

СОГЛАСОВАНО

Зам.Председателя
Государственного комитета
по стандартизации
Республики Беларусь

_____ С.А. Ивлев.

« 28 » июля _____ 2010 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
Главный государственный
санитарный врач Республики
Беларусь

_____ В.И. Качан

« 03 » августа _____ 2010 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОЛИГОСАХАРИДОВ В СОЕВЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

ВРЕМЕННАЯ МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

СРОК ДЕЙСТВИЯ ДО 31.12.2013

РАЗРАБОТАНО

Директор
ГУ «Республиканский научно-
практический центр гигиены»

_____ В.П. Филонов

« 26 » июля _____ 2010 г.

Минск 2010

СОДЕРЖАНИЕ

- 1 Область применения
 - 2 Показатели прецизионности методики
 - 3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы
 - 4 Метод измерения
 - 5 Требования безопасности
 - 6 Требования к квалификации оператора
 - 7 Условия выполнения измерений
 - 8 Подготовка к выполнению измерений
 - 9 Выполнение измерений
 - 10 Обработка результатов измерений
 - 11 Оформление результатов испытаний
 - 12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости
 - 13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности
 - 14 Проверка стабильности результатов измерений
- Приложение А Нормативные ссылки

1 Область применения

Методика предназначена для определения массовой доли олигосахаридов (раффинозы, стахиозы) (%) в соевых продуктах .

Олигосахариды – это полисахариды 1 порядка, молекулы которых содержат от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. Наиболее известными олигосахаридами сои являются трисахарид раффиноза и тетрасахарид стахиоза.

Раффиноза относится к классу олигосахаридов и подклассу трисахаридов, ее молекула состоит из остатков α -галактозы, α -глюкозы и β -фруктозы. Химическая формула раффинозы $C_{18}H_{32}O_{16}$ (пентагидрат) α -D-Gl_{cp}-(1-6)- α -D-Gl_{cp}-(1-2)- β -D-Fru_f. Раффиноза представляет собой белое кристаллическое вещество, не имеющее запаха, хорошо растворимое в воде, сладкое на вкус.

Стахиоза относится к классу олигосахаридов и подклассу тетрасахаридов, ее молекула состоит из двух остатков α -галактозы, остатка α -глюкозы и остатка β -фруктозы. Химическая формула стахиозы $C_{24}H_{42}O_{21}$ (гидрат) α -D-Gl_{cp}-(1-6)- α -D-Gl_{cp}-(1-6)- α -D-Gl_{cp}-(1-2)- β -D-Fru_f. Раффиноза представляет собой белое кристаллическое вещество, не имеющее запаха, хорошо растворимое в воде, сладкое на вкус.

Метод определения основан на водной экстракции олигосахаридов с применением ультразвуковой бани и последующим анализом экстракта с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Диапазон определяемых концентраций:

Раффиноза - (0,5 – 5,0) %;

Стахиоза - (0,5 – 5,0) %;

Нижний предел измерения методики для раффинозы и стахиозы (LOQ) составляет 0,5 %.

2 Показатели прецизионности методики

Относительные значения показателей прецизионности (повторяемости и промежуточной прецизионности) при доверительной вероятности $P=0,95$ МВИ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности МВИ при доверительной вероятности $P=0,95$

Диапазон измерений, %	Показатель повторяемости s_r %	Показатель промежуточной прецизионности $s_{I(TO)}$ %
Раффиноза - 0,5 – 5,0	5	7
Стахиоза – 0,5 – 5,0	6	8

Относительные значения пределов повторяемости и промежуточной прецизионности при доверительной вероятности $P=0,95$ указаны в таблице 2.

Таблица 2 – Относительные значения пределов повторяемости и промежуточной прецизионности при доверительной вероятности $P=0,95$

Диапазон измерений %	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений), % г	Предел промежуточной прецизионности (для двух единичных измерений), % $\Gamma_{(TO)}$
Раффиноза - 0,5 – 5,0	14	19
Стахиоза – 0,5 – 5,0	16	22

Смещение метода измерений является не значимым при уровне значимости $\alpha=5\%$.

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Жидкостной хроматограф с рефрактометрическим детектором		Agilent 1200
Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г		ГОСТ 24104-2001
Колбы мерные	2-50-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-100-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-1000-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
Пипетки градуированные	1-1-2-1	ГОСТ 29227-91
	1-1-2-5	ГОСТ 29227-91
Цилиндры мерные	100 см ³	ГОСТ 1770-74
	1000 см ³	ГОСТ 1770-74
Колбы плоскодонные	100 см ³	ГОСТ 25336-82
	200 см ³	

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Колонка хроматографическая ZORBAX Carbohydrate

размером 4,6 мм × 150мм, зернение 5 мкм

Мембранный фильтр Millipore с размером пор 0,45 мкм

Фильтр «синяя лента»	ГОСТ 12026-76
Ультразвуковая баня	Sonogex
Термометр ТЛ-2, обеспечивающий измерение температуры (0 – 100) °С	

3.3 Реактивы и материалы

Раффиноза пентагидрат, содержание основного вещества более 98 %	Фирма Sigma-Aldrich, кат № R1250
Стахиоза гидрат, содержание основного вещества более 98 %	Фирма Sigma-Aldrich, кат № 851787
Спирт этиловый	ГОСТ 18300-87
Ацетонитрил для ВЭЖХ	фирма «Sigma-Aldrich»
Калий железосинеродистый, ч.д.а	ГОСТ 4207-75
Цинк уксуснокислый, ч.д.а	ГОСТ 5823-78
Уксусная кислота, х.ч.	ГОСТ 61-75
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства по точности, не уступающие рекомендуемым, а также реактивы не ниже указанной чистоты.

4 Метод измерения

Метод основан на экстракции раффинозы и стахиозы водой с применением ультразвуковой бани, очистке полученного экстракта с помощью реактивов Карреза I и II и определении ее содержания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с рефрактометрическим детектором.

5 Требования безопасности

При выполнении работ персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности (ГОСТ 12.2.003)
- пожарной безопасности (ГОСТ 12.1.004)
- техники безопасности при работе в химической лаборатории (ППБ 1.04)
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении измерений.

6 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее образование, изучившие настоящую методику, прошедшие подготовку для работы на хроматографе.

7 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха при приготовлении растворов, в том числе градуировочных (20 ± 2) °С;
- температура воздуха при выполнении измерений (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление (630 – 800) мм рт. ст.;
- влажность воздуха (65 ± 15) % при температуре 25 °С;
- напряжение питающей сети (230 ± 10) В;
- частота переменного тока ($50 \pm 0,4$) Гц

Помещения для проведения измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

8 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, установление градуировочной характеристики, отбор и подготовка проб к анализу.

8.1 Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для блока насосов и детектора. Проводят стабилизацию работы хроматографа на рабочих режимах в течение 40 - 60 мин.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление реактивов Карреза

Реактив Карреза I: взвешивают ($106,000 \pm 0,001$) г калия железосинеродистого растворяют в 200-300 см³ дистиллированной воды, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в склянке из темного стекла не более месяца;

Реактив Карреза II: взвешивают ($220,000 \pm 0,001$) г цинка уксуснокислого, растворяют в 200-300 см³ дистиллированной воды, добавляют 30 см³ ледяной уксусной кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в склянке из темного стекла не более месяца.

8.2.2 Приготовление смеси этанол - вода (1:1)

С помощью цилиндра отмеряют 50 см³ этанола, помещают в коническую колбу вместимостью 200 см³, прибавляют 50 см³ дистиллированной воды, перемешивают. Смесь хранится в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре в течение 12 мес.

8.2.3 Приготовление подвижной фазы ацетонитрил - вода (80 : 20)

С помощью цилиндра отмеряют 800 см³ ацетонитрила, добавляют 200 см³ дистиллированной воды, перемешивают и фильтруют через фильтр миллипоре. Раствор хранится в склянке из темного стекла при комнатной температуре в течение 12 мес.

8.2.4 Приготовление градуировочных растворов

8.2.4.1 Приготовление основного градуировочного растворов раффинозы и стахиозы концентрацией 10 мг/см³

Взвешивают по (1,000 ± 0,001) г раффинозы и стахиозы и растворяют дистиллированной водой в мерной колбе объемом 100 см³. Раствор готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежит.

8.2.4.2 Приготовление градуировочных растворов раффинозы и стахиозы

Градуировочные растворы раффинозы и стахиозы концентрацией 0,1 мг/см³, 0,2 мг/см³, 0,5 мг/см³, 0,8 мг/см³, 1,0 мг/см³ соответственно готовят по схеме, представленной в таблице 3. Аликвотные части основного градуировочного раствора раффинозы и стахиозы переносят в мерные колбы соответствующего объема и доводят дистиллированной водой до метки.

Таблица 3 – Схема приготовления градуировочных растворов раффинозы и стахиозы

№ градуировочного раствора	Концентрация раффинозы и стахиозы в градуировочном растворе, мг/см ³	Аликвотная часть основного стандартного раствора раффинозы и стахиозы, см ³	Объем мерной колбы, см ³
1	0,1	1,0	100
2	0,2	2,0	100
3	0,5	5,0	100
4	0,8	4,0	50
5	1,0	5,0	50

Растворы готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежат.

8.3 Установление градуировочной характеристики

Полученные по п. 8.2.4.2 растворы хроматографируют, начиная с самой низкой концентрации.

Условия хроматографирования:

Объем вводимой пробы	20 мкл
Скорость подачи подвижной фазы	1,0 см ³ /мин
Температура колонки	35°С
Температура аналитической ячейки детектора	35°С
Ширина пика	>0,2 мин
Время очистки ячейки перед анализом	10 мин

Полярность положительная

Каждый градуировочный раствор хроматографируют не менее 2-х раз, принимая за результат измерения среднее арифметическое параллельных измерений.

8.4 Построение градуировочных графиков раффинозы и стахиозы

Для построения градуировочных графиков устанавливают зависимость площади пиков от соответствующей концентрации раффинозы и стахиозы в градуировочном растворе. По полученным данным рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = aX + b$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения

$$Y = aX + b \quad (1)$$

где

- Y - площадь пика раффинозы/стахиозы (погм. ед.);
- X - концентрация раффинозы/стахиозы в градуировочном растворе (мг/см³);
- a и b - коэффициенты регрессии.

8.5 Контроль градуировочных графиков

Контроль градуировочного графика осуществляют каждый раз перед началом измерений по одной точке в рабочем диапазоне каждого градуировочного графика, исключая первую и последнюю. Расхождение между измеренной концентрацией раффинозы/стахиозы в выбранном градуировочном растворе и его фактической концентрацией, выраженное в процентах, не должно превышать норматива контроля для раффинозы - $K_{гр} = 14 \%$; для стахиозы – $K = 15 \%$.

В противном случае необходимо провести построение нового градуировочного графика не менее чем по 5 точкам.

8.6 Подготовка анализируемых образцов

Отбор проб осуществляется согласно СТБ 1036.

Усредненную пробу образца (500 – 1000) г термостатируют при температуре $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

8.7 Проведение анализа

Испытуемый образец измельчают с помощью гомогенизатора и тщательно перемешивают. Взвешивают навеску массой $(2,000 \pm 0,001)$ г и помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³. Приливают 20 см³ дистиллированной воды и помещают в ультразвуковую баню на 15 минут при температуре $t = (50 - 60)^\circ\text{C}$. Охлаждают до комнатной температуры, добавляют 0,25 см³ реактива Карреза I, встряхивают в течение 1 мин, затем добавляют 0,25 см³ реактива Карреза II,

встряхивают в течение 1 мин. После этого приливают 5 см³ ацетонитрила и доводят объем до метки смесью этанол-вода (1:1). Колбу закрывают пробкой и оставляют стоять в течение 1,5 часа. Затем смесь фильтруют через бумажный фильтр. Отбирают 1 см³ полученного фильтрата и фильтруют через мембранный фильтр миллипоре с размером пор 0,45 мкм.

9 Выполнение измерений

Анализ полученного по п. 8.7 фильтрата проводят на жидкостном хроматографе. Условия хроматографирования такие же, как и при построении градуировочного графика п. 8.3. Определяют площади пиков, используя компьютерную систему обработки сигналов. Проводят анализ двух параллельных проб.

10 Обработка результатов измерений

Расчет содержания раффинозы/стахиозы, X (%), проводят по формуле:

$$X_{\text{раф/стах}} = \frac{C \times V}{m \times 10}, \quad (2)$$

где C – концентрация раффинозы/стахиозы, найденная по градуировочному графику, мг/см³;

m – масса навески г;

V – общий объем экстракта, 25 см³;

10 – коэффициент пересчета в %.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений по формуле (2). Вычисления проводят до третьего знака после запятой и округляют до второго.

Допустимые расхождения между параллельными определениями по отношению к величине среднего арифметического значения не должны превышать для раффинозы 12 % относительных, для стахиозы - 16 % относительных:

Результат анализа \bar{X} , представляют в следующем виде:

$$X_{\text{олигосахаров}} = X_{\text{раффиноза}} + X_{\text{стахиоза}} \quad (3)$$

$$\bar{X}_{\text{олигосахаров}} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (4)$$

где X_1 – результат первого параллельного определения, вычисленный по формуле (3);

X_2 – результат второго параллельного определения вычисленный по формуле (3).

Гарантированный результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде:

$$(\bar{X} \pm U(X)), \quad \%, \quad (5)$$

где \bar{X} – среднее арифметическое из результатов измерений 2-х параллельных проб, полученное в соответствии с п.9 и рассчитанное согласно п.10;

$U(X)$ – абсолютное значение расширенной неопределенности результата измерений \bar{X} , % (Приложение Б). Рассчитывается по формуле:

$$U(X) = U \times 0,01 \times \bar{X}, \quad (6)$$

где U – относительное значение расширенной стандартной неопределенности, вычисленное в соответствии с Приложением Б

Если величина \bar{X} оказывается меньше предела измерения методики (C_{LOQ}), то вычисления по формуле (2) не производят, а дают одностороннюю оценку массовой концентрации олигосахаров в пробе в виде $X < (C_{LOQ})$, где (C_{LOQ}) – нижний предел измерения методики.

11 Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют по форме, установленной действующей в лаборатории системой регистрации данных.

Результаты должны включать следующую информацию:

- Наименование (шифр) пробы;
- Дату проведения измерений;
- Результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;
- Результаты параллельных определений;
- Окончательный результат измерений;
- Фамилию оператора.

12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости осуществляют согласно п. 5.2.2.1 СТБ ИСО 5725-6. Два результата испытаний должны быть получены в условиях повторяемости.

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами единичных наблюдений $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости $r_{абс.}$. Абсолютное значение предела повторяемости $r_{абс.}$, %, рассчитывают по формуле

$$r_{абс.} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X} \quad (7)$$

где 0,01 – коэффициент пересчета из процентов;

\bar{X} – среднее арифметическое значение двух результатов единичных наблюдений, %;

r – относительное значение предела повторяемости, %, указанное в таблице 2.

Если для значения абсолютного расхождения между двумя результатами единичных наблюдений выполняется условие

$$|X_1 - X_2| < r_{абс.}, \quad (8)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение \bar{X} , рассчитанное по формуле (4).

Если абсолютное значение разности превышает значение r_{abc} , то следует получить еще два результата. Если размах четырех результатов испытаний равен или меньше критического размаха (формула 9), то среднее арифметическое четырех результатов (формула 11) должно указываться как конечный заявляемый результат.

$$|X_{\max} - X_{\min}| \leq CR_{0,95}, \quad (9)$$

$$\text{где } CR_{0,95} = 3,6 \times \sigma_r \quad (10)$$

Значения σ_r представлены в таблице 1.

$$\bar{X}_{ок} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4}{4} \quad (11)$$

Если данное условие не выполняется, то следует отказаться от полученных данных, выяснить и устранить причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности, осуществляют согласно СТБ ИСО 5725-6.

После проверки полученных результатов параллельных определений по критерию повторяемости по п.12 рассчитывают среднее арифметическое $\bar{\bar{X}}$ двух результатов измерений \bar{X}_1 и \bar{X}_2 соответственно, %:

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (12)$$

где \bar{X}_1 и \bar{X}_2 - средние значения, рассчитанные на основании двух параллельных измерений, вычисленные по формуле (3) в условиях промежуточной прецизионности.

Рассчитывают абсолютную разность результатов \bar{X}_1 и \bar{X}_2 , и сравнивают с абсолютным значением предела промежуточной прецизионности CR_{abc} .

$$CR_{abc} = 0,01 \cdot CR_{0,95} \cdot \bar{\bar{X}} \quad (13)$$

где 0,01 – коэффициент для пересчета процентов;

$$CR_{0,95} = \sqrt{r_{I(70)}^2 - \frac{r^2}{2}}, \quad (14)$$

где r и $r_{I(70)}^2$ - относительные значения пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, указанные в таблице 2.

Если для значения абсолютного расхождения между результатами выполняется условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| < CR_{abc}, \quad (15)$$

то оба конечных результата, полученные в условиях промежуточной прецизионности, считаются приемлемыми и среднее значение $\bar{\bar{X}}$, рассчитанное по формуле (11), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

При превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля промежуточной прецизионности.

14 Проверка стабильности результатов измерений

Стабильность результатов измерений проверяется с использованием контрольной карты Шухарта (R-карта размахов по ИСО 8258) в соответствии с СТБ ИСО 5725-6 п.6.2.2.

При построении контрольной карты используют контрольную рабочую пробу стабильную во времени (например, обогащенный олигосахаридами продукт, соответствующий области применения данной МВИ с установленным сроком годности). Содержание олигосахаридов в контрольной рабочей пробе должно соответствовать диапазону измерений. Контрольная рабочая проба должна храниться в условиях, обеспечивающих стабильность концентрации олигосахаридов во времени.

Рассчитывают:

- центральную линию: $d_2 \times \sigma_r$,

где $d_2 = 1,128$ (коэффициент для расчета центральной линии для $n=2$);

- границы регулирования: $UCL = D_2 \times \sigma_r$,

где $D_2 = 3,686$ (коэффициент для расчета границы регулирования для $n=2$);

- предупреждающие границы: $UCL = D_2(2) \times \sigma_r$,

где $D_2(2) = 2,834$ (коэффициент для расчета предупреждающих границ для $n=2$);

σ_r – стандартное отклонение повторяемости, % (таблица 1).

Оценку стандартного отклонения повторяемости s_r за отчетный период (20 – 30 измерений) получают по формуле:

$$s_r = \left(\frac{\sum_{i=1}^L w_i}{L} \right) / d_2 = \bar{w} / d_2, \quad (16)$$

где $w_i = \frac{|X_{1i} - X_{2i}|}{X_{срi}} \times 100\%$ - размах;

X_{1i} и X_{2i} – результаты первого и второго определения для i -ой пары, г/кг;

$X_{срi}$ - среднее значение результатов первого и второго определений для i -ой пары, г/кг

L – количество пар проведенных измерений за отчетный период (20 - 30 измерений).

Полученные значения заносят в лист данных контрольной карты:

Дата проведения анализа	Наблюдаемые значения			Размах w, %	Описание
	X ₁	X ₂	X _{ср}		
				Сумма	
				Среднее значение	\bar{w}/d_2

Графически по оси X откладывают дату проведения анализа, по оси Y – размах w. Также отмечают центральную линию и линии предупреждающей и регулирующей границ.

Интерпретацию результатов проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6-2002 п.6.

Методика разработана лабораторией химии пищевых продуктов отдела физико-химических исследований ГУ «РНПЦ гигиены» МЗ РБ.

Разработчики:

Заведующая лабораторией, к.х.н.

О.В. Шуляковская

Старший научный сотрудник

Л.Л. Бельшева

Младший научный сотрудник

Е.И.Полянских

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(обязательное)

Нормативные ссылки

ГОСТ 15150-69	Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды.
ППБ 1.04 – 2002	Инструкции «Основные правила безопасности работы в химических лабораториях». – М.: Химия, 1979 г. ; Общие правила пожарной безопасности Республики Беларусь для общественных зданий и сооружений.»
ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.
ГОСТ 12.2.003-91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.
СТБ 1036-97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
ГОСТ ИСО 5725-6 -2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике (ISO 5725-6:1994/Соч.1:2001,ИДТ)