МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ 34461— 2018**

# ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

## Определение содержания гесперидина и нарингина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «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 Общества с ограниченной ответственностью «Люмэкс-маркетинг» (ООО «Люмэкс-маркетинг»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 августа 2018 г. № 111-П)

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 |
| Киргизия | KG | Кыргызстандарт |
| Россия | RU | Росстандарт |
| Узбекистан | UZ | Узстандарт |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 октября 2018 г. № 755-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34461—2018 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 ноября 2019 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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 (www.gost.ru)*

© Стандартинформ, оформление, 2018

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, реактивы, посуда и материалы ..... 2
5 Отбор проб ..... 3
6 Условия проведения измерений ..... 3
7 Подготовка к проведению измерений ..... 4
8 Проведение измерений ..... 7
9 Обработка и оформление результатов измерений ..... 8
10 Контроль качества результатов измерений ..... 9
11 Требования безопасности ..... 10
12 Требования к квалификации операторов ..... 10
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм ..... 11

**Поправка к ГОСТ 34461—2018 Продукция соковая. Определение содержания гесперидина и нарингина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

| В каком месте | Напечатано | Должно быть | | |
|---|---|---|---|---|
| Предисловие. Таблица согласования | — | Казахстан | KZ | Госстандарт Республики Казахстан |

(ИУС № 4 2020 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й  С Т А Н Д А Р Т

# ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

## Определение содержания гесперидина и нарингина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Juice products.
Determination of hesperidin and naringin content by HPLC method

**Дата введения — 2019—11—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на соковую продукцию (соки, концентрированные соки, нектары, сокосодержащие напитки), произведенную на основе или с добавлением цитрусовых фруктов (апельсина, грейпфрута, мандарина, лимона и лайма), и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ) для определения содержания (массовой концентрации и массовой доли) гесперидина и нарингина.

Диапазон измерений массовой концентрации нарингина в готовой соковой продукции (соки, нектары и сокосодержащие напитки) составляет от 30 до 1000 мг/дм$^3$, а гесперидина — от 100 до 1000 мг/дм$^3$.

Диапазон измерений массовой доли нарингина в концентрированных соках составляет от 150 до 5000 млн$^{-1}$, а гесперидина — от 500 до 5000 млн$^{-1}$.

Примечание — 1 млн$^{-1}$ соответствует 1 мг/кг.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ ISO 3696—2013** Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 5712—78 Реактивы. Аммоний щавелевокислый 1-водный. Технические условия

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

**Издание официальное**

ГОСТ ИСО 5725-1—2003* Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

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

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 20289—74 Реактивы. Диметилформамид. Технические условия

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

ГОСТ 26313—2014 Продукты переработки фруктов и овощей. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 28311—89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя за текущий год. 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 экстракции гесперидина и нарингина из проб соковой продукции смесью N,N-диметилформамида и водного раствора щавелевокислого аммония с последующим измерением массовой концентрации указанных соединений в экстракте методом ВЭЖХ с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра.

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

4.1 Хроматограф жидкостный со спектрофотометрическим детектором, обеспечивающим проведение измерений при 287 нм или диодно-матричным детектором в диапазоне длин волн от 190 до 600 нм, снабженный программным обеспечением для сбора и обработки данных, со следующими метрологическими характеристиками:

- относительное среднеквадратическое отклонение выходного сигнала по высоте и площади пика — не более 3 %;
- относительное среднеквадратическое отклонение выходного сигнала по времени удерживания — не более 1,0 %.

Предел детектирования гесперидина и нарингина (при соотношении сигнал/шум, равном трем) должен быть не более 0,2 мг/дм$^3$.

Рекомендуется использование термостата колонок.

4.2 Колонка хроматографическая***, заполненная обращенно-фазовым сорбентом С18, обеспечивающая число теоретических тарелок по пикам гесперидина и нарингина не менее 3000.

4.3 Колонка защитная (предколонка), заполненная обращенно-фазовым сорбентом.

4.4 Весы неавтоматического действия специального класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности измерений ± 0,0001 г.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002.

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

*** Например, хроматографические колонки Nucleosil 100-5C18 и Agilent ZORBAX SB-C18. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой указанных продуктов. Допускается использование аналогичных хроматографических колонок, в том числе с иными типоразмерами при соблюдении указанных требований.

4.5 Весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1, пределом допускаемой абсолютной погрешности измерения ± 0,001 г.

4.6 Пипетки градуированные 2-1-2-1, 2-1-2-2, 2-1-2-5 и 2-1-2-10 по ГОСТ 29227.

Примечание — Допускается использование дозаторов с метрологическими характеристиками, соответствующими ГОСТ 28311.

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

4.8 Цилиндры мерные вместимостью 50, 100, 250, 1000 $см^3$, 2-го класса точности, исполнений 2 или 2а по ГОСТ 1770.

4.9 Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 83 $с^{-1}$ (5000 об/мин), обеспечивающая фактор разделения (*g*-фактор) не менее 1000.

4.10 Шкаф сушильный с диапазоном рабочих температур от 50 °С до 200 °С.

4.11 Насос лабораторный вакуумный, мембранный или водоструйный по ГОСТ 25336, обеспечивающий разрежение от 2,5 до 10 кПа.

4.12 Баня водяная с регулятором температуры, обеспечивающая поддержание температуры в диапазоне от 40 °С до 100 °С.

4.13 Стаканы любого типа исполнения 1 вместимостью 50, 100 $см^3$ по ГОСТ 25336.

4.14 Колбы плоскодонные П-1-1000-29/32 или конические Кн-1-250-29/32, Кн-1-1000-29/32 по ГОСТ 25336.

4.15 Сосуды стеклянные с завинчивающимися крышками (виалы) с инертным материалом септы вместимостью от 10 до 20 $см^3$.

4.16 Пробирки одноразовые из полимерного материала типа Эппендороф или аналогичные вместимостью от 1 до 2 $см^3$.

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

4.18 Фильтры мембранные с диаметром пор 0,20 и 0,45 мкм.

4.19 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода для лабораторного анализа по ГОСТ ISO 3696 1-й степени чистоты (далее — вода для анализа).

4.20 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии (оптическая плотность при 200 нм относительно дистиллированной воды должна быть не более 0,05 единиц оптической плотности), ос. ч.

4.21 N,N-Диметилформамид по ГОСТ 20289, х. ч.

4.22 Аммоний щавелевокислый 1-водный по ГОСТ 5712, х. ч.

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

4.24 Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч. или ч. д. а.

4.25 Гесперидин* с массовой долей основного вещества не менее 95 %.

4.26 Нарингин** с массовой долей основного вещества не менее 95 %.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования, посуды, материалов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных и химических реактивов аналогичной квалификации.

## 5 Отбор проб

Отбор проб соковой продукции — по ГОСТ 26313.

## 6 Условия проведения измерений

При подготовке к проведению измерений и проведении измерений в лаборатории соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха .....(20 ± 5) °С;
- атмосферное давление .....от 84,0 до 106,7 кПа;
- влажность воздуха .....не более 80 %.

В лабораторных помещениях не должно быть загрязненности воздуха рабочей зоны пылью и агрессивными веществами, должны отсутствовать вибрация или другие факторы, влияющие на результаты измерений.

* CAS 520-26-3 (CAS — код соединения в американской реферативной системе по химии (Chemical Abstracts).

** CAS 10236-47-2.

## 7 Подготовка к проведению измерений

### 7.1 Подготовка стеклянной посуды

Посуду для приготовления и хранения подвижной фазы моют только серной кислотой (см. 4.24) без применения других моющих средств, тщательно промывают водопроводной водой и ополаскивают водой для анализа.

Остальную стеклянную посуду моют горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают водой для анализа и сушат в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

### 7.2 Приготовление вспомогательных растворов

#### 7.2.1 Приготовление раствора уксусной кислоты молярной концентрации 0,2 моль/дм$^3$

В мерную колбу вместимостью 1000 см$^3$ помещают приблизительно 200 см$^3$ дистиллированной воды, добавляют 12 см$^3$ концентрированной уксусной кислоты, разбавляют дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Срок хранения раствора в стеклянном сосуде при температуре (4 ± 2) °С — 3 мес.

#### 7.2.2 Приготовление подвижной фазы

Подвижную фазу готовят смешиванием 200 см$^3$ ацетонитрила (см. 4.20) и 800 см$^3$ раствора уксусной кислоты (см. 7.2.1) в плоскодонной колбе вместимостью 1000 см$^3$ (см. 4.14).

Срок хранения подвижной фазы в стеклянном сосуде при температуре (4 ± 2) °С — 14 сут.

Перед использованием подвижную фазу дегазируют и фильтруют в соответствии с указаниями изготовителя хроматографа и (или) колонки.

Примечания

1 В зависимости от типа сорбента и типоразмера применяемых колонок допускается варьирование состава подвижной фазы с целью разделения пиков гесперидина и нарингина и их отделения от пиков компонентов матрицы пробы.

2 Допускается приготовление иных объемов подвижной фазы в зависимости от потребности.

#### 7.2.3 Приготовление раствора щавелевокислого аммония молярной концентрации 0,025 моль/дм$^3$

В химическом стакане вместимостью 50 или 100 см$^3$ взвешивают (3,55 ± 0,05) г щавелевокислого аммония 1-водного (см. 4.22) и растворяют приблизительно в 30 см$^3$ воды для анализа. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см$^3$. Доводят до метки водой для анализа и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в стеклянном сосуде при температуре (20 ± 5) °С — 3 мес.

Примечание — Допускается изменять объем приготавливаемого раствора в зависимости от потребности.

### 7.3 Приготовление градуировочных и контрольных растворов

#### 7.3.1 Общие положения

Растворы гесперидина и нарингина следует хранить в темном месте при температуре от 2 °С до 6 °С в герметичной посуде, исключающей возможность испарения растворителя и контакт раствора с материалами иными, чем стекло. Растворы каждой концентрации готовят по потребности.

#### 7.3.2 Приготовление основного раствора гесперидина номинального значения массовой концентрации 500 мг/дм$^3$

В мерную колбу вместимостью 50 см$^3$ помещают (25,0±0,5) мг гесперидина (см. 4.25), добавляют 10 см$^3$ N,N-диметилформамида (см. 4.21), тщательно перемешивают до полного растворения (при необходимости нагревают на водяной бане при температуре от 40 °С до 45°С). Содержимое колбы доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по 7.2.2, и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в условиях по 7.3.1 — 4 сут.

#### 7.3.3 Приготовление основного раствора нарингина номинального значения массовой концентрации 1000 мг/дм$^3$

В мерную колбу вместимостью 25 см$^3$ помещают (25,0 ± 0,5) мг нарингина (см. 4.26), добавляют 5 см$^3$ N,N-диметилформамида (см. 4.21) и перемешивают до полного растворения нарингина. Содержимое колбы доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по 7.2.2, и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в условиях по 7.3.1 — 4 сут.

7.3.4 Фактическое значение массовой концентрации гесперидина (нарингина) в основном растворе $C_{осн}$, мг/дм$^3$, вычисляют по формуле

$$C_{осн} = \frac{M \cdot 1000 \cdot \theta}{V_1 \cdot 100}, \quad (1)$$

где $M$ — масса гесперидина (нарингина), мг;

1000 — коэффициент согласования размерности единиц объема;

$\theta$ — массовая доля основного вещества в исходном реактиве, использованном для приготовления основного раствора (указано в паспорте изготовителя), %,

$V_1$ — объем основного раствора, см$^3$;

100 — коэффициент для перевода массовой доли основного вещества из процентов в безразмерную величину.

**7.3.5 Приготовление градуировочных растворов**

7.3.5.1 Приготовление градуировочного раствора № 1

В стеклянный сосуд с завинчивающейся крышкой (виалу) вместимостью от 10 до 20 см$^3$ помещают пипеткой или дозатором 2 см$^3$ основного раствора гесперидина (см. 7.3.2) и 1 см$^3$ основного раствора нарингина (см. 7.3.3), добавляют пипеткой или дозатором 7 см$^3$ подвижной фазы, приготовленной по 7.2.2, и тщательно перемешивают.

Номинальное значение массовой концентрации компонентов в градуировочном растворе № 1 составляет 100 мг/дм$^3$. Фактическое значение массовой концентрации компонентов $C_1$, мг/дм$^3$, вычисляют по формуле

$$C_1 = \frac{C_{осн} \cdot V_{осн}}{V_{гр}} \quad (2)$$

где $C_{осн}$ — фактическое значение массовой концентрации компонента в основном растворе (см. 7.3.4), мг/дм$^3$;

$V_{осн}$ — объем основного раствора компонента, использованный для приготовления градуировочного раствора № 1, см$^3$;

$V_{гр}$ — объем приготовленного градуировочного раствора № 1, см$^3$ (10 см$^3$).

Раствор используют в день приготовления.

7.3.5.2 Приготовление градуировочных растворов № 2—5

В стеклянные сосуды с завинчивающейся крышкой (виалы) вместимостью от 10 до 20 см$^3$ помещают пипеткой или дозатором градуировочный раствор № 1 (см. 7.5.3.1), добавляют пипеткой или дозатором подвижную фазу, приготовленную по 7.2.2 (см. таблицу 1), и тщательно перемешивают.

Таблица 1

| Номер раствора | Объем аликвоты градуировочного раствора № 1, см$^3$ | Объем подвижной фазы, приготовленной по 7.2.2, см$^3$ | Массовая концентрация (номинальное значение) гесперидина (нарингина), мг/дм$^3$ |
|---|---|---|---|
| 2 | 4 | 6 | 40 |
| 3 | 2 | 8 | 20 |
| 4 | 1 | 9 | 10 |
| 5* | 0,5 | 9,5 | 5 |
| * Раствор № 5 используют только при установлении градуировочной характеристики для нарингина. | | | |

Фактическое значение массовой концентрации компонента в приготовленном градуировочном растворе $C_j$, мг/дм$^3$, вычисляют по формуле

$$C_j = \frac{C_1 \cdot V_{ал}}{V_j}, \quad (3)$$

где $C_1$ — фактическое значение массовой концентрации компонента в градуировочном растворе № 1 (см. 7.3.5.1), мг/дм$^3$;

$V_{ал}$ — объем аликвоты градуировочного раствора № 1, использованный для приготовления данного градуировочного раствора (см. таблицу 1), см$^3$;

$V_j$ — объем приготовленного градуировочного раствора, см$^3$ (10 см$^3$).

Растворы используют в день приготовления.

### 7.4 Подготовка хроматографа к работе

Включение и подготовку хроматографа к работе, вывод его на рабочий режим, включая кондиционирование колонки, а также промывку гидравлической линии хроматографа и выключение хроматографа по окончании работы осуществляют в соответствии с руководством по эксплуатации.

### 7.5 Условия хроматографического анализа

При проведении хроматографического анализа создают и поддерживают следующие условия:

- температура колонки — 25 °С (при наличии термостата колонок);
- длина волны детектирования при использовании спектрофотометрического детектора — 287 нм;
- объем дозирования пробы — полное заполнение дозирующей петли (от 10 до 20 мм$^3$);
- режим элюирования — изократический, подвижная фаза — по 7.2.2;
- объемную скорость потока подвижной фазы определяют типоразмерами хроматографической колонки. Рекомендуемое значение составляет 1,0 см$^3$/мин для колонок длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм и 0,2 см$^3$/мин — для колонок длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм.

### 7.6 Градуировка хроматографа

Для градуировки хроматографа регистрируют по две хроматограммы градуировочных растворов № 1—5 (см. 7.3.5) и, используя программное обеспечение к хроматографу, находят площади пиков компонентов, а затем устанавливают градуировочную характеристику для каждого компонента в виде функциональной зависимости площади пика от массовой концентрации компонента.

Градуировку проводят при освоении метода и далее — при смене оборудования, колонок, условий хроматографического анализа, при значительном изменении параметров хроматографического процесса (времени удерживания, эффективности, разрешения и асимметрии пиков), после ремонта хроматографа или при неудовлетворительных результатах контроля стабильности градуировочной характеристики (см. 7.7).

Примечание — После длительного перерыва в работе рекомендуется проверить стабильность градуировочной характеристики в нескольких точках (не менее двух) диапазона.

### 7.7 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы, используя заново приготовленный градуировочный раствор № 2.

Регистрируют не менее двух хроматограмм этого раствора, идентифицируют пики компонентов, внося при необходимости коррекцию времен удерживания и принимая во внимание параметры хроматографического процесса (эффективность колонки, время удерживания пиков, разрешение пиков, асимметрию пиков), и вычисляют массовую концентрацию гесперидина и нарингина с использованием действующей градуировочной характеристики.

Проверяют сходимость времен удерживания

$$|t_1 - t_2| \le 0{,}05 \cdot \bar{t}, \qquad (4)$$

где $t_1$ и $t_2$ — время удерживания пика компонента на первой и второй хроматограммах соответственно, мин;

$\bar{t}$ — среднеарифметическое значение времен удерживания $t_1$ и $t_2$, мин.

Проверяют сходимость значений массовой концентрации компонентов

$$|C_{к1} - C_{к2}| \le 0{,}06 \cdot \bar{C}_к, \qquad (5)$$

где $C_{к1}$ и $C_{к2}$ — измеренное значение массовой концентрации компонентов в пробе для контроля по первой и второй хроматограммам соответственно, мг/дм$^3$;

$\bar{C}_к$ — среднеарифметическое значение массовой концентрации $C_{к1}$ и $C_{к2}$, мг/дм$^3$.

Градуировочная характеристика признается стабильной, если выполняется условие

$$|C_к - C_{к0}| \le 0{,}08 \cdot C_{к0}, \quad (6)$$

где $C_к$ — фактическое значение массовой концентрации компонента в растворе, используемом для контроля стабильности градуировочной характеристики (см. 7.3.4), мг/дм$^3$;

$C_{к0}$ — фактическое значение массовой концентрации компонента в растворе, используемом для контроля стабильности градуировочной характеристики (см. 7.3.4), мг/дм$^3$.

Если условие (6) не выполняется, то процедуру контроля повторяют и при получении неудовлетворительного результата градуировку хроматографа проводят заново.

## 8 Проведение измерений

### 8.1 Подготовка проб к измерениям

8.1.1 Измерения проводят два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-1.

8.1.2 Пробу соков, нектаров или сокосодержащих напитков интенсивно перемешивают и в две мерные колбы вместимостью 25 см$^3$ ($V_2$) отбирают аликвоты объемом 5 см$^3$ ($V_3$) для проведения параллельных определений (см. 8.1.1).

Примечание — Аликвоты для параллельных определений должны быть отобраны одна за другой без задержки.

В каждую мерную колбу вместимостью 25 см$^3$ добавляют по 5 см$^3$ раствора щавелевокислого аммония, приготовленного по 7.2.3, 5 см$^3$ N,N-диметилформамида (см. 4.21). Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры, доводят до метки водой для анализа и тщательно перемешивают.

Нагревают в течение 10 мин на водяной бане при температуре от 90 °С до 100 °С и охлаждают до комнатной температуры.

Приблизительно 1,5 см$^3$ полученного раствора помещают в одноразовую пробирку (см. 4.16), центрифугируют при скорости вращения 5000 об/мин (фактор разделения не менее 1000) в течение 5 мин и подвергают хроматографическому анализу по 8.2.

Примечание — Допускается замена центрифугирования фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,20 или 0,45 мкм. Не допускается использование мембранных фильтров из полисульфона, так как они не устойчивы к ацетонитрилу, а также на основе политетрафторэтилена (*PTFE*) и его аналогов, поскольку эти материалы адсорбируют нарингин и гесперидин.

8.1.3 Концентрированные соки предварительно разбавляют. В стакане вместимостью 50 см$^3$ взвешивают от 4,5 до 5,5 г пробы концентрированного сока, добавляют от 5 до 10 см$^3$ воды для анализа и перемешивают. Полученный раствор количественно (многократно ополаскивая стенки стакана водой для анализа) переносят в мерную колбу вместимостью 50 см$^3$ ($V_4$), доводят водой для анализа до метки и тщательно перемешивают. Затем проводят все процедуры, предусмотренные 8.1.2.

### 8.2 Проведение хроматографического анализа

8.2.1 Подготовленную по 8.1 пробу дозируют в хроматограф и регистрируют две хроматограммы в тех же условиях, в которых были зарегистрированы хроматограммы градуировочных растворов (см. 7.5). На полученных хроматограммах идентифицируют пики определяемых компонентов, установив ширину окна идентификации 5 %, используя значения площадей пиков. Вычисляют значения массовой концентрации идентифицированных компонентов при помощи градуировочных характеристик, установленных по 7.6.

8.2.2 Проверяют выполнение условия (5). Если это условие выполняется, то в качестве значения массовой концентрации компонента в подготовленной по 8.1 пробе принимают среднеарифметическое полученных значений. Если условие не выполняется, находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод подготовленной пробы повторяют.

8.2.3 Если массовая концентрация гесперидина (нарингина) в подготовленной по 8.1.2 или 8.1.3 пробе превышает верхнюю границу диапазона градуировочной характеристики (100 мг/дм$^3$), то подготовленную пробу разбавляют водой для анализа. Коэффициент разбавления $Q$ вычисляют по формуле

$$Q = \frac{V_р}{V_а}, \quad (7)$$

где $V_р$ — объем разбавленной пробы, см$^3$;

$V_а$ — объем аликвоты подготовленной по 8.1 пробы, взятый для разбавления, см$^3$.

8.2.4 Примеры хроматограмм приведены в приложении А.

## 9 Обработка и оформление результатов измерений

9.1 Если подготовка пробы была проведена по 8.1.2, то массовую концентрацию гесперидина (нарингина) в пробе С, мг/дм$^3$, вычисляют по формуле

$$C = \frac{C_x \cdot V_2 \cdot Q}{V_3}, \quad (8)$$

где $C_x$ — массовая концентрация гесперидина (нарингина) (см. 8.2.2), мг/дм$^3$;

$V_2$ — вместимость мерной колбы, используемой при подготовке пробы по 8.1.2, см$^3$ (25 см$^3$);

$Q$ — коэффициент дополнительного разбавления подготовленной пробы по 8.2.3. Если подготовленная проба дополнительно не была разбавлена, то $Q = 1$;

$V_3$ — объем аликвоты исходной пробы, см$^3$ (5 см$^3$).

За результат измерений массовой концентрации гесперидина (нарингина) в пробе принимают среднеарифметическое значение $\overline{C}$, мг/дм$^3$, результатов двух параллельных измерений $C_1$ и $C_2$, мг/дм$^3$, при выполнении условия

$$100 \cdot \frac{|C_1 - C_2|}{\overline{C}} \le r_{отн}, \quad (9)$$

где $r_{отн}$ — предел повторяемости (см. таблицу 2), %.

Результат измерений округляют до целого числа.

9.2 Если подготовка пробы была проведена по 8.1.3, то массовую долю гесперидина (нарингина) в пробе $X$, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_x \cdot V_4 \cdot V_2 \cdot Q}{m \cdot V_3}, \quad (10)$$

где $V_4$ — объем подготовленной по 8.1.3 пробы, равный 50 см$^3$;

$m$ — масса пробы, г.

За результат измерений массовой доли гесперидина (нарингина) в пробе принимают среднеарифметическое значение $\overline{X}$, млн$^{-1}$, результатов двух параллельных измерений $X_1$ и $X_2$, млн$^{-1}$, при выполнении условия

$$100 \cdot \frac{|X_1 - X_2|}{\overline{X}} \le r_{отн}, \quad (11)$$

где $r_{отн}$ — предел повторяемости (см. таблицу 2), %.

Таблица 2 — Метрологические характеристики метода при P = 0,95

| Наименование показателя | Диапазон измерений | Границы относительной погрешности ± δ, % | Предел повторяемости (допускаемое относительное расхождение результатов двух параллельных измерений) $r_{отн}$, % | Предел воспроизводимости (допускаемое относительное расхождение результатов двух единичных измерений) $R_{отн}$, % |
|---|---|---|---|---|
| Гесперидин | | | | |
| Массовая концентрация, мг/дм$^3$ | От 100 до 1000 включ. | 13 | 8 | 18 |
| Массовая доля, млн$^{-1}$ | От 500 до 5000 включ. | | | |
| Нарингин | | | | |
| Массовая концентрация, мг/дм$^3$ | От 30 до 1000 включ. | 10 | 7 | 13 |
| Массовая доля, млн$^{-1}$ | От 150 до 5000 включ. | | | |

Результат измерения округляют до целого числа.

При невыполнении условий (9) или (11) получают еще два результата измерений в соответствии с разделом 8 и затем устанавливают результат измерений в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-6 (подраздел 5.2).

9.3 Результаты измерений регистрируют в протоколе испытаний согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025 с указанием настоящего стандарта. В протоколе испытаний результат измерений представляют в следующем виде (с указанием компонента)

$$(\overline{C} \pm \Delta_C),\ мг/дм^3\ (P = 0,95) \quad (12)$$

$$(\overline{X} \pm \Delta_X),\ млн^{-1}\ (P = 0,95), \quad (13)$$

где $\overline{C}(\overline{X})$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений (см. 9.1 и 9.2), мг/дм$^3$ (млн$^{-1}$);

$\Delta_C$ — значение границ абсолютной погрешности измерений массовой концентрации для доверительной вероятности $P = 0,95$, мг/дм$^3$, вычисляемое по формуле

$$\Delta_C = \frac{\delta \cdot \overline{C}}{100}, \quad (14)$$

где $\delta$ — значение границ относительной погрешности измерений массовой концентрации (массовой доли) для доверительной вероятности $P = 0,95$ (см. таблицу 2), %;

$\Delta_X$ — значение границ абсолютной погрешности измерений массовой доли для доверительной вероятности $P = 0,95$, млн$^{-1}$, вычисляемое по формуле

$$\Delta_X = \frac{\delta \cdot \overline{X}}{100}. \quad (15)$$

9.4 Результат измерений при содержании гесперидина (нарингина) менее нижней границы диапазона измерений представляют в протоколе в виде: «Менее $C_н$, мг/дм$^3$» или «менее $X_н$, млн$^{-1}$». Результат измерений при содержании гесперидина (нарингина) выше верхней границы диапазона измерений представляют в протоколе в виде: «Более $C_в$, мг/дм$^3$» или «более $X_в$, млн$^{-1}$», где $C_н$ ($X_н$) и $C_в$ ($X_в$) — нижняя и верхняя границы диапазона измерений массовой концентрации (массовой доли) гесперидина (нарингина) (см. раздел 1).

9.5 Результаты измерений, полученные в двух лабораториях, признают совместимыми при выполнении условий

$$2 \cdot \frac{|\overline{C}_1 - \overline{C}_2|}{\overline{C}_1 + \overline{C}_2} \le 0,01 \cdot CD_{0,95}, \quad (16)$$

где $\overline{C}_1$ и $\overline{C}_2$ — результаты измерений массовой концентрации компонента в первой и второй лабораториях соответственно, полученные по 9.1, мг/дм$^3$;

$CD_{0,95}$ — критическая разность, %,

или

$$2 \cdot \frac{|\overline{X}_1 - \overline{X}_2|}{\overline{X}_1 + \overline{X}_2} \le 0,01 \cdot CD_{0,95}, \quad (17)$$

где $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ — результаты измерений массовой доли компонента в первой и второй лабораториях соответственно, полученные по 9.2, млн$^{-1}$.

Значение критической разности вычисляют по формуле

$$CD_{0,95} = \sqrt{R_{отн}^2 - r_{отн}^2 \cdot (1 - \frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2})}, \quad (18)$$

где $R_{отн}$ — предел воспроизводимости (см. таблицу 2), %;

$r_{отн}$ — предел повторяемости (см. таблицу 2), %;

$n_1$ и $n_2$ — число параллельных измерений в первой и второй лабораториях соответственно.

Если условия (16) и (17) не выполняются, то лабораториям рекомендуется провести процедуры, предусмотренные ГОСТ 5725-6 (пункты 5.3.3 и 5.3.4).

## 10 Контроль качества результатов измерений

Контроль качества результатов измерений осуществляют, используя методы контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости и контроля стабильности среднеквадратического отклонения промежуточной прецизионности с применением контрольных карт Шухарта по ГОСТ ИСО 5725-6 (пункты 6.2.2, 6.2.3).

Периодичность контроля и процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируют в руководстве по качеству лаборатории в соответствии с ГОСТ ИСО/МЭК 17025 (пункт 4.2).

## 11 Требования безопасности

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

Требования электробезопасности при работе с приборами — по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с руководством по эксплуатации используемого оборудования.

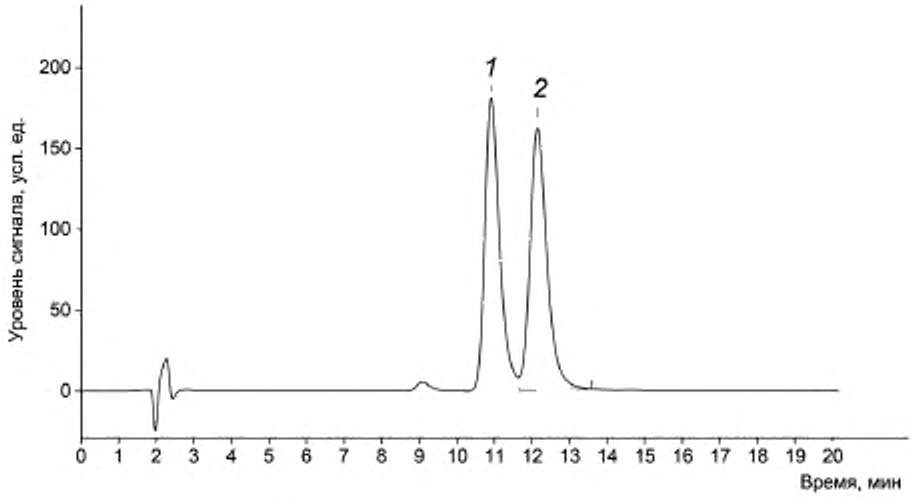
## 12 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное образование, опыт работы в химической лаборатории, изучившие руководство по эксплуатации жидкостного хроматографа и освоившие метод. Первое применение метода в лаборатории должно проводиться под руководством специалиста, владеющего теорией ВЭЖХ и имеющего практические навыки в этой области.

**Приложение А**
**(справочное)**

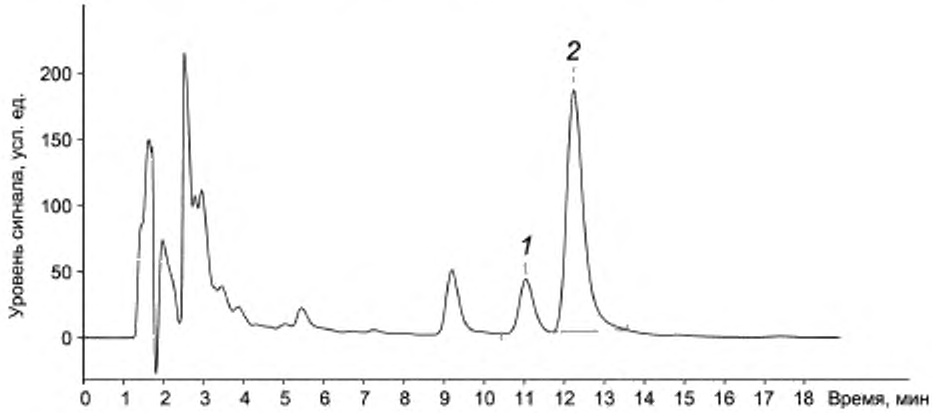
## Примеры хроматограмм

А.1 Примеры хроматограмм, полученных на колонке Alltima C18 (внутренний диаметр 2,1 мм, длина 120 мм, размер частиц 5 мкм), приведены на рисунках А.1, А.2.




*1* — пик нарингина; *2* — пик гесперидина

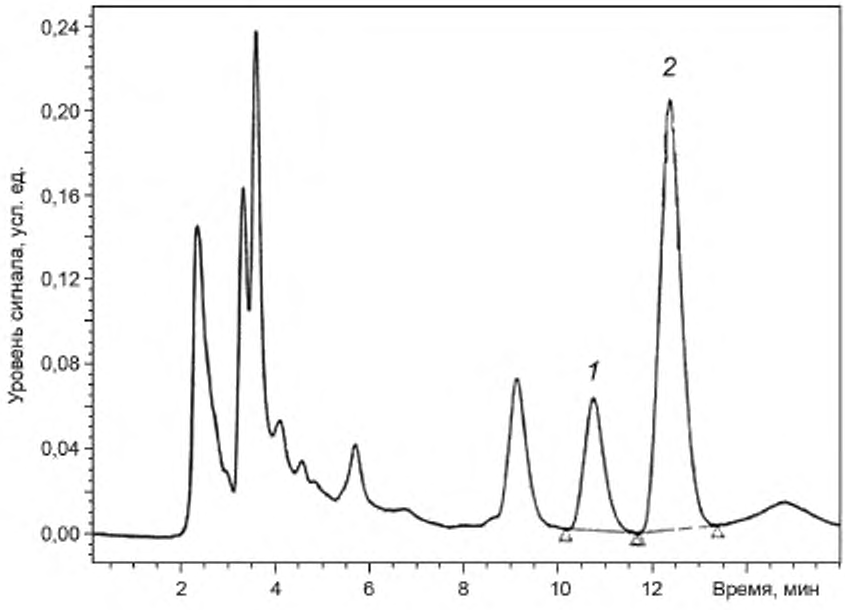
Рисунок А.1 — Хроматограмма градуировочного раствора № 2 (см. 7.3.5)




*1* — пик нарингина, *2* — пик гесперидина

Рисунок А.2 — Хроматограмма пробы соковой продукции — нектара из соков цитрусовых фруктов (апельсина, лимона, лайма), подготовленной по 8.1.2

А.2 Пример хроматограммы, подготовленной по 8.1.2 пробы соковой продукции, полученной на колонке Agilent ZORBAX SB-C18 (внутренний диаметр 4,6 мм, длина 250 мм, размер частиц 5 мкм), приведен на рисунке А.3.




*1* — пик нарингина, *2* — пик гесперидина

Рисунок А.3 — Хроматограмма подготовленной пробы сокосодержащего напитка из апельсинов и грейпфрутов

УДК 543.544.52:664.863:006.35 МКС 67.080.01

Ключевые слова: продукция соковая, гесперидин, нарингин, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, массовая концентрация, массовая доля

**БЗ 10—2018/30**

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

Сдано в набор 12.10.2018. Подписано в печать 25.10.2018. 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 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

**Поправка к ГОСТ 34461—2018 Продукция соковая. Определение содержания гесперидина и нарингина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

| В каком месте | Напечатано | Должно быть | | |
|---|---|---|---|---|
| Предисловие. Таблица согласования | — | Казахстан | KZ | Госстандарт Республики Казахстан |

(ИУС № 4 2020 г.)

gost.e-ecolog.ru