

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**СОК ЯБЛОЧНЫЙ,
СОК ЯБЛОЧНЫЙ КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ
И НАПИТКИ, СОДЕРЖАЩИЕ
ЯБЛОЧНЫЙ СОК**

**Метод определения содержания патулина 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. № 590-ст

3 Стандарт содержит аутентичный текст международного стандарта ИСО 8128-1—93 «Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок. Определение содержания патулина. Часть 1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии», кроме приложения «Библиография»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОК ЯБЛОЧНЫЙ, СОК ЯБЛОЧНЫЙ КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ И НАПИТКИ,
СОДЕРЖАЩИЕ ЯБЛОЧНЫЙ СОК

Метод определения содержания патулина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing
apple juice. Method for determination of patulin content using
high performance liquid chromatography

Дата введения 2001—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания патулина в яблочном соке, концентрированных яблочных соках и напитках, содержащих яблочный сок, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Предел обнаружения патулина настоящим методом составляет 10 мкг/дм³ при условии, что взятый для анализа объем пробы готового к употреблению сока составляет 5 см³.

2 Сущность метода

Метод основан на экстракции патулина из исследуемой пробы этилацетатом, очистке экстракта перераспределением в водный раствор карбоната натрия и количественном и качественном анализе экстракта с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием спектрофотометрического детектора в ультрафиолетовой области.

3 Реактивы

Используют реактивы аналитической чистоты и воду квалификации «для ВЭЖХ».

3.1 Растворитель: этилацетат.

3.2 Подвижная фаза — раствор ацетонитрила в воде объемной концентрации 10 %.

3.3 Экстрагирующий раствор — водный раствор безводного карбоната натрия концентрации 14 г/дм³.

3.4 Ацетатный буфер, рН 4.

Смешивают 16,4 см³ уксусной кислоты [$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,2$ моль/дм³] с 3,6 см³ раствора ацетата натрия [$c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 0,2$ моль/дм³].

3.5 Уксусная кислота, ледяная.

3.6 Стандартный раствор патулина (C₇H₆O₄).

3.6.1 Приготовление стандартного раствора

Навеску патулина массой 10,0 мг, взятую с точностью до 0,1 мг, растворяют в мерной колбе с одной отметкой вместимостью 100 см³ в ацетатном буфере (3.4). Объем содержимого в колбе доводят до метки ацетатным буфером.

Пипеткой переносят 10,0 см³ приготовленного раствора в другую мерную колбу с одной отметкой вместимостью 100 см³, объем содержимого в колбе доводят до метки ацетатным буфером. Массовая концентрация патулина в приготовленном стандартном растворе составляет около 10 мкг/см³.

Измеряют оптическую плотность стандартного раствора при длине волны 276 нм на подходящем спектрофотометре с использованием кварцевых кювет рабочей длиной 10 мм.

3.6.2 Расчет концентрации стандартного раствора патулина

Концентрацию стандартного раствора патулина (3.6.1) $\rho_{p.s}$, мкг/см³, вычисляют по формуле

$$\rho_{p.s} = \frac{A M 1000 C}{A_{276}} \quad (1)$$

где A — оптическая плотность стандартного раствора патулина;

A_{276} — молярный показатель поглощения раствора патулина при длине волны 276 нм, дм³ моль⁻¹ см⁻¹ ($A_{276} = 14600$);

M — молярная масса патулина, г/моль;

C — постоянная прибора (обычно $C = 1$).

4 Приборы и лабораторное оборудование

Перед использованием лабораторное оборудование промывают раствором гипохлорита натрия концентрации 10 г/дм³.

Обычное лабораторное оборудование, в частности следующее:

4.1 Жидкостный хроматограф, снабженный спектрофотометрическим детектором в ультрафиолетовой области (пригодным для работы при длине волны 276 нм) и самописцем или интегратором.

4.2 Обращенно-фазовая колонка ODS¹⁾ или другая аналогичная колонка со следующими параметрами:

- эффективность не менее 35000 теоретических тарелок на метр;
- длина 250 мм;
- внутренний диаметр 4,6 мм;
- неподвижная фаза размером частиц 5 мкм.

5 Отбор проб

Проба, поступающая в лабораторию, должна быть представительной и без следов порчи или изменения свойств продукта при транспортировании и хранении.

6 Проведение испытаний

6.1 Приготовление испытуемого раствора

При испытаниях концентрированных яблочных соков их разводят водой 1:5 по объему. Дальнейшую процедуру проводят для всех продуктов одинаково, как описано ниже.

6.1.1 Пробу объемом 5,0 см³ экстрагируют порцией этилацетата объемом 5,0 см³ (3.1) в течение не менее 1 мин. Экстракцию повторяют еще два раза новыми порциями этилацетата объемом по 5,0 см³. Этилацетатные фазы объединяют и экстрагируют раствором карбоната натрия (3.3) объемом 2,0 см³.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Экстракцию раствором карбоната натрия проводят как можно быстрее, например в течение 1—2 мин, из-за нестабильности патулина в щелочной среде.

6.1.2 Карбонатную фазу (6.1.1) экстрагируют свежей порцией этилацетата объемом 5,0 см³, экстракт объединяют с предыдущими порциями. Карбонатную фазу отбрасывают. К экстракту добавляют 5 капель уксусной кислоты (3.5), смесь перемешивают и упаривают на ротационном испарителе до объема 1—2 см³.

6.1.3 Полученный таким образом раствор количественно переносят во флакон вместимостью около 5 см³ с помощью нескольких порций этилацетата объемом около 1 см³ каждая. Раствор упаривают досуха в токе азота при температуре 40 °С. Остаток растворяют в 0,5 см³ подвижной фазы (3.2) или ацетатного буфера (3.4).

6.2 Построение градуировочного графика

Порции стандартного раствора патулина (3.6.1) объемом 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 и 7,5 см³ переносят пипеткой в пять мерных колб с одной отметкой вместимостью 10 см³, объем содержимого в колбах доводят до метки ацетатным буфером (3.4); получают градуировочные растворы.

Устанавливают скорость потока подвижной фазы через колонку жидкостного хроматографа около 1 см³/мин. Чувствительность детектора хроматографа устанавливают таким образом, чтобы оптической плотности 0,01 соответствовал сигнал величиной на полную шкалу регистрирующего устройства.

¹⁾ ODS — октадецилсилан.

В хроматограф (4.1) вводят от 0,010 до 0,030 см³ каждого градуировочного раствора.

Градуировочный график строят, откладывая по оси абсцисс концентрацию патулина в микрограммах на кубический сантиметр, по оси ординат — соответствующие величины высоты или площади пиков.

6.3 Проведение определения

В хроматограф вводят от 0,010 см³ до 0,030 см³ испытуемого раствора (6.1.3) при тех же условиях, что и при построении градуировочного графика.

Идентификацию пика патулина в испытуемом растворе проводят сравнением с пиками патулина в градуировочных растворах. Следует отличать пик патулина от пика оксиметилфурфурола (ОМФ).

7 Обработка результатов

Концентрацию патулина в испытуемом растворе определяют непосредственно по градуировочному графику (6.2). Содержание патулина в продукте ρ_p , мкг/дм³, вычисляют по формуле

$$\rho_p = \frac{\rho_{p,r} V_1}{V_2} \cdot 10^3, \quad (2)$$

где $\rho_{p,r}$ — концентрация патулина в испытуемом растворе, определенная по градуировочному графику, мкг/см³.

V_1 — объем, до которого сконцентрирован этилацетатный экстракт, см³;

V_2 — объем пробы продукта, взятый для экстракции, см³.

8 Точность метода

8.1 Сходимость результатов

$$r = 41,9 \text{ мкг/дм}^3; s_r = 14,9 \text{ мкг/дм}^3,$$

где r — предел сходимости;

s_r — среднеквадратическое отклонение сходимости.

8.2 Воспроизводимость результатов

$$R = 47,5 \text{ мкг/дм}^3; S_R = 22,6 \text{ мкг/дм}^3,$$

где R — предел воспроизводимости;

S_R — среднеквадратическое отклонение воспроизводимости.

9 Протокол испытаний

В протоколе испытаний указывают:

- метод испытаний;
- результат испытаний;
- окончательный результат с оценкой сходимости, если была проверена сходимость результатов.

Также следует отметить особенности проведения испытаний, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как незначительные, с побочными обстоятельствами, способными повлиять на результат испытаний.

Протокол испытаний должен содержать информацию, необходимую для полной идентификации образца.

Ключевые слова: яблочный сок, концентрированный яблочный сок, напитки, содержащие яблочный сок, патулин, определение содержания, высокоэффективная жидкостная хроматография
