

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
54742—
2011

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

**Определение нарингина и неогесперидина
в апельсиновом соке методом высокозэффективной
жидкостной хроматографии**

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2013

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения».

Сведения о стандарте

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

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

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

4 В настоящем стандарте учтены:

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

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

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет.

© Стандартинформ, 2013

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

Содержание

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение нарингина и неогесперидина в апельсиновом соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на соковую продукцию в части апельсинового сока и устанавливает метод определения флавоноидов нарингина и неогесперидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ) в диапазоне содержания от 5 до 50 мкг/см³.

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

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 18270—72 Кислота уксусная особой чистоты. Технические условия

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

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

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

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

3 Сущность метода

Метод основан на предварительном фильтровании анализируемой пробы для удаления нерастворимых частиц и последующем хроматографическом определении нарингина и неогесперидина на аналитической колонке, содержащей адсорбент — силикагель С₁₈. Детектирование нарингина и неогесперидина после выхода из аналитической колонки осуществляют спектрофотометрическим способом при длине волны 280 нм.

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

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

Для проведения определения на хроматографе ВЭЖХ используют следующие режимы:

- скорость потока 1,0 см³/мин;
- объем пробы 20 мкл (40 мкл в случае разбавления пробы перед определением);
- регистрация фракций спектрофотометрическим способом при длине волны 280 нм на детекторе с разрешением не хуже 0,05 ед. оптической плотности;
- термостатируемые условия хроматографического определения для обеспечения температурного интервала от 25 до 30° С.

4.2 Колонка аналитическая. Для хроматографического разделения используют аналитическую колонку, содержащую адсорбент C₁₈ с иммобилизованным кварцевым наполнителем с высокой степенью очистки и низким уровнем металлических примесей.

Новая аналитическая колонка должна иметь следующие характеристики:

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

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

где *t_r* — время удерживания пика, с;

W_h — ширина пика на половине высоты, с.

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

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

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

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

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

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

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

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

где *t_r* — время удерживания пика, с;

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

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

- колонка аналитическая¹⁾ C₁₈ с размером частиц 5 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 4,6 мм при скорости потока 1 см³/мин;

¹⁾ В качестве данной колонки может быть использована колонка модельного ряда Kromasil (Higgins Analytical, США, номер по каталогу изготовителя KS—1546—С185) или аналогичная. Указанное оборудование рекомендуется для применения. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что настоящий стандарт устанавливает требование об обязательном применении данного оборудования.

- колонка аналитическая¹⁾ C₁₈ с размером частиц 5 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 3 мм при скорости потока 0,5 см³/мин;

- колонка аналитическая²⁾ ODS-2 с размером частиц 5 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 4 мм при скорости потока 0,8—1,0 см³/мин.

Для хроматографического определения могут быть применены и другие колонки с адсорбентом C₁₈, но в этом случае необходимо добавлять уксусную кислоту в подвижную фазу для обеспечения требуемой симметрии пиков и эффективности хроматографического разделения.

4.3 Колонка предварительная. В качестве предварительной колонки может быть использована любая колонка, содержащая адсорбент C₁₈ с иммобилизованным высококачественным кварцевым наполнителем с низким уровнем металлических примесей.

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

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

4.6 Ацетонитрил, ч.д.а.

4.7 Деионизированная или бидистиллированная вода.

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

4.9 Диметилформамид, ч.д.а.

4.10 Диметилсульфоксид, ч.д.а.

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

4.12 Гесперидин, ч.д.а.

4.13 Неогесперидин, ч.д.а.

4.14 Нарингин, ч.д.а.

4.15 Колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100, 1000 и 2000 см³.

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

4.17 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336.

4.18 Пипетки градуированные 1—2—1, 1—2—2, 1—2—5 по ГОСТ 29227 вместимостью 1, 2 и 5 см³ или дозаторы пипеточные с аналогичным или изменяемым объемом доз с относительной погрешностью дозирования ±1 %.

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

5 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26313.

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

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

6 Подготовка к проведению определения

6.1 Приготовление подвижной фазы

В мерную колбу вместимостью 2000 см³ переносят 1—10 см³ ледяной уксусной кислоты (4.8) и деионизированной водой (4.7) доводят объем раствора до метки. Затем в отдельной мерной колбе вместимостью 2000 см³ смешивают 1620 см³ деионизированной воды или приготовленного раствора уксусной кислоты с 380 см³ ацетонитрила.

Срок хранения подвижной фазы в емкости вместимостью 2000 см³ из темно-окрашенного стекла при комнатной температуре — не более 2 мес.

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

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

В мерной колбе вместимостью 100 см³ точно взвешивают по 0,05 г каждого стандартного вещества. В колбу добавляют 10 см³ диметилформамида или диметилсульфоксида, перемешивают до полного растворения и доводят до метки с помощью подвижной фазы, подготовленной по 6.1.

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

6.3 Приготовление стандартного раствора Б из бензоата натрия и сорбата калия по 500 мкг/см³ каждого вещества в 1 г раствора

В мерной колбе вместимостью 100 см³ точно взвешивают по 0,05 г бензоата натрия и 0,05 г сорбата калия. Объем раствора в колбе доводят до метки подвижной фазой.

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

6.4 Приготовление рабочих стандартных растворов

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

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

6.5 Для проверки работы подвижной фазы и стабильности колонки готовят поверочный раствор. Для этого в мерной колбе на 100 см³ смешивают 10 см³ стандартного раствора А и 10 см³ стандартного раствора Б. Объем раствора в колбе доводят до метки подвижной фазой.

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

6.6 Подготовка проб к определению

6.6.1 10—20 см³ анализируемой пробы центрифицируют при 10000 г и температуре 25° С в течение 10 мин. Затем пробу фильтруют через мембранный фильтр размером 25 мм и размером диаметра пор 0,2 мкм.

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

7 Проведение определения

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

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

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

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

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

8 Обработка результатов определения

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

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

где RRT_x — относительное время удерживания компонента x пробы;

RT_x — время удерживания компонента x пробы;

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

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

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

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

где S_x — площадь пика компонента x ;

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

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

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

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

F — фактор разбавления пробы (6.6.1);

RF_x — ответный фактор для компонента x .

Приложение А
(справочное)Результаты межлабораторных испытаний по определению метрологических характеристик метода,
проведенных АОAC International в 2000 г. [1]

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

Таблица А.1

Сведения о межлабораторных испытаниях	Добавлено в апельсиновый сок				Внесено наименование		100 %-ный апельсиновый сок
	1 %-ный грейп-фрутовый сок	3 %-ный грейп-фрутовый сок	5 %-ный грейп-фрутовый сок	5 %-ный сок из кисличных яблок с добавлением к-Еагу	5 мкг/л	20 мкг/л	
Общее количество лабораторий	12	12	12	12	11	12	11
Добавленное количество (мкг/л) ^a	3,9	11,7	19,5	46,5	5,2	5,0	20,0
Общее среднее значение, мкг/л	3,43	10,24	16,87	44,76	7,21	5,20	17,57
Стандартное отклонение повторяемости, S_r	0,52	0,98	1,43	1,32	0,80	0,67	1,33
Стандартное отклонение воспроизведимости, S_R	1,10	1,92	3,04	5,07	1,40	1,19	3,54
Относительное стандартное отклонение повторяемости, RSD_r	15,23	9,55	8,40	2,95	11,04	12,94	7,57
Относительное стандартное отклонение воспроизведимости, RSD_R	1,94	18,73	18,00	11,34	19,39	22,85	20,12
Предел повторяемости, g	1,46	2,74	4,00	3,69	2,23	1,88	3,73
Предел воспроизводимости, R	3,07	5,37	8,50	14,21	3,92	3,33	9,90
Количество обнаруженный	12	12	12	12	11	12	4

Причина:

а — количества, установленные в соке или стандартном растворе;

б — количество лабораторий с достоверным определением компонентов с промежутком времени удерживания.

A.2. Результаты межлабораторных испытаний для неогестеридина приведены в таблице А.2.

Таблица А.2

	Добавлено в апельсиновый сок				Внесено неогестеридина		100 %-ный апельсино- вый сок
	1 %-ный грейп- фрутовый сок	3 %-ный грейп- фрутовый сок	5 %-ный грейп- фрутовый сок	5 %-ный сок из апельсинов сорта К-Елту	1,25 мг/кг	5 мг/кг	
Сведения о межлабораторных испытаниях							
Общее количество лабораторий	11	11	11	11	11	10	11
Добавленное количество (мкг/г) ^а	0,14	0,40	0,68	33,8	35,6	1,25	5,00
Общее среднее значение, мкг/г	—	—	—	31,71	35,45	—	4,85
Стандартное отклонение повторяемости, S_f	—	—	—	1,90	1,06	—	0,57
Стандартное отклонение воспроизводимости, S_R	—	—	—	3,50	3,71	—	1,27
Относительное стандартное отклонение повторяемости, RSD_f	—	—	—	6,00	3,00	—	11,74
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, RSD_R	—	—	—	11,03	10,45	—	26,17
Предел повторяемости, r	—	—	—	5,33	2,98	—	1,59
Предел воспроизводимости, R	—	—	—	9,78	10,37	—	3,55
Количество обнаружений ^б	0	1	3	11	11	10	11
Примечания:							
а — количество, установленные в соке или стандартном растворе;							
б — количество лабораторий с достоверным отклонением компонентов с правильным временем хранения.							

Библиография

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

УДК 664.863.001.4:006.354

ОКС 67.080.10

Н59

ОКСТУ 9109

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

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

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

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.