МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33277— 2015

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение массовой концентрации каротиноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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 РАЗРАБОТАН Некоммерческой организацией «Российский союз производителей соков» (РСПС) при участии Закрытого акционерного общества «Мултон» (ЗАО «Мултон»)

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 июля 2015 г. № 994-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33277—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 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, 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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 2
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы 3
5 Отбор и подготовка проб 4
6 Условия проведения измерений 4
7 Подготовка к проведению измерений 4
8 Проведение измерений 5
9 Метрологические характеристики 8
10 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости 8
11 Контроль результатов измерений при реализации метода 9
12 Требования безопасности 9
Приложение А (справочное) Примеры типовых хроматограмм каротиноидов в соковой продукции 10

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение массовой концентрации каротиноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products.
Determination of carotenoids
by high performance liquid chromatography

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары, сокосодержащие напитки, фруктовые и овощные концентрированные соки, пюре и концентрированные пюре, морсы и концентрированные морсы (далее — соковая продукция), в том числе обогащенные и предназначенные для детского питания, и устанавливает метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения (измерения) массовой концентрации β-каротина, лютеина и ликопина (далее — каротиноиды).

Диапазоны измерений массовой концентрации β-каротина — от 1 до 250 мг/дм^3, лютеина и ликопина — от 1 до 200 мг/дм^3.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

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

ГОСТ 6709 Реактивы. Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9293 Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы. Основные параметры и размеры

ГОСТ 26313 Продукты переработки фруктов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ 26671 Продукты переработки фруктов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

Издание официальное

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

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

ГОСТ ИСО 5725-2—2003[1)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-6—2003[2)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ ISO 3696[3)] Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний

ГОСТ ISO 7886-1 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru казателям 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 Сущность метода

Метод основан на количественном измерении каротиноидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по обращенно-фазовому механизму. Разделение каротиноидов осуществляется на твердом носителе С8 в изократическом режиме с использованием в качестве подвижной фазы смеси тетрагидрофурана и воды в объемном соотношении 70:30.

Детектирование разделенных каротиноидов β-каротина, лютеина и ликопина осуществляется с помощью спектрофотометрического детектора при длине волны 450 нм или диодноматричного детектора в диапазоне длин волн от 190 до 600 нм.

Идентификацию и количественный расчет пиков разделенных каротиноидов проводят при максимуме поглощения, указанном в таблице 1, что повышает избирательность хроматографического измерения. При необходимости для повышения точности хроматографического измерения идентификация β-каротина, лютеина и ликопина в соковой продукции может проводиться в сравнении времени удерживания и спектра поглощения стандартного раствора.

Таблица 1 — Параметры идентификации каротиноидов

Наименование каротиноида	Ориентировочное время удерживания, мин	Максимум светопоглощения, нм
β-каротин	13,8 ± 0,2	450 ± 5
Лютеин	4,6 ± 0,1	
Ликопин	13,0 ± 0,1	

[1)] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений».

[2)] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

[3)] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

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

Хроматограф жидкостный, с насосом высокого давления, спектрофотометрическим детектором, позволяющим проводить измерения оптической плотности с программируемой длиной волны от 190 до 600 нм, или диодноматричным детектором, позволяющим проводить измерения оптической плотности на нескольких длинах волн от 190 до 800 нм, инжектором для ручного или автоматического ввода проб и программным обеспечением для сбора и обработки хроматографических данных.

Колонка хроматографическая[1)] длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, сорбент — силикагель с привитыми группами С8.

Колонка защитная (предколонка) для колонки С8 (10,0 × 4,0 мм).

Весы неавтоматического действия по ГОСТ R OIML 76-1 специального класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности ±0,0005 г.

Фильтры с диаметром пор 0,20 мкм и 0,45 мкм[2)].

Емкости для жидких проб (виалы) с завинчивающимися крышками вместимостью 2 $см^3$.

Вставки для микрообъемов вместимостью 250 $мм^3$.

Микрошприцы вместимостью 250 $мм^3$ с ценой деления 10 $мм^3$ и погрешностью измерения ±2 %.

Шприц медицинский номинальной вместимостью 5 $см^3$ по ГОСТ ISO 7886-1.

Фильтры мембранные диаметром 47 мм с насадкой для шприца.

Микродозаторы пипеточные одноканальные переменного объема от 20 до 1000 $мм^3$ с относительной погрешностью дозирования ±1 % с соответствующими наконечниками по ГОСТ 28311.

pH-метр с погрешностью измерения ±0,05 ед. pH, в диапазоне измерений от 4 до 9 ед. pH.

Центрифуга настольная с относительным центробежным ускорением ротора не менее 1000 g, снабженная адаптерами для пробирок полимерных конических вместимостью 15 $см^3$.

Пробирки полимерные центрифужные конические с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 $см^3$.

Баня ультразвуковая лабораторная рабочим объемом не менее 2 $дм^3$.

Пипетки градуированные лабораторные стеклянные 1-1-2-1, 1-1-2-2, 1-1-2-5, 1-1-2-10, 1-1-2-25 по ГОСТ 29227.

Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Цилиндр 2-1000-1 по ГОСТ 1770.

Стаканы лабораторные В-1-50, В-1-100 и В-1-1000 по ГОСТ 25336.

Воронки лабораторные В-56-80 ХС, В-75-80 ХС, В-75-110 ХС, В-100-150 ХС по ГОСТ 25336.

Пробирки центрифужные градуированные, конические, полимерные с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 $см^3$.

Вещества стандартные каротиноидов (натурального или синтетического происхождения):

β-каротин ($C_{40}H_{56}$) с массовой долей основного вещества не менее 95 %.

Лютеин ($C_{40}H_{56}O_2$) с массовой долей основного вещества не менее 95 %.

Ликопин ($C_{40}H_{56}$) с массовой долей основного вещества не менее 90 %.

Тетрагидрофуран (ТГФ) для хроматографии с массовой долей основного вещества не менее 99,9 % и показателем преломления *nD* в пределах от 1,3439 до 1,3443.

Эфир этиловый уксусной кислоты (этилацетат) для хроматографии, с массовой долей основного вещества не менее 99,8 % и коэффициентом пропускания при длине волны 280 нм.

Вода по ГОСТ ISO 3696 2-й степени чистоты или по ГОСТ 6709.

Азот газообразный по ГОСТ 9293, о. ч.

Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования с техническими характеристиками, не уступающих вышеуказанным, а также реактивов, материалов и посуды с характеристиками не хуже вышеуказанных.

[1)] Колонка типа Hypersil GOLD C8 Thermo. Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования хроматографических колонок других фирм, обеспечивающих аналогичный порядок выхода компонентов и требуемую степень разделения.

[2)] Фильтры марки SUPOR (PES) фирмы Waters. Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования фильтров других марок и фирм, имеющих аналогичные свойства.

5 Отбор и подготовка проб

5.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 26313, подготовку лабораторных проб — по ГОСТ 26671.

5.2 Подготовка проб для измерений

5.2.1 Подготовка проб соков продукции без мякоти

В мерную колбу вместимостью V_2 = 50 см^3 помещают V_1 = 25 см^3 пробы, доводят до метки тетрагидрофураном и тщательно перемешивают. Далее проводят экстракцию этилацетатом. Для этого в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3 отбирают 10 см^3 приготовленного раствора, добавляют 5 см^3 этилацетата, завинчивают крышкой, встряхивают в течение 1 мин и центрифугируют при 9000 об/мин (фактор разделения не менее 990 g) в течение 10 мин. Затем через иглу отбирают в медицинский шприц окрашенный верхний слой. Экстракцию с последующим центрифугированием повторяют еще два раза, приливая каждый раз по 5 см^3 этилацетата. Экстракты объединяют в мерной колбе вместимостью 25 см^3 и доводят до метки этилацетатом. Отбирают 5 см^3 полученного раствора в стакан вместимостью 50 см^3, отдувают растворитель досуха в токе азота (без нагревания). Для этого в стакан с 5 см^3 полученного раствора помещают отводящую трубку от редуктора баллона с азотом по ГОСТ 9293 с наконечником по ГОСТ 28311 и отдувают растворитель.

Сухой остаток растворяют в 1 см^3 тетрагидрофурана, переносят в виалу и проводят хроматографическое измерение (см. 8.4).

5.2.2 Подготовка проб соковой продукции с мякотью

В мерную колбу вместимостью V_2 = 50 см^3 помещают V_1 = 25 см^3 пробы, доводят до метки тетрагидрофураном и тщательно перемешивают. Далее проводят экстракцию этилацетатом. Для этого в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3 отбирают 10 см^3 приготовленного раствора, добавляют 5 см^3 этилацетата, завинчивают крышкой, встряхивают в течение 1 мин и центрифугируют при 9000 об/мин (фактор разделения не менее 990 g) в течение 10 мин. Затем через иглу отбирают в медицинский шприц окрашенный верхний слой, не затрагивая мякоть на границе разделения слоев. Далее повторяют все операции согласно 5.2.1.

5.2.3 Подготовка проб концентрированной соковой продукции

Концентрированные соки и пюре различных фруктов, ягод и овощей разбавляют водой в пять раз весовым методом. Далее проводят все операции, описанные в 5.2.2.

5.2.4 Подготовка проб соковой продукции с высоким содержанием каротиноидов

В случае визуального обнаружения нерастворившихся каротиноидов (маслообразные капли оранжевого цвета на поверхности раствора) при разбавлении пробы тетрагидрофураном начальную пробу разбавляют следующим образом:

- пробу соковой продукции разбавляют водой в два раза;
- пробу концентрированной соковой продукции разбавляют водой в десять раз весовым методом.

После этого операции, описанные в 5.2.1—5.2.3, повторяют. Данные разбавления учитывают при вычислении конечного результата.

5.3 Срок хранения подготовленных проб в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С — не более 2 ч.

6 Условия проведения измерений

При подготовке к проведению измерений и при проведении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха ..... (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление ..... (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность ..... не более 80 %;
- напряжение в питающей сети ..... (220 ± 20) В;
- частота тока в питающей сети ..... (50 ± 1) Гц.

При проведении измерения принимают во внимание, что каротиноиды чувствительны к световому и тепловому воздействиям. Измерения проводят в месте, защищенном от действия прямого солнечного или ультрафиолетового излучения.

7 Подготовка к проведению измерений

7.1 Подготовка хроматографа к работе

Включение и подготовку хроматографа к работе, вывод его на режим и выключение по окончании работы выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации.

7.2 Приготовление подвижной фазы для жидкостной хроматографии

В мерный цилиндр вместимостью 1000 см^3 приливают 300 см^3 воды и 700 см^3 тетрагидрофурана, перемешивают. Полученный раствор дегазируют под вакуумом в течение 15 мин с одновременной фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Допускается приготовление меньшего объема подвижной фазы исходя из потребности в ней.

Раствор хранят в стеклянной бутылке с плотно закрытой крышкой в течение двух рабочих дней.

Перед использованием подвижную фазу дегазируют в круглодонной колбе под вакуумом на ультразвуковой бане или другим способом.

7.3 Приготовление градуировочных растворов

7.3.1 Приготовление основного градуировочного раствора А каротиноидов с массовой концентрацией β-каротина, лютеина и ликопина по 50,4 мг/дм^3

Взвешивают по (0,0053 ± 0,0002) г β-каротина, лютеина и (0,0056 ± 0,0002) г ликопина в стакане вместимостью 100 см^3, растворяют в 30 см^3 ТГФ (см. раздел 4), затем переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем раствора до метки ТГФ и перемешивают.

7.3.2 Приготовление рабочих градуировочных растворов

Из основного раствора готовят не менее пяти рабочих градуировочных растворов каротиноидов путем точного разбавлениея (разведения) в соответствии с таблицей 2. Аликвоты основного раствора дозируют с использованием пипеток 1-1-2-1, 1-1-2-5, 1-1-2-10, 1-1-2-25 по ГОСТ 29227.

Приготовленные рабочие растворы рекомендуется профильтровать через мембранный фильтр.

Таблица 2 — Приготовление градуировочных растворов

№ градуировочного раствора (j = 1…5)	Компоненты	Объем мерной колбы, см^3	Способ приготовления	Массовая концентрация в полученном растворе $C_{гр,j}$, мг/дм^3
1	β-каротин	50	В мерную колбу приливают 20,0 см^3 раствора А, приготовленного по 7.3.1, доводят до метки тетрагидрофураном и перемешивают	20,2
	Лютеин			20,2
	Ликопин			20,2
2	β-каротин	50	В мерную колбу приливают 10,0 см^3 раствора А, приготовленного по 7.3.1, доводят до метки тетрагидрофураном и перемешивают	10,1
	Лютеин			10,1
	Ликопин			10,1
3	β-каротин	50	В мерную колбу приливают 5,0 см^3 раствора А, приготовленного по 7.3.1, доводят до метки тетрагидрофураном и перемешивают	5,0
	Лютеин			5,0
	Ликопин			5,0
4	β-каротин	50	В мерную колбу приливают 2,5 см^3 раствора А, приготовленного по 7.3.1, доводят до метки тетрагидрофураном и перемешивают	2,5
	Лютеин			2,5
	Ликопин			2,5
5	β-каротин	50	В мерную колбу приливают 1,0 см^3 раствора А, приготовленного по 7.3.1, доводят до метки тетрагидрофураном и перемешивают	1,0
	Лютеин			1,0
	Ликопин			1,0

Градуировочные растворы готовят непосредственно перед градуировкой хроматографа.

8 Проведение измерений

8.1 Условия хроматографических измерений

Измерения проводят при следующих условиях:

- температура термостата колонки: (20 ± 5) °С (при отсутствии термостата допускается проведение измерений при температуре окружающего воздуха, приведенной в разделе 6);

- рабочая длина волны светопоглощения: 450 нм (для спектрофотометра) или диапазон волн светопоглощения 190—600 нм (для фотодиодной матрицы);
- объем вводимой пробы: 5—20 мм^3;
- режим элюирования: изократический;
- скорость потока: 1,0 см^3/мин.

Проверку эффективности хроматографического разделения каротиноидов в данных условиях осуществляют путем измерения раствора с массовой концентрацией каротиноидов 5 мг/дм^3 (см. таблицу 2, раствор № 3). В случае ручного ввода пробы петлю инжектора полностью заполняют подготовленным раствором № 3. Эффективность хроматографического разделения признают удовлетворительной, если коэффициент разделения пиков лютеина и бета-каротина, составляет не менее 1,3, а число эффективных теоретических тарелок, вычисленное по пику бета-каротина составляет не менее 4000. Если данное условие не соблюдается, то для достижения требуемой эффективности проводят замену хроматографической колонки на аналогичную новую. Контроль эффективности хроматографического разделения проводят не реже одного раза в две недели.

В зависимости от типа применяемого хроматографа и хроматографической колонки допускается изменение условий измерений, обеспечивающих требуемое разделение компонентов пробы в порядке, указанном в настоящем разделе.

8.2 Градуировка хроматографа

Для установления градуировочной характеристики в инжектор хроматографа дозируют рабочие градуировочные растворы, приготовленные в соответствии с таблицей 2, и регистрируют их хроматограммы в условиях, приведенных в 8.1.

Для каждого градуировочного раствора выполняют два параллельных измерения в условиях повторяемости. Компоненты идентифицируют по абсолютным значениям времени удерживания.

Вычисляют с помощью компьютерной программы обработки данных или вручную методом наименьших квадратов градуировочные коэффициенты и устанавливают градуировочную характеристику для площади пика каждого каротиноида в градуировочном растворе

$$\overline{S}_i = kC_i + b, \qquad (1)$$

где $\overline{S}_i$ — площадь пика каротиноида (среднеарифметическое значение из результатов двух измерений) при измерении i-го градуировочного раствора, AU·с;

C_i — массовая концентрация каротиноида в i-м градуировочном растворе, мг/дм^3;

b, k — градуировочные коэффициенты в уравнении прямой, вычисленные методом наименьших квадратов.

Градуировочную характеристику, вычисленную методом наименьших квадратов, считают приемлемой, если значение квадрата коэффициента корреляции R^2 для каждого каротиноида составляет не менее 0,990.

Градуировочную характеристику строят заново в случае замены оборудования, колонок, партий реактивов или при выявлении несоответствия метрологическим требованиям результатов контроля стабильности, но не реже одного раза в месяц.

8.3 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Проверку градуировочной зависимости проводят перед каждой новой серией измерений. Допускается проводить контроль только по одному из каротиноидов, чередуя их.

Измеряют два градуировочных раствора, приготовленные по 7.3.2, с массовой концентрацией каротиноидов, близкой к началу и концу диапазона измерений, в тех же условиях, в которых была установлена градуировочная характеристика.

Регистрируют хроматограммы каждого градуировочного раствора в тех же условиях, в которых была установлена градуировочная характеристика.

Измеренное таким образом значение массовой концентрации каротиноидов сравнивают с реальным содержанием каротиноидов в градуировочных растворах по условию (2).

Градуировочную характеристику считают стабильной в случае, если для каждого градуировочного раствора выполняется условие

$$\frac{\left|C_{\text{изм},i} - C_{\text{гр},i}\right|}{C_{\text{гр}.\,i}} \cdot 100 \le K_{\text{гр},\,i}, \qquad (2)$$

где $C_{изм,i}$ — массовая концентрация каротиноида в i-м градуировочном растворе, измеренная по градуировочной характеристике, мг/дм^3;

$C_{гр,i}$ — массовая концентрация каротиноида в i-м градуировочном растворе, мг/дм^3;

$K_{гр,i}$ — норматив контроля, $K_{гр,i} = 0{,}5 \cdot \delta_{i,отн}$,

где $\delta_{i,отн}$ — границы относительной погрешности для β-каротина, лютеина или ликопина (см. таблицу 3), %;

i — номер градуировочного раствора (см. таблицу 2).

Если условие стабильности (2) не выполняется только для одного градуировочного раствора, то выполняют повторное измерение этого раствора с целью исключения результата, содержащего ошибку.

Если градуировочная характеристика нестабильна, выясняют причины нестабильности и повторяют контроль стабильности с использованием других растворов для градуировки (см. 7.3.2). При повторном невыполнении условия (2) градуировку строят заново во всем диапазоне измерений.

8.4 Измерение проб

В инжектор хроматографа вводят подготовленную по 5.5.1—5.5.3 пробу и проводят измерения в условиях, указанных в 8.1.

Регистрируют на хроматограммах пики, соответствующие временам удерживания каротиноидов, найденных при измерении градуировочных растворов по 8.2.

Относительное расхождение времени удерживания идентифицированных каротиноидов в пробе не должно отличаться от времени удерживания каротиноидов в градуировочном растворе более чем на 5 %. Если данное условие не соблюдается, то измерения повторяют.

Примеры хроматограмм и условия измерения конкретных каротиноидов приведены в приложении А.

Значения площади пика каротиноида на хроматограммах используют для вычисления массовой концентрации по разделу 8.5 при условии, что они не выходят за верхнюю границу диапазона градуировки хроматографа. Если данное условие не соблюдается, то уменьшают вводимый объем пробы в два раза и проводят ее повторное измерение.

При вычислении площадь пика в этом случае умножают в два раза.

8.5 Обработка и оформление результатов измерений

8.5.1 В соответствии с данными, полученными при измерении градуировочных растворов, оформляют таблицу пиков с использованием программного обеспечения хроматографа. Обработку хроматограмм проводят методом абсолютной градуировки.

8.5.2 Массовую концентрации β-каротина, лютеина или ликопина C_i, мг/дм^3, в соковой продукции вычисляют по формуле

$$C_i = \frac{(S_i - b)}{k_i} \cdot \frac{V_2}{V_1}, \qquad (3)$$

где S_i — площадь пика β-каротина, лютеина или ликопина в пробе соковой продукции, AU·с; AU — «*absorbance units*», единицы абсорбции;

b — коэффициент в уравнении градуировочной зависимости, AU·с;

k_i — градуировочный коэффициент для β-каротина, лютеина или ликопина, AU · с · (мг/дм^3)$^{-1}$;

V_2 — вместимость мерной колбы, взятой для разбавления (см. 5.2.1, 5.2.2), см^3;

V_1 — объем пробы соковой продукции, взятой для измерения (см. 5.2.1, 5.2.2), см^3.

Все вычисления проводят до первого десятичного знака.

8.5.3 За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, если относительное расхождение между ними при соблюдении условий согласно ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (подпункт 5.2.2.1) не превышает предела повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, указанного в таблице 3 при доверительной вероятности $P = 0{,}95$:

$$\frac{2 \cdot |C_{i1} - C_{i2}| \cdot 100}{(C_{i1} + C_{i2})} \le r_{отн}, \qquad (4)$$

где C_{i1}, C_{i2} — результаты параллельных измерений массовой концентрации каротиноидов, мг/дм^3;

$r_{отн}$ — значение предела повторяемости, % (см. таблицу 3).

8.5.4 В случае превышения предела повторяемости $r_{отн}$ выполняют условия ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (подпункт 5.2.2.1).

8.5.5 Результаты измерений в документах, предусматривающих их использование, представляют согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025 с указанием метода и настоящего стандарта в виде:

$$\overline{C} \pm 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{C} \text{ при } P = 0{,}95,$$

где $\overline{C}$ — среднеарифметическое значение результатов n измерений каротиноидов, признанных приемлемыми по 8.5.3, 8.5.4, мг/дм^3;

δ — границы относительной погрешности измерений каротиноидов (см. таблицу 3), %.

Если массовая концентрация каротиноидов выходит за пределы границы диапазона измерений, проводят следующую запись в журнале: «массовая концентрация β-каротина, лютеина или ликопина менее 1 мг/дм^3».

Числовое значение результата измерения должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение границ абсолютной погрешности. Значение границ абсолютной погрешности приводят с одной значащей цифрой после запятой.

9 Метрологические характеристики

При соблюдении всех условий и проведении измерений в точном соответствии с настоящим стандартом значение погрешности измерений (и ее составляющих) не превышает значений, представленных в таблице 3.

Таблица 3 — Основные метрологические характеристики метода

Каротиноид	Диапазон измерений массовой концентрации, мг/дм^3	Показатель точности (границы относительной погрешности) ±δ, %, при $P = 0{,}95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) $\sigma_{r,отн}$, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) $\sigma_{R,отн}$, %	Предел повторяемости $r_{отн}$, %, при $P = 0{,}95$, $n = 2$
β-каротин	От 1,0 до 10,0 включ.	25	5	8	14
	Св. 10 до 250,0 включ.	13	2,5	4	7
Лютеин	От 1,0 до 10,0 включ.	28	6	10	17
	Св. 10,0 до 200,0 включ.	15	3	5	8
Ликопин	От 1,0 до 10,0 включ.	25	5	8	14
	Св. 10,0 до 200,0 включ.	13	2,5	4	7
Примечание — Показатели прецизионности и точности метода были установлены при межлабораторном испытании, проведенном в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-2—2003 (пункт 7.5) и ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (пункт 4.2).					

10 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

10.1 Проверку приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости проводят:

- при возникновении спорных ситуаций между двумя лабораториями;
- проверке совместимости результатов измерений, полученных при сличительных испытаниях.

10.2 Для проведения проверки приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости каждая лаборатория использует пробы, оставленные на хранение.

Приемлемость результатов измерений, полученных в двух лабораториях, оценивают сравнением разности этих результатов с критической разностью $CD_{0,95}$ по формуле

$$\frac{2 \cdot \left| C_{ср1} - C_{ср2} \right| \cdot 100}{(C_{ср1} + C_{ср2})} \le CD_{0,95}, \quad (5)$$

где $C_{ср1}$, $C_{ср2}$ — средние значения массовой концентрации каротиноидов, полученные в первой и второй лабораториях, мг/дм^3;

$CD_{0,95}$ — значение критической разности, вычисляемое по формуле

$$CD_{0,95} = 2{,}77 \cdot 0{,}01 \cdot \overline{C}_{1,2} \sqrt{\sigma^2_{R,\ отн} - \sigma^2_{r,\ отн}\left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}, \quad (6)$$

где 2,77 — коэффициент Q (0,95; 2) критического диапазона для двух измерений, полученных в условиях воспроизводимости по ГОСТ ИСО 5725-6;

0,01 — множитель для перехода от процентов к абсолютным значениям;

$\overline{C}_{1,2}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений, полученных в первой и второй лабораториях, мг/дм^3;

$\sigma_{R,\ отн}$ — показатель воспроизводимости, % (см. таблицу 3);

$\sigma_{r,\ отн}$ — показатель повторяемости, % (см. таблицу 3);

$n_1 = n_2 = 2$.

Если критическая разность не превышена, то приемлемы оба результата измерений, проводимых двумя лабораториями, и в качестве окончательного результата используют их среднеарифметическое значение. Если критическая разность превышена, то выполняют процедуры в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (пункт 5.3.3).

При разногласиях руководствуются ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (пункт 5.3.4).

11 Контроль результатов измерений при реализации метода

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории при реализации метода выполняют по ГОСТ ИСО 5725-6, используя методы контроля стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности по ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (пункт 6.2.3) и показателя правильности по ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (пункт 6.2.4). Проверку стабильности проводят с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполнения измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

При неудовлетворительных результатах контроля, например при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

12 Требования безопасности

12.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004 и ГОСТ 12.1.018.

Требования электробезопасности при работе с приборами — по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

Остатки проб соковой продукции утилизируют в порядке, установленном в руководстве по качеству в лаборатории.

12.2 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений, обработке и оформлению результатов допускаются инженеры-химики, лаборанты, имеющие высшее или среднеспециальное образование, опыт работы с данным оборудованием и знакомые с настоящим методом.

Первое применение метода в лаборатории должно проводиться под руководством специалиста, владеющего теорией высокоэффективной жидкостной хроматографии и имеющего практические навыки в этой области.

Приложение А
(справочное)

Примеры типовых хроматограмм каротиноидов в соковой продукции

А.1 Примеры типовых хроматограмм каротиноидов в соковой продукции приведены на рисунках А.1—А.3.

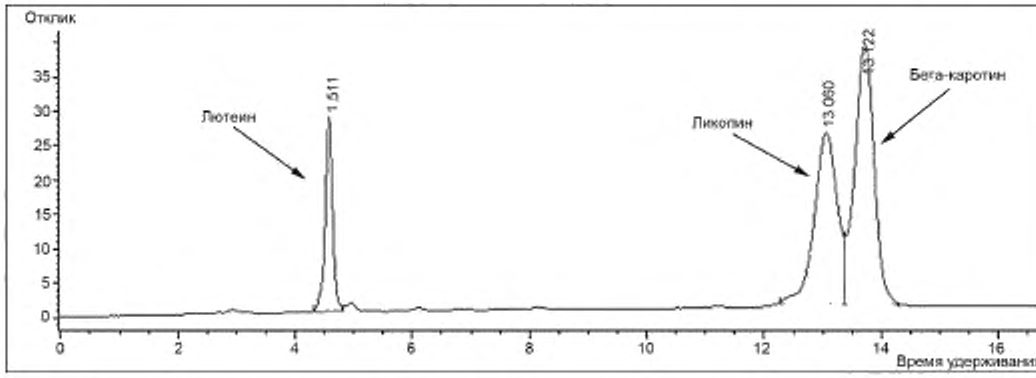


Рисунок А.1 — Хроматограмма образца мультифруктового сока с концентрацией каротиноидов (лютеина, ликопина, бета-каротина) — 4 мг/дм^3

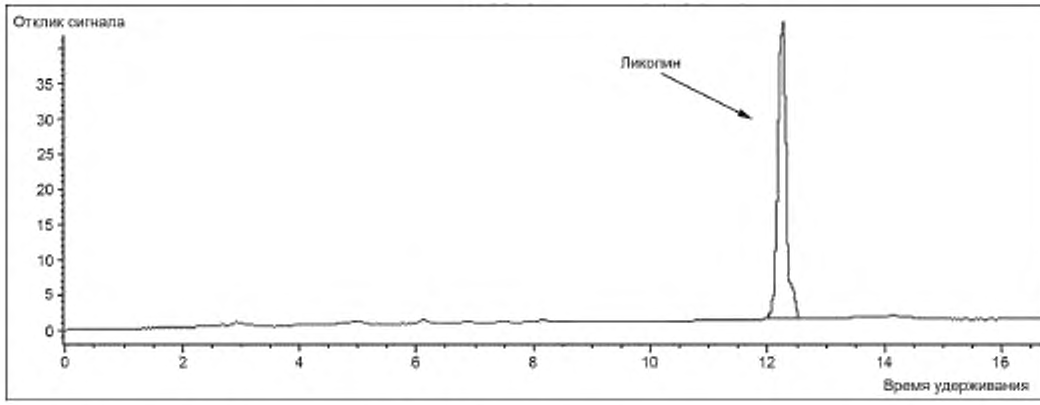


Рисунок А.2 — Хроматограмма образца томатного сока с концентрацией ликопина — 6 мг/дм^3

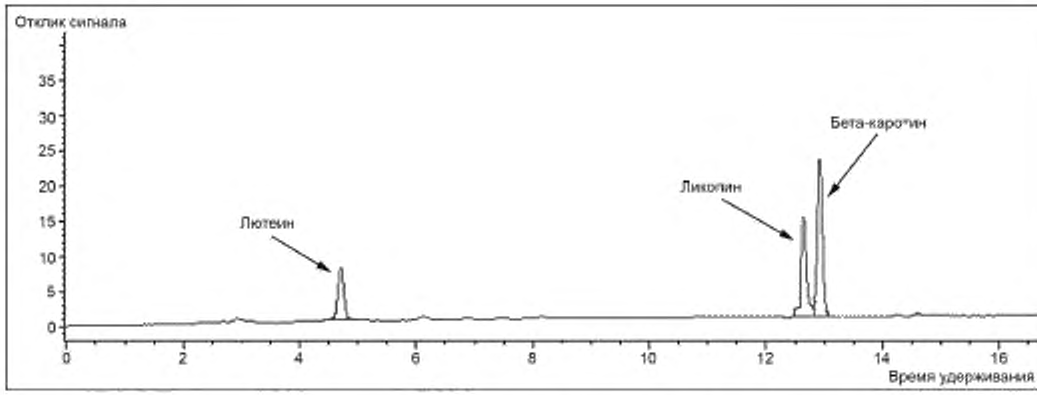


Рисунок А.3 — Хроматограмма образца обогащенного мультифруктового нектара с концентрацией лютеина — 1 мг/дм^3, ликопина — 3 мг/дм^3 и бета-каротина — 2,5 мг/дм^3

УДК664.863.001.4:006.354

МКС 67.050
67.080

Ключевые слова: соковая продукция, измерение, фруктовые и овощные соки, нектары, морсы, сокосодержащие напитки, каротиноиды, массовая доля, массовая концентрация, ВЭЖХ

Редактор *Е.В. Яковлева*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 27.11.2019. Подписано в печать 03.12.2019 Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.
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 gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru