

## **СОКИ ЦИТРУСОВЫЕ**

**Метод определения массовой концентрации  
гесперидина и нарингина с помощью  
высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Издание официальное

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки плодов и овощей»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 582-ст

3 Стандарт гармонизирован с европейским стандартом ЕН 12148:1996 «Соки фруктовые и овощные. Определение гесперидина и нарингина в цитрусовых соках. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

© ИПК Издательство стандартов, 2000

© СТАНДАРТИНФОРМ, 2008

**Переиздание** (по состоянию на апрель 2008 г.)

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ****СОКИ ЦИТРУСОВЫЕ****Метод определения массовой концентрации гесперидина и нарингина  
с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Citrus juices. Method for determination of hesperidin and naringin mass concentration  
using high performance liquid chromatography

Дата введения 2001—01—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на цитрусовые соки и устанавливает метод определения массовой концентрации гесперидина и нарингина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Диапазон определения массовой концентрации гесперидина и нарингина — от 300 до 2000 мг/дм<sup>3</sup>.

**2 Нормативные ссылки<sup>1)</sup>**

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 61—75 Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

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

ГОСТ 20289—74 Диметилформамид. Технические условия

ГОСТ 24104—88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие 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 26671—85 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

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

Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 51431—99 Соки фруктовые и овощные. Метод определения относительной плотности

ИСО 3696—87\* Вода для лабораторного анализа. Технические условия и методы испытаний

**3 Сущность метода**

Метод основан на экстракции гесперидина и нарингина из пробы сока раствором диметилформамида при нагревании и количественном определении их массовых концентраций в экстракте с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением обращенно-фазовой колонки и спектрофотометрического детектора в ультрафиолетовой области спектра.

\* Действует до введения в действие ГОСТ Р, разработанного на основе стандарта ИСО.

Издание официальное

<sup>1)</sup> См. примечание ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» (с. 6).

#### 4 Средства измерений, лабораторное оборудование, реактивы и материалы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 20 г, 2-го класса точности.

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г, 2-го класса точности.

Жидкостный хроматограф, состоящий из:

- насоса высокого давления с верхним пределом давления не менее 25 МПа и диапазоном регулирования подачи растворителя от 0,1 до 5 см<sup>3</sup>/мин;

- петлевого устройства ввода пробы (инжектора) с рабочим объемом петли 0,020 см<sup>3</sup>;

- спектрофотометрического детектора с переменной длиной волны, позволяющего проводить измерение оптической плотности при длине волны 287 нм, или детектора с фиксированной длиной волны, позволяющего проводить измерения оптической плотности при длине волны 280 нм, снабженного проточной кварцевой кюветой вместимостью не более 0,01 см<sup>3</sup>, с относительной погрешностью измерения оптической плотности не более 2 %;

- регистрирующего устройства (самописца или интегратора), позволяющего проводить измерения при чувствительности 0,2 мВ/см, с погрешностью записи в рабочих условиях не более 0,5 %;

- колонки длиной 250 мм, внутренним диаметром 4 или 4,6 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом с привитыми октадецильными группами размером частиц 5 мкм.

Микрошприц вместимостью, обеспечивающей полное заполнение петли инжектора.

Баня водяная, пригодная для поддержания температуры (90±2) °С.

Колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 50, 100 и 1000 см<sup>3</sup>.

Цилиндры по ГОСТ 1770 вместимостью 250 и 1000 см<sup>3</sup>.

Фильтры мембранные размером пор не более 0,5 мкм.

Пипетка по ГОСТ 29227 типа 2 исполнения 1, 1-го класса точности вместимостью 2 и 10 см<sup>3</sup>.

Аммоний щавелевокислый 1-водный (оксалат аммония) по ГОСТ 5712, х.ч.

Ацетонитрил для жидкостной хроматографии [1], х.ч.

Диметилформамид по ГОСТ 20289, х.ч.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, х.ч.

Вода для лабораторного анализа по ИСО 3696 категории 1.

Нарингин (нарингенин-7-неогеспериозид).

Гесперидин (гесперидин-7-рутинозид).

Допускается использование других средств измерений, лабораторного оборудования и реактивов, по метрологическим и техническим характеристикам не уступающих перечисленным выше.

#### 5 Отбор и подготовка проб

5.1 Отбор проб — по ГОСТ 26313.

5.2 Подготовка проб к испытаниям — по ГОСТ 26671.

Концентрированные продукты разводят водой до заданного значения относительной плотности в соответствии с нормативным или техническим документом на конкретный вид продукта. Относительную плотность разбавленной пробы определяют по ГОСТ Р 51431 и найденное значение указывают в протоколе испытаний.

#### 6 Подготовка к проведению испытаний

Для приготовления растворов, используемых при проведении испытания, и подвижной фазы для ВЭЖХ используют только воду для лабораторного анализа категории 1 по ИСО 3696.

##### 6.1 Приготовление стандартных растворов гесперидина и нарингина

Навески гесперидина и нарингина массой 120 мг каждая переносят в мерные колбы вместимостью 100 см<sup>3</sup>. В колбы вносят по 20 см<sup>3</sup> диметилформамида. Содержимое колб перемешивают до полного растворения кристаллов гесперидина и нарингина, затем объем содержимого в колбах доводят до отметки раствором уксусной кислоты концентрации  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,01$  моль/дм<sup>3</sup>, содержимое колб тщательно перемешивают. Из полученных основных растворов гесперидина и нарингина массовой концентрации 1200 мг/дм<sup>3</sup> готовят рабочие растворы гесперидина и нарингина массовой концентрации 120, 60, 30 и 15 мг/дм<sup>3</sup> точным разведением основных растворов в соответствующее количество раз смесью раствора уксусной кислоты концентрации  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,01$  моль/дм<sup>3</sup> и диметилформамида (8:2 по объему). Срок годности основных и рабочих растворов гесперидина и нарингина — 30 сут при хранении при температуре около 4 °С.

##### 6.2 Приготовление раствора оксалата аммония концентрации $c[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}] = 0,025$ моль/дм<sup>3</sup>

Навеску оксалата аммония массой 3,55 г переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>, растворяют в 100 — 200 см<sup>3</sup> воды, объем содержимого в колбе доводят водой до отметки.

### 6.3 Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Подвижную фазу для ВЭЖХ готовят смешиванием 200 см<sup>3</sup> ацетонитрила, 800 см<sup>3</sup> воды и 0,5 см<sup>3</sup> уксусной кислоты.

## 7 Проведение испытаний

### 7.1 Экстракция гесперидина и нарингина из пробы сока

Проводят два параллельных определения.

В мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> пипеткой вносят 10 см<sup>3</sup> исследуемой пробы, 10 см<sup>3</sup> раствора оксалата аммония концентрации 0,025 моль/дм<sup>3</sup> и 10 см<sup>3</sup> диметилформамида. Объем содержимого в колбе доводят водой до отметки, содержимое колбы тщательно перемешивают. После этого колбу с раствором выдерживают на водяной бане при температуре 90 °С в течение 10 мин, затем колбу с раствором охлаждают до комнатной температуры и содержимое колбы фильтруют через мембранный фильтр. Фильтрат используют для хроматографического анализа.

### 7.2 Хроматографический анализ

Хроматографический анализ рабочих стандартных растворов гесперидина и нарингина и экстрактов из пробы, приготовленных по 7.1, проводят при следующих условиях:

Состав подвижной фазы	— по 6.4;
Скорость потока подвижной фазы	— 1,0 см <sup>3</sup> /мин;
Длина волны детектора	— 287 нм для детектора с переменной длиной волны; 280 нм для детектора с фиксированной длиной волны;
Чувствительность детектора	— 0,05 — 0,2 единиц оптической плотности на полную шкалу;
Объем анализируемого раствора	— полное заполнение петли инжектора.

Анализ рабочих стандартных растворов проводят непосредственно перед анализом каждой серии экстрактов.

Регистрируют площади пиков и время удерживания гесперидина и нарингина.

Если площадь пика анализируемого вещества в экстракте из пробы превышает площадь пика этого вещества в рабочем стандартном растворе наибольшей концентрации, экстракт из пробы разводят водой, используя пипетку и мерную колбу подходящей вместимости, и проводят его повторный хроматографический анализ.

Из-за ограниченной стабильности экстрактов продолжительность проведения испытания не должна превышать 24 ч.

## 8 Обработка и оформление результатов

Обработку результатов испытания проводят по методу внешнего стандарта, исходя из линейной зависимости площади пика от концентрации гесперидина и нарингина.

Массовую концентрацию гесперидина или нарингина  $x$ , мг/дм<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$x = \frac{S \cdot V_1}{V_2 \cdot k}, \quad (1)$$

где  $S$  — площадь пика гесперидина или нарингина при анализе экстракта из пробы, ед. площ.;

$V_1$  — объем, до которого доведена проба при приготовлении экстракта, см<sup>3</sup>;

$V_2$  — объем пробы, взятый для приготовления экстракта, см<sup>3</sup>;

$k$  — градуировочный коэффициент соответственно для нарингина или гесперидина, ед. площ. × дм<sup>3</sup>/мг, рассчитываемый по формуле

$$k = \frac{S_1}{c}, \quad (2)$$

где  $S_1$  — площадь пика гесперидина или нарингина при анализе рабочего стандартного раствора, ед. площ.;

$c$  — концентрация гесперидина или нарингина в рабочем стандартном растворе, мг/дм<sup>3</sup>.

**Примечание** — При необходимости определения нарингина и гесперидина в навеске массовую долю этих веществ в продукте  $x_1$ , мг/кг, вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{S \cdot V_1}{m \cdot k}, \quad (3)$$

где  $m$  — масса навески, г.

Вычисления проводят до первого десятичного знака.

Относительное расхождение между результатами двух определений, выполненных одним оператором при анализе одной и той же пробы, с использованием одних и тех же средств измерений и реактивов, в течение возможно минимального интервала времени, не должно превышать норматива оперативного контроля сходимости 6 % ( $P = 0,95$ ). При соблюдении этого условия за окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, округленное до целого значения.

Относительное расхождение между результатами двух определений, выполненных в двух лабораториях при анализе одной и той же пробы, не должно превышать норматива оперативного контроля воспроизводимости, 16 % ( $P = 0,95$ ).

Пределы относительной погрешности определения массовой концентрации гесперидина и нарингина при соблюдении условий, регламентируемых настоящим стандартом, не превышают  $\pm 11$  % ( $P = 0,95$ ).

В протоколе испытаний указывают:

- информацию, необходимую для идентификации исследуемого продукта (вид продукта, происхождение, шифр);
- ссылку на настоящий стандарт;
- дату и способ отбора проб (по возможности);
- дату получения пробы для испытаний;
- дату проведения испытаний;
- результат испытаний с указанием погрешности и единицы измерений;
- соблюдение норматива контроля сходимости результатов;
- особенности проведения испытаний (разведение концентрированной пробы, относительную плотность разведенной пробы и пр.);
- отклонения условий проведения испытаний от описанных в стандарте, которые могли повлиять на результат.

ПРИЛОЖЕНИЕ А  
(справочное)**Библиография**

- [1] ТУ 6-09-06-1092—83 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии

---

УДК 664.863.001.4:006.354

ОКС 67.160.20

Н59

ОКСТУ 9109

Ключевые слова: цитрусовые соки, гесперидин, нарингин, массовая концентрация, метод определения, высокоэффективная жидкостная хроматография

---

## ПРИМЕЧАНИЕ ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

Указанный в разделе 2 «Нормативные ссылки» к ГОСТ Р 51427—99:  
ГОСТ 24104—88 заменен на ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

Редактор *Р.Г. Говердовская*  
Технический редактор *Н.С. Гришанова*  
Корректор *А.С. Черноусова*  
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Подписано в печать 27.05.2008. Формат 60х84<sup>1</sup>/8. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 0,93.  
Уч.-изд. л. 0,67. Тираж 104 экз. Зак. 616.

---

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.

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