продуктов.

[2)] Millipore PTGC 11K25 — пример коммерчески доступного продукта. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не означает рекламу данного продукта.

$\Delta\varepsilon$ — разница между молярным коэффициентом поглощения синигрина и десульфосинигрина при 228 нм (приблизительно 1 500 дм^3 моль$^{-1}$ см$^{-1}$), т. е.

$$\Delta\varepsilon = \frac{A_e}{l\,c},$$

где A_e — разница между оптической плотностью при равновесии десульфированного синигрина и оптической плотности при $t = 0$;

l — длина оптического пути ячейки, см (т. е. 1 см);

c — концентрация десульфированного синигрина при равновесии, моль/дм^3, т. е.

$$c = \frac{0{,}15 \cdot 10^{-3} \cdot 0{,}95 \cdot 2}{2{,}05} = 0{,}139 \text{ моль/дм}^3,$$

где 0,95 — выход десульфированного синигрина при равновесии.

В качестве альтернативы, активность сульфатазы может быть рассчитана с использованием следующей упрощенной формулы

$$\frac{\Delta A \cdot 5{,}7}{\Delta t \cdot A_e}.$$

4.8.4 Разведение сульфатазы

Используя пипетку, переносят 1 см^3 очищенной сульфатазы (см. 4.8.2) в мерную колбу на 10 см^3. Доводят объем водой до метки и перемешивают.

Раствор делят на небольшие порции и хранят в морозильной камере, в термоустойчивой колбе при температуре минус 18 °С.

5 Оборудование

Используют обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

5.1 Хроматограф для ВЭЖХ, обеспечивающий проведение градиентного элюирования с возможностью термостатирования колонки на уровне 30 °С с ультрафиолетовым детектором, позволяющим проводить измерения при длине волны 229 нм.

5.2 Хроматографическая колонка для ВЭЖХ, заполненная сорбентом типа C_{18} или C_8 с размером частиц меньше или равным 5 мкм, например[1]:

Lichrosorb RP18 колонка, < 5 мкм (150 мм · 4,6 мм)

Spherisorb ODS2 колонка, < 5 мкм (250 мм 4 мм; 250 мм · 5 мм)

Novapak C18 колонка, 4 мкм (150 мм · 4 мм)

Lichrospher RP8 колонка, < 5 мкм (125 мм · 4 мм)

Nucleosil Cl8 колонка < 5 мкм (200 мм 4 мм)

Эффективность работы колонки должна регулярно проверяться, предпочтительно с применением контрольного образца десульфоглюкозинолата рапса[2]. В частности, колонки не должны разрушать 4-гидроксиглюкобрассицин, который является важным, но относительно нестабильным, глюкозинолатом.

Для получения сопоставимых результатов новые колонки должны быть кондиционированы в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.3 Двухлучевой спектрофотометр, предназначенный для работы в ультрафиолетовой области спектра, с контролем температуры на уровне 30 °С, снабженный кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 1 см и регистрирующей системой.

5.4 Микромельница, например кофемолка.

5.5 Центрифуга, с возможностью использования пробирок (5.6), работающая при центробежном ускорении 5000 *g*.

5.6 Полипропиленовые пробирки вместимостью 6 см^3.

5.7 Водяная баня или другое нагревательное оборудование, способное поддерживать температуру на уровне (75 ± 1) °С.

5.8 Стекловата.

5.9 Пипетки Пастера, длиной 150 мм, с соответствующим штативом или любым другим подходящим оборудованием.

---

[1] Примеры коммерчески доступных продуктов. Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и не означает рекламу данных продуктов.

[2] Контрольный образец десульфоглюкозинолата рапса может быть получен из Community Reference Bureau.

6 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с [1].

Если перед сокращением лабораторной пробы были отделены крупные инородные тела, имеющие немасличную природу, при проведении расчетов необходимо сделать соответствующие поправки.

7 Подготовка анализируемой пробы

Выделение лабораторной пробы в соответствии с ISO 664 .

Если рапс имеет влажность и содержание летучих веществ более 10 % (по массе), их сушат при помощи потока воздуха при температуре приблизительно 45 °С.

Уровень загрязнений, как правило, составляет 2 % (по массе). Если в пробе обнаружен синигрин, проводят анализ чистых семян и отдельно анализируют загрязнения.

Определение влажности и содержания летучих веществ в анализируемой пробе проводят в соответствии с ISO 665.

Если рапс был очищен, его промывают дихлорметаном.

Рапс измельчают в микромельнице (5.4) в течение 20 с. Перемешивают муку и затем дополнительно перемалывают в течение 5 с.

8 Методика проведения анализа

8.1 Отбор части анализируемой пробы для анализа

В две пробирки (5.6) А и В помещают по 200 мг подготовленной анализируемой пробы (см. 7), взвешенной с точностью до 0,1 мг.

8.2 Экстракция глюкозинолатов

8.2.1 Пробирки помещают в водяную баню или другое нагревательное оборудование (5.7) при температуре 75 °С и оставляют на 1 мин. Вносят по 2 $см^3$ кипящего раствора метанола (4.1) и затем незамедлительно вносят:

- в пробирку А, 200 $мм^3$ раствора внутреннего стандарта молярной концентрации 5 ммоль/$дм^3$ (4.5.1.1);
- в пробирку В, 200 $мм^3$ раствора внутреннего стандарта молярной концентрации 20 ммоль/$дм^3$ (4.5.1.2).

8.2.2 Продолжают нагревать при температуре 75 °С еще в течение 10 мин, встряхивая пробирки через определенные интервалы времени. Перемешивают содержимое каждой пробирки и затем центрифугируют при центробежном ускорении 5 000 g в течение 3 мин. Сливают надосадочную жидкость из каждой пробирки в две другие пробирки (5.6), обозначенные, соответственно, как А' и В'.

8.2.3 В две пробирки, содержащие сухой остаток, добавляют 2 $см^3$ кипящего раствора метанола (4.1) и повторно нагревают в течение 10 мин на водяной бане или другом нагревательном оборудовании (5.7) при температуре 75 °С, встряхивая пробирки через определенные интервалы времени.

Центрифугируют в течение 3 мин и затем приливают надосадочную жидкость из двух пробирок к соответствующей надосадочной жидкости, полученной по 8.2.2.

8.2.4 Доводят объем объединенных экстрактов водой приблизительно до 5 $см^3$ и перемешивают.

Данные экстракты можно хранить в течение двух недель в темноте в морозильной камере при температуре минус 18°С.

8.3 Подготовка ионообменных колонок

Обрезают требуемое количество пипеток Пастера (5.9) (на один объединенный экстракт должна приходиться одна пипетка), таким образом, чтобы выше отверстия пипетки остался объем 1,2 $см^3$, и закрывают отверстие каждой пипетки тампоном из стекловаты (5.8). Пипетки размещают в штативе в вертикальном положении.

0,5 $см^3$ тщательно перемешанной суспензии ионообменной смолы (4.7) переносят в каждую пипетку и дают отстояться.

Пипетки с ионообменной смолой промывают 2 $см^3$ имидазола формиата (4.4), затем дважды порциями воды по 1 $см^3$.

8.4 Очистка и десульфатация

8.4.1 Проводят процедуры, приведенные в 8.4.2–8.4.5 для каждого объединенного экстракта.

8.4.2 1 $см^3$ экстракта (8.2.4) переносят в подготовленную колонку (8.3), не затрагивая поверхность смолы, и позволяют жидкости стечь. Вносят две порции по 1 $см^3$ раствора ацетата натрия (4.2), позволяя ему впитаться в объем смолы после каждого добавления.

8.4.3 Вносят в колонку 75 $мм^3$ разведенного раствора очищенной сульфатазы (4.8.4). Оставляют на ночь при комнатной температуре.

8.4.4 Помещают пробирку (5.6) под колонку для сбора элюата.

Элюируют содержащийся десульфоглюкозинолат двумя порциями воды по 1 $см^3$, позволяют воде впитаться в объем смолы после каждого добавления.

8.4.5 Элюат тщательно перемешивают. Если элюат не используют незамедлительно для проведения хроматографии, то его допускается хранить в темноте в морозильной камере при температуре минус 18 °С в течение одной недели.

8.5 Контрольное испытание

Если требуется (9.3), то проводят контрольное испытание, отбирая анализируемую пробу, используя аналогичную процедуру отбора тестовой порции из той же анализируемой пробы, но без использования раствора внутреннего стандарта синигрина, с целью обнаружения и определения количества синигрина, присутствующего в анализируемой пробе.

8.6 Проведение хроматографического анализа

8.6.1 Настройка оборудования

Хроматограф настраивают таким образом, чтобы были достигнуты следующие параметры:

Расход подвижных фаз (4.6), зависящий от особенностей колонки (8.6.2), как правило, равен приблизительно 1 $см^3$/мин.

Температура колонки (5.2) – 30 °С.

Рабочая длина волны 229 нм.

8.6.2 Анализ

Анализ проводят в соответствии с инструкциями к оборудованию, в хроматограф вводят не более 50 $мм^3$ раствора десульфоглюкозинолата, полученного по 8.4.4.

Используют градиентное элюирование, соответствующее используемой колонке.

Примечания

1 Следующие градиенты элюирования приведены в качестве примеров.

a) Lichrosorb RP18 колонка, ≤ 5 мкм (150 мм · 4,6 мм):

- в течение 1 мин в колонку подается 100 %-ный элюент А (4.6.1);
- в течение 20 мин линейный градиент элюирования со снижением доли элюента А до 0 % и одновременным ростом доли элюента В (4.6.2) до 100 %;
- затем в течение 5 мин линейный градиент элюирования с ростом доли элюента А до 100 % и одновременным снижением доли элюента В до 0 %;
- подача в колонку 100 %-ного элюента А (4.6.1) в течение 5 мин до достижения равновесия.

b) Lichrospher RP18 колонка, ≤ 5 мкм (125 мм · 4 мм):

- подача в колонку 100% элюента А (4.6.1) в течение 2,5 мин;
- далее за 18 мин линейный градиент элюирования со снижением доли элюента А до 0% и одновременным ростом доли элюента В до 100 %;
- подача в колонку 100 %-ного элюента В в течение 5 мин;
- затем за 2 мин линейный градиент элюирования с ростом доли элюента А до 100 % и одновременным снижением доли элюента В до 0 %;
- подача в колонку 100 %-ного элюента А (4.6.1) в течение 5 мин до достижения равновесия.

2 Профили градиента могут быть изменены для оптимизации эффективности и селективности разделения, соответствующего используемым колонкам.

8.6.3 Обработка хроматограмм

Принимают во внимание только те хроматографические пики, которые имеют площадь более чем 1 % от общей суммы площадей пиков.

Порядок элюирования пиков на колонке с сорбентом $С_{18}$ с применяемым градиентным элюированием (см. примеры, приведенные в 8.6.2), как правило, соответствует представленному на рисунке 1.

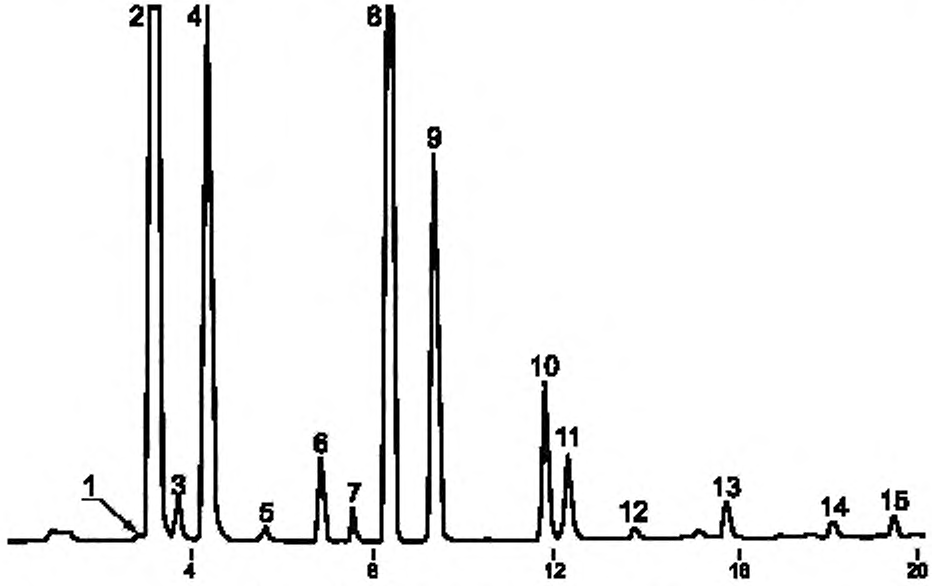


Рисунок 1 – Пример типичной хроматограммы

Примечание — Пики на рисунке 1, обозначенные цифрами, приведены в 9.2.

9 Обработка результатов

9.1 Расчет содержания глюкозинолатов

Содержание каждого глюкозинолата, выраженное в мкмоль на грамм сухого вещества в продукте, равно

$$C_i = \frac{A_g}{A_s} \cdot \frac{n}{m} \cdot \frac{K_g}{K_s} \cdot \frac{100}{100 - w},$$

где A_g — площадь пика, в интегральных единицах, соответствующая десульфоглюкозинолату;

A_s — площадь пика, в интегральных единицах, соответствующая использованному внутреннему стандарту;

n — количество внутреннего стандарта, добавленного в пробирку по 8.2 мкмоль;

m — масса аналитической пробы, г;

K_g — градуировочный коэффициент десульфоглюкозинолата (9.2);

K_s — градуировочный коэффициент использованного внутреннего стандарта;

w — влажность и количество летучих веществ, выраженные в процентах по массе, в анализируемой пробе.

При выражении результата с учетом конкретной влажности и конкретного содержания летучих веществ w_s (например, w_s = 9 % по массе) умножают результат, полученный для сухого вещества, на коэффициент

$$\frac{100 - w_s}{100}.$$

9.2 Коэффициенты отклика

Были приняты коэффициенты отклика, приведенные ниже.

Примечание — Данные коэффициенты отклика определены экспериментальным путем и усреднены между различными лабораториями, которые принимали участие в анализе. В дальнейшем они могут быть пересмотрены.

1 Десульфоглюкоиберин	1,07
2 Десульфопрогоитрин	1,09
3 Десульфоэпи-прогоитрин	1,09
4 Десульфосинигрин	1,00
5 Десульфоглюкорафанин	1,07
6 Десульфоглюконаполеиферин	1,00
7 Десульфоглюкоалиссин	1,07
8 Десульфоглюконапин	1,11
9 Десульфо-4-гидроксиглюкобрассицин	0,28
10 Десульфоглюкобрассицанапин	1,15
11 Десульфоглюкотропаеолин	0,95
12 Десульфоглюкобрассицин	0,29
13 Десульфоглюконастуртин	0,95
14 Десульфо-4-метоксиглюкобрассицин	0,25
15 Десульфоглюкобрассицин	0,20
16 Другие десульфоглюкозинолаты	1,00

9.3 Расчет общего содержания глюкозинолатов

Общее содержание глюкозинолатов, выраженное в мкмоль/г сухого вещества продукта, равняется сумме содержания каждого глюкозинолата (соответствующая площадь пика которого более чем 1 % суммарной площади пиков).

Если разница между результатами общего содержания глюкозинолатов, полученными в тестовой порции анализируемой пробы и контрольным испытанием по 8.5 удовлетворяет условия повторяемости (10.2), что подтверждает отсутствие внутреннего стандарта в порции анализируемой пробы (8.5). В этом случае за результат испытаний принимают среднеарифметическое значение двух определений.

10 Прецизионность

10.1 Результаты межлабораторных испытаний

В межлабораторных испытаниях, проводимых на международном уровне в 1988 г., приняли участие 11 лабораторий, каждая из которых проводила два определения каждого образца, статистические результаты (рассчитанные в соответствии с ISO 5725) приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Статистически обработанные результаты межлабораторных испытаний

Проба	Семя рапса A	Семя рапса B	Семя рапса C	Семя рапса D
Количество лабораторий, оставшихся после исключения лабораторий с резко отклоняющимися значениями	11	11	11	11
Среднее значение содержания глюкозинолата, мкмоль/г сухого вещества	20,6	14,1	4,9	25,6
Стандартное отклонение повторяемости, s_r	1,7	0,6	0,3	0,8
Коэффициент вариации повторяемости, %	8,5	4,4	6,7	3,3
Повторяемость, 2,83 S_r	4,9	1,7	0,9	2,4
Стандартное отклонение воспроизводимости, S_R	3,4	2,5	1,5	2,4
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	17	18	31	9,4
Воспроизводимость, 2,83 S_R	9,6	7,1	1,4	6,8

10.2 Повторяемость

Абсолютная разница между результатами двух независимых единичных испытаний, полученных по одному и тому же методу на идентичном испытуемом материале в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, на одном и том же оборудовании в течение короткого интервала времени должна быть не более 2 мкмоль/г при содержании глюкозинолатов менее 20 мкмоль/г, и не более 4 мкмоль/г при содержании глюкозинолатов в диапазоне от 20 до 35 мкмоль/г.

10.3 Вопроизводимость

Абсолютная разница между результатами двух единичных испытаний, полученных по одному и тому же методу на идентичном испытуемом материале в разных лабораториях, разными операторами, на разном оборудовании, должна быть не более 4 мкмоль/г при содержании глюкозинолатов менее 20 мкмоль/г, и не более 8 мкмоль/г при содержании глюкозинолатов в диапазоне от 20 до 35 мкмоль/г.

11 Протокол испытаний

В протоколе испытаний должен быть указан используемый метод и полученные результаты. В нем также должны быть приведены все детали анализа, не установленные настоящим стандартом или считающиеся необязательными, наряду с любыми инцидентами, которые могут повлиять на результат.

Протокол испытаний должен содержать всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 664:1990	—	*
ISO 665:1977	—	*, 1)
ISO 3696:1987	—	*
* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта.		

1) Действует ГОСТ ISO 665—2017 «Семена масличных культур. Определение содержания влаги и летучих веществ».

Библиография

[1] ISO 542:1990 Маслосемена — Отбор проб

[2] ISO 5725:1986[1)] Прецизионность методов испытаний — Определение повторяемости и воспроизводимости результатов стандартного метода с помощью межлабораторных испытаний

[1)] Заменен на ISO 5725-1:1994, ISO 5725-2:2019, ISO 5725-3:1994, ISO 5725-4:1994, ISO 5725-5:1998, ISO 5725-6:1994.

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.200.20

Ключевые слова: рапс, глюкозинолаты, высокоэффективная жидкостная хроматография, экстракция, десульфатация, ионообменная смола, сульфатаза, подвижная фаза, градиентное элюирование

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 23.11.2019. Подписано в печать 13.12.2019 Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,67.
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.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru