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 (*gost.e-ecolog.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

МКС 67.080.01

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;

θ — 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$^{-1}$);

Δ_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 δ — значение границ относительной погрешности измерений массовой концентрации (массовой доли) для доверительной вероятности $P = 0{,}95$ (см. таблицу 2), %;

Δ_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.

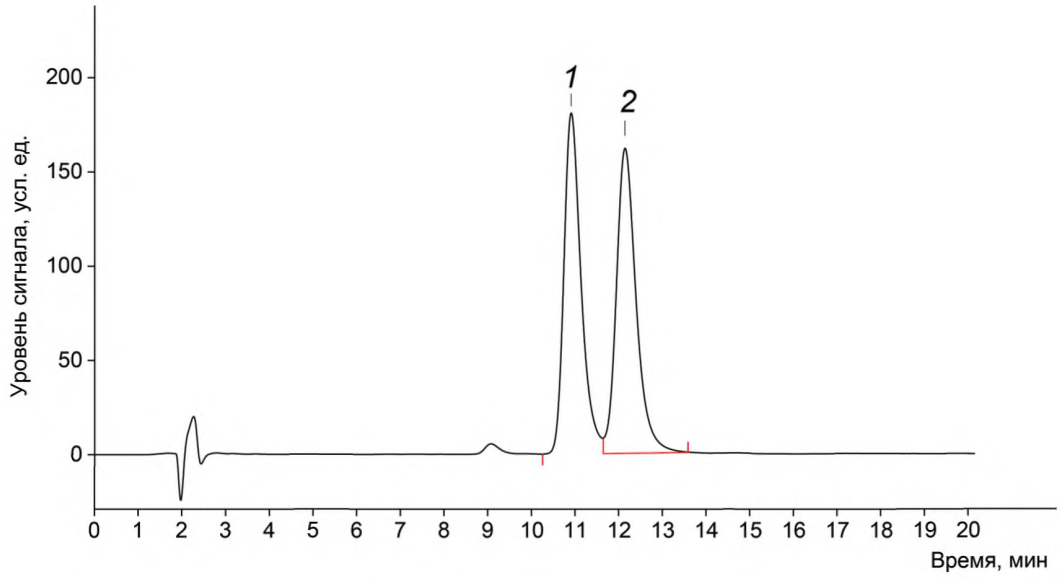
12 Требования к квалификации операторов

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)

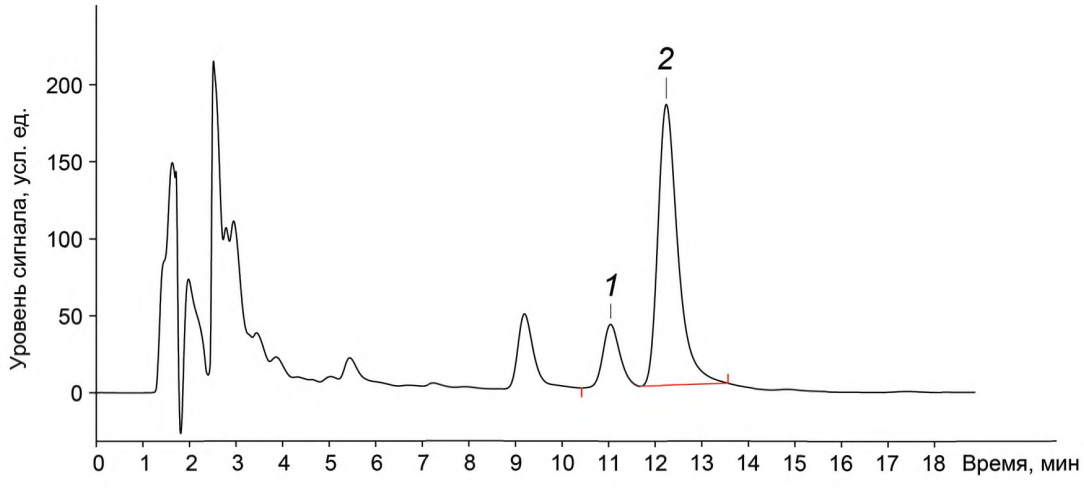
Примеры хроматограмм

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

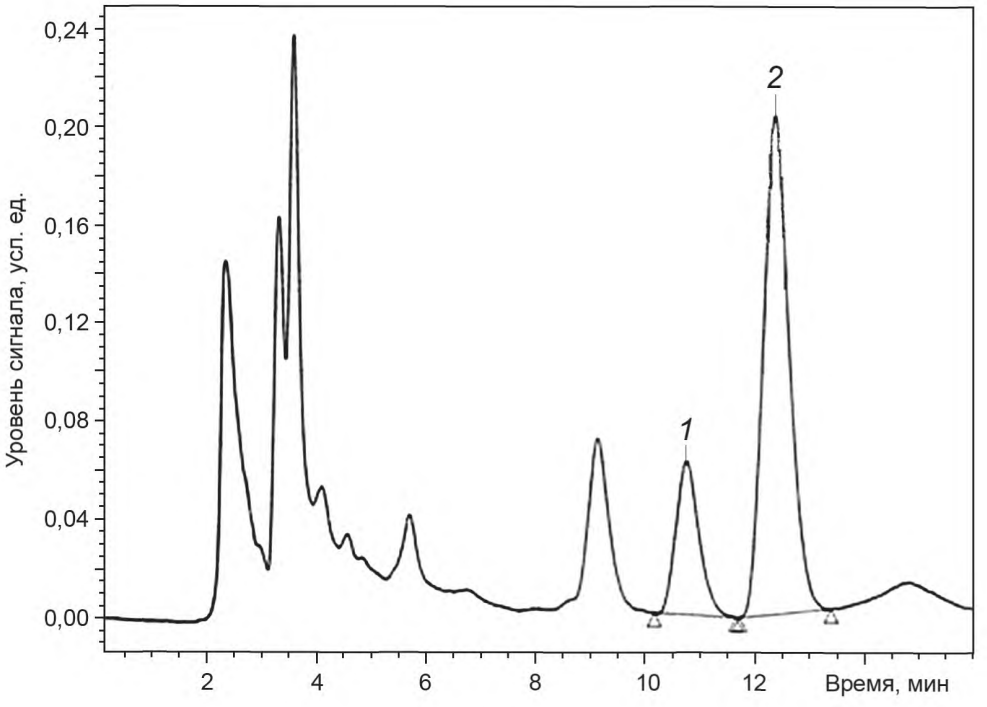
Рисунок А.1 — Хроматограмма градуировочного раствора № 2 (см. 7.3.5)



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

gost.e-ecolog.ru