МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 10633-1—2022

ЖМЫХИ И ШРОТЫ

Определение содержания глюкозинолатов

Часть 1

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 10633-1:1995, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2022

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Некоммерческой организацией «Ассоциация производителей и потребителей масложировой продукции» на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 238 «Масла растительные и продукты их переработки»

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 8 июня 2022 г. № 152-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
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 июня 2022 г. № 553-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10633-1—2022 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2022 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 10633-1:1995 «Жмыхи и шроты. Определение содержания глюкозинолатов. Часть 1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии» («Oilseed residues — Determination of glucosinolates content — Part 1: Method using high-performance liquid chromatography», IDT).

Международный стандарт разработан Подкомитетом SC 2 «Масличные семена и плоды» Технического комитета ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 Некоторые элементы настоящего стандарта могут быть объектом патентных прав. Международная организация по стандартизации (ISO) не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех патентных прав

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© ISO, 1995
© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2022

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 Принцип метода 2
4 Реактивы 2
5 Оборудование 3
6 Отбор проб 3
7 Подготовка проб 3
8 Методика проведения анализа 4
9 Обработка результатов 5
10 Точность 7
11 Протокол испытаний 7
Приложение А (обязательное) Приготовление реактивов 9
Приложение В (справочное) Результаты межлабораторного испытания 12
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам 13

Введение

ISO 10633 под общим названием «Жмыхи и шроты. Определение содержания глюкозинолатов» состоит из следующих частей:

- часть 1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии;
- часть 2. Метод рентгеновской флуоресцентной спектрометрии.

Приложение А является неотъемлемым составляющим настоящего стандарта. Приложение В предназначено только для ознакомления.

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

ЖМЫХИ И ШРОТЫ

Определение содержания глюкозинолатов

Часть 1

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Oilseed residues. Determination of glucosinolates content. Part 1. Method using high-performance liquid chromatography

Дата введения — 2022—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания различных глюкозинолатов в продуктах из масличных семян семейства крестоцветные.

Примечание 1 — Данный метод не позволяет определять глюкозинолаты, молекула глюкозы в которых замещена, однако содержание этих веществ в коммерчески доступном рапсе незначительное.

Примечание 2 — Данный метод позволяет обнаружить немодифицированные (или нативные) глюкозинолаты. Однако он не идентифицирует и не определяет количество продуктов распада, образовавшихся в ходе разложения глюкозинолатов в процессе производства шрота. Поэтому антипитательное воздействие этих продуктов распада не может быть принято во внимание.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 771:1977* Oilseed residues — Determination of moisture and volatile matter content (Жмыхи и шроты. Определение содержания влаги и летучих веществ)

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

ISO 5502:1992 Oilseed residues — Preparation of test samples (Жмыхи и шроты. Подготовка образца для испытаний)

ISO 9167-1:1992** Rapeseed — Determination of glucosinolates content — Part 1: Method using high-performance liquid chromatography (Семена рапса. Определение содержания глюкозинолатов. Часть 1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии)

* Заменен на ISO 771:2021. Однако для однозначного соблюдения требований настоящего стандарта, выраженного в датированной ссылке, рекомендуется использовать только указанное в этой ссылке издание.

** Заменен на ISO 9167:2019. Однако для однозначного соблюдения требований настоящего стандарта, выраженного в датированной ссылке, рекомендуется использовать только указанное в этой ссылке издание.

Издание официальное

3 Принцип метода

Экстракция глюкозинолатов в растворе метанола с последующей очисткой и ферментным десульфированием на ионообменных смолах. Определение осуществляется обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) в режиме градиентного элюирования и с ультрафиолетовым детектором.

4 Реактивы

Используются реактивы чистые для анализа, если не указано иное, и вода, соответствующая спецификациям для второй степени чистоты по ISO 3696.

4.1 Метанол, степень чистоты ВЭЖХ, раствор концентрацией 70 % (V/V).

4.2 Ацетат натрия, раствор концентрацией 0,02 моль/л, pH 4,0.

4.3 Ацетат натрия, раствор концентрацией 0,2 моль/л.

4.4 Формиат имидазола, раствор концентрацией 6 моль/л.

Для приготовления раствора формиата имидазола необходимо в мерной колбе вместимостью 500 см^3 растворить 204 г имидазола в 113 см^3 муравьиной кислоты. Довести водой до метки.

4.5 Внутренний стандарт

Используется синигрин моногидрат (моногидрат аллилглюкозинолата калия, M_r = 415,49) (см. А.1) или глюкотропаеолин (бензилглюкозинолат, калиевая соль, M_r = 447,52) для семян рапса, так как в его составе содержится синигрин (см. А.2).

В приложении А представлена подробная информация о приготовлении реактивов и контроле их чистоты.

4.6 Подвижная фаза

4.6.1 Элюент А: вода, очищенная через фильтр 0,45 мкм и системой картриджей с активированным углем[1)], или вода эквивалентной чистоты.

4.6.2 Элюент В: ацетонитрил, со степенью чистоты для ВЭЖХ, 20 % (V/V) раствор в воде, которая была очищена и пропущена через фильтр 0,45 мкм. Концентрация может быть изменена в зависимости от используемой колонки.

4.7 Ионообменная смола

4.7.1 DEAE Sepharose CL — 6B[2)], имеющаяся в продаже и готовая к использованию, или аналогичный продукт.

4.7.2 Суспензия DEAE Sephadex A25[2)]

10 г смолы DEAE Sephadex A25 (или другой аналогичной) смешивают с избыточным количеством 2 моль/л раствором уксусной кислоты. Дают отстояться. Добавляют раствор 2 моль/л уксусной кислоты до тех пор, пока объем жидкости не станет равным объему осадка.

4.8 Сульфатаза, Helix pomatia типа H1 (EC 3.1.6.1)[3)]

Очистка, анализ и разведение сульфатазы проводят в соответствии с методами, описанными в А.3.1—А.3.4.

[1)] Система Norganic Millipore — пример подходящего и коммерчески доступного продукта. Эта информация дана для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой данного реактива.

[2)] DEAE Sepharose и Sephadex — пример подходящего и коммерчески доступного продукта. Эта информация дана для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой данного реактива.

[3)] Sulfatase S-9626 (от Sigma Chemicals) с активностью 16 600 единиц/г — пример подходящего и коммерчески доступного продукта. Эта информация дана для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой данного реактива.

5 Оборудование

Используется стандартное лабораторное оборудование, в частности следующее.

5.1 Высокоэффективный жидкостный хроматограф, с возможностью проведения градиентного элюирования и термостатирования колонки на уровне 30 °С с ультрафиолетовым детектором, позволяющим проводить измерения при длине волны 229 нм.

5.2 Хроматографическая колонка для ВЭЖХ, типа C_{18} или C_8 с размером частиц меньше или равным 5 мкм, например[4]:

- колонка Lichrosorb RP 18, ≤ 5 мкм (150 × 4,6 мм);
- колонка Spherisorb ODS2, ≤ 5 мкм (250 × 4 мм; 250 × 5 мм);
- колонка Novapak C_{18}, ≤ 4 мкм (150 × 4 мм);
- колонка Lichrospher RP8, ≤ 5 мкм (125 × 4 мм);
- колонка Nucleosil C_{18}, ≤ 5 мкм (200 × 4 мм).

Эффективность работы колонки следует регулярно проверять, предпочтительно с использованием контрольного образца десульфоглюкозинолата[5] из семян рапса. В частности, колонка не должна разрушать 4-гидроксиглюкобрассицин, являющийся важным, но относительно нестабильным глюкозинолатом.

Новые колонки должны быть предварительно кондиционированы в соответствии с инструкциями производителя для получения воспроизводимых результатов.

5.3 Двухлучевой спектрометр, работающий в ультрафиолетовой области спектра, при контролируемой температуре 30 °С, оснащенный кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 1 см и системой регистрации.

5.4 Микромельница, например кофемолка.

5.5 Центрифуга, с возможностью использования пробирок (см. 5.6), работающая при центробежном ускорении 5000 g.

5.6 Полипропиленовые пробирки вместимостью 6 $см^3$.

5.7 Водяная баня или другое нагревательное оборудование, способное поддерживать температуру на уровне (75 ± 1) °С.

5.8 Стекловата.

5.9 Пипетки Пастера, длиной 150 мм, с соответствующим штативом или любым другим подходящим оборудованием.

6 Отбор проб

Важно, чтобы в лабораторию поступал репрезентативный образец, не поврежденный и не измененный во время транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO 5500[6].

7 Подготовка проб

Лабораторный образец сокращают в соответствии с ISO 5502 для получения требуемого объема пробы. При необходимости измельчить лабораторный образец.

Определение содержания влаги и летучих веществ в образце проводят в соответствии с ISO 771.

Если полученное значение меньше 10 % (m/m), его используют для расчета (см. 9.1). Далее незамедлительно проводят определение содержания глюкозинолатов (см. раздел 8) с использованием анализируемого образца без дальнейшей обработки.

Если же содержание влаги и летучих веществ превышает 10 %, то исследуемый образец высушивают потоком воздуха с температурой примерно 45 °С, после чего проводят повторное определение.

---

[4] Перечисленные хроматографические колонки представлены в качестве примеров подходящих и коммерчески доступных продуктов. Эта информация дана для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой данного реактива.

[5] Контрольные образцы десульфоглюкозинолата из масличных семян приобретают из имеющихся на рынке коммерчески доступных продуктов.

[6] ISO 5500:1986, Oilseed residues — Sampling (Жмыхи и шроты. Отбор проб).

Необходимо продолжать высушивание до тех пор, пока содержание влаги и летучих веществ не будет менее 10 % (m/m). Этот окончательный результат используют для расчета. Незамедлительно следует перейти к определению содержания глюкозинолата (см. раздел 8) с использованием высушенного исследуемого образца.

8 Методика проведения анализа

Примечание 3 — Если требуется проверить, соблюдаются ли требования повторяемости, то проводят два отдельных определения в соответствии с 8.1—8.4 и 8.6 в условиях повторяемости.

8.1 Отбор анализируемой пробы для анализа

В две пробирки (см. 5.6) А и В помещают по 100 мг подготовленной анализируемой пробы (см. раздел 7), взвешенной с точностью до 0,1 мг.

8.2 Экстракция глюкозинолатов

8.2.1 Пробирки помещают в водяную баню (см. 5.7) и выдерживают 1 мин при температуре 75 °С. Приливают 2 см^3 кипящего раствора метанола (см. 4.1), после чего незамедлительно вносят:

- в пробирку А 200 мкм раствора внутреннего стандарта молярной концентрации 5 ммоль/л (см. А.1.1); и
- в пробирку В 200 мкм раствора внутреннего стандарта молярной концентрации 20 ммоль/л (см. А.1.2).

Примечание 4 — В соответствии с 4.5 для использования альтернативного раствора внутреннего стандарта.

8.2.2 Продолжают нагревать при температуре 75 °С еще в течение 10 мин, регулярно встряхивая пробирки. Содержимое каждой пробирки перемешивают и центрифугируют при 5000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость из каждой пробирки (см. 5.6) переливают в две другие, обозначенные, соответственно, как А′ и В′.

8.2.3 В пробирки А и В, содержащие сухой осадок, добавляют 2 см^3 кипящего метанола (см. 4.1) и повторно нагревают на водяной бане (см. 5.7) при температуре 75 °С в течение 10 мин, периодически встряхивая.

Центрифугируют в течение 3 мин, после чего надосадочную жидкость из пробирок А, В добавляют в пробирки А′, В′ к соответствующей надосадочной жидкости, полученной в соответствии с 8.2.2

8.2.4 Объем объединенных экстрактов (пробирки А′, В′) доводят водой примерно до 5 см^3 и перемешивают.

Полученные экстракты можно хранить в темноте при минус 18 °С в морозильной камере в течение двух недель.

8.3 Подготовка ионообменных колонок

Обрезают необходимое количество пипеток Пастера (см. 5.9), т. е. две пипетки на образец, таким образом, чтобы выше конуса сливного отверстия пипетки остался объем 1,2 см^3, отверстие закрывают пробкой из стекловаты (см. 5.8). Пипетки устанавливают вертикально в штативе.

Переносят 0,5 см^3 хорошо перемешанной суспензии ионообменной смолы (см. 4.7) в каждую пипетку и дают отстояться.

Пипетки промывают 2 см^3 имидазола формиата (см. 4.4), после чего дважды порциями воды по 1 см^3.

8.4 Очистка и десульфирование

8.4.1 Для каждого объединенного экстракта проводят следующие действия:

8.4.2 Переносят 1 см^3 экстракта (см. 8.2.4) в подготовленную колонку (см. 8.3), не затрагивая поверхность смолы, и дают жидкости стечь. Далее приливают две порции ацетатного буфера по 1 см^3 (см. 4.2), позволяя буферу стекать после каждого добавления.

8.4.3 В колонку вносят 75 мкл разбавленного, очищенного раствора сульфатазы (см. 4.8). Оставляют на ночь при комнатной температуре.

8.4.4 Пробирку (см. 5.6) помещают под колонку для сбора элюата. Элюируют полученные десульфоглюкозинолаты двумя порциями воды по 1 $см^3$, позволяя воде стекать после каждого добавления.

8.4.5 Элюат тщательно перемешивают. Если элюат не используется для хроматографии сразу, то допускается его хранение в темноте при температуре минус 18 °С в морозильной камере в течение недели.

8.5 Контрольное определение

Если требуется (см. 9.3), то проводят контрольное определение с применением аналогичной процедуры на анализируемой пробе, взятой из того же испытуемого образца, но без использования раствора внутреннего стандарта синигрина, что позволит обнаружить и определить количество синигрина, присутствующего в анализируемой пробе.

8.6 Проведение хроматографического анализа

8.6.1 Настройка оборудования

Хроматограф (см. 5.1) настраивают следующим образом:

- расход подвижной фазы (см. 4.6) зависит от типа используемой колонки (см. 8.6.2) и обычно составляет 1 $см^3$/мин;
- температура колонки (см. 5.2): 30 °С;
- длина волны 229 нм.

8.6.2 Определение

Действуя в соответствии с инструкциями к оборудованию, в хроматограф вводят не более чем 50 мкл раствора десульфоглюкозинолата, полученного в соответствии с 8.4.4.

Используется градиентное элюирование, соответствующее используемой колонке.

Примечание 5 — Следующие градиенты элюирования приведены в качестве примеров:

a) Для колонки Lichrosorb RP18, ≤ 5 мкм (150 × 4,6 мм):
- 100 % элюента А (см. 4.6.1) в течение 1 мин;
- линейный градиент элюирования в течение 20 мин до получения 0 % элюента А и 100 % элюента В (см. 4.6.2);
- линейный градиент элюирования в течение 5 мин до получения 100 % элюента А и 0 % элюента В;
- 100 % элюента А (см. 4.6.1) в течение 5 мин для установления равновесия.

b) Для колонки Lichrospher RP18, ≤ 5 мкм (125 × 4 мм):
- 100 % элюента А (см. 4.6.1) в течение 2 мин 30 с;
- линейный градиент элюирования в течение 18 мин до получения 0 % элюента А и 100 % элюента В;
- 100 % элюента В в течение 5 мин;
- линейный градиент элюирования в течение 2 мин с ростом доли элюента А до 100 % и одновременным снижением доли элюента В до 0 %;
- продолжать в течение 5 мин для установления равновесия.

Примечание 6 — Профили градиента могут быть изменены для получения оптимального разделения в соответствии с используемыми колонками.

8.6.3 Обработка хроматограмм

Учитываются только те пики, площадь которых более 1 % от общей суммы площадей пиков.

Порядок элюирования пиков колонки типа C_{18} с соответствующим градиентным элюированием (в соответствии с примерами, приведенными в 8.6.2), как правило, соответствует представленному на рисунке 1.

9 Обработка результатов

9.1 Расчет содержания глюкозинолатов

Содержание каждого глюкозинолата C_i, выраженное в микромолях на грамм сухого вещества продукта, вычисляют по формуле

$$C_i = \frac{A_g}{A_s} \cdot \frac{n}{m} \cdot \frac{K_g}{K_s} \cdot \frac{100}{100 - w}, \quad (1)$$

где A_g — площадь пика, в единицах интегратора (или интегрирующего устройства), соответствующая определяемому десульфоглюкозинолату;

A_s — площадь пика, в единицах интегратора (или интегрирующего устройства), соответствующая использованному внутреннему стандарту (десульфосинигрину или десульфоглюкотропаеолину);

n — количество внутреннего стандарта, добавленного в пробирку по 8.2 (синигрина или глюкотропаеолина), мкмоль;

m — масса аналитической пробы, г;

K_g — фактор отклика десульфоглюкозинолата (см. 9.2);

K_s — фактор отклика внутреннего стандарта (десульфосинигрина или десульфоглюкотропаеолина);

w — содержание влаги и летучих веществ, выраженное в процентах от массы анализируемой пробы.

Для выражения результата с учетом конкретного содержания влаги и летучих веществ w_s [например, w_s = 9 % (m/m)], результат, полученный для сухого вещества (как показано выше), следует умножить на коэффициент $\frac{100 - w_s}{100}$.

9.2 Факторы отклика

Следует использовать следующие факторы отклика.

Примечание 7 — Данные факторы отклика были определены экспериментально, а единое значение было выбрано и согласовано лабораториями, принимавшими участие в испытании. В дальнейшем они могут быть пересмотрены и изменены.

1	Десульфоглюкоиберин	1,07
2	Десульфолпрогоитрин	1,09
3	Десульфоэпи-прогоитрин	1,09
4	Десульфосинигрин	1,00
5	Десульфоглюкорафанин	1,07
6	Десульфоглюконаполеиферин	1,00
7	Десульфоглюкоалиссин	1,07
8	Десульфоглюконапин	1,11
9	Десульфо-4-гидроксиглюкобрассицин	0,28
10	Десульфоглюкобрассицанапин	1,15
11	Десульфоглюкотропаеолин	0,95
12	Десульфоглюкобрассицин	0,29
13	Десульфоглюконастуртин	0,95
14	Десульфо-4-метоксиглюкобрассицин	0,25
15	Десульфоглюкобрассицин	0,20
16	Другие десульфоглюкозинолаты	1,00

9.3 Расчет общего содержания глюкозинолатов

Общее содержание глюкозинолатов, выраженное в микромолях на грамм сухого вещества продукта, равно сумме содержаний каждого глюкозинолата (соответствующая площадь пика которого больше 1 % от суммы площадей пиков).

Если разница между результатами общего содержания глюкозинолата обеих концентраций соответствует условиям повторяемости (см. 10.1), значит, отсутствует загрязнение внутреннего стандарта. В этом случае в качестве результата принимают среднее арифметическое значение двух определений.

Если условия повторяемости не выполняются, следует повторить процедуру на двух других порциях образца и выполнить контрольное испытание (см. 8.5), без использования раствора внутреннего стандарта. Площадь области загрязнения вычитается из площади внутреннего стандарта, для определения истинной площади внутреннего стандарта, используемого в 9.1. За результат принимают среднее арифметическое значение двух определений.

Глюкотропаеолин (см. А.2) может быть использован в качестве раствора внутреннего стандарта в 8.2.1.

10 Точность

Подробности межлабораторных испытаний по определению точности метода приведены в приложении В.

10.1 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых единичных испытаний, полученных с использованием одного и того же метода на идентичном исследуемом материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в течение короткого промежутка времени, не должно превышать 10 % от среднего арифметического значения двух результатов с минимальным показателем 1 мкмоль/г.

10.2 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух единичных испытаний, полученных с использованием одного и того же метода на идентичном исследуемом материале в разных лабораториях разными операторами с использованием разного оборудования, не должна превышать 20 % от среднего арифметического значения двух результатов с минимальным показателем 2 мкмоль/г.

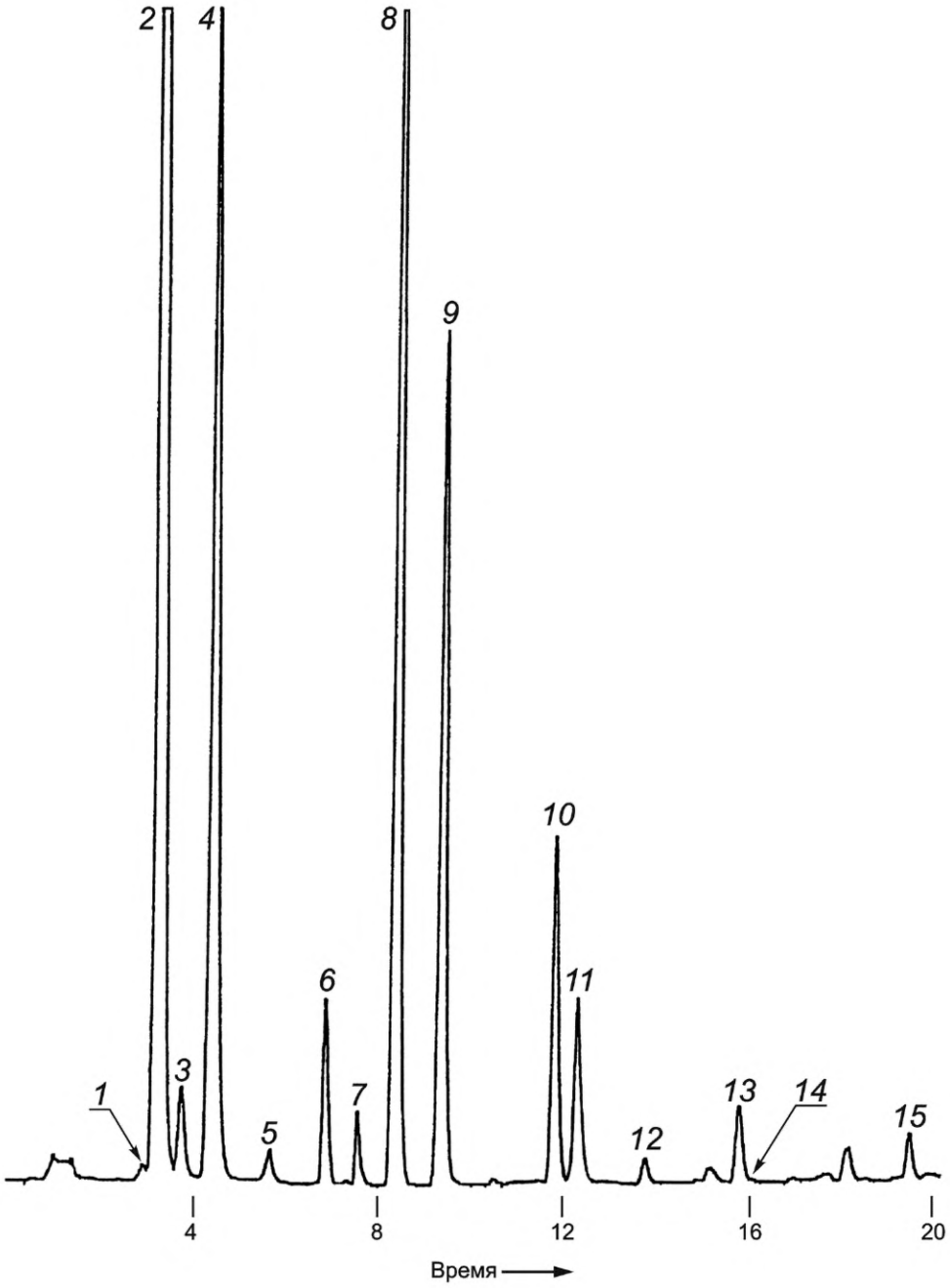
11 Протокол испытаний

В протоколе испытаний должны быть указаны:

- сведения об используемом методе отбора проб;
- сведения об используемом методе испытания;
- полученный(е) результат(ы), а также
- если была проверена повторяемость, то полученный окончательный результат.

В протоколе также должны быть указаны все рабочие подробности, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также детали любых инцидентов, которые могли повлиять на результат(ы) определения.

Протокол испытаний должен включать всю информацию, необходимую для полной идентификации образца.



1-десульфоглюкоиберин; *2*-десульфолпрогоитрин; *3*-десульфоэпи-прогоитрин; *4*-десульфосинигрин; *5*-десульфоглюкорафанин; *6*-десульфоглюконаполеиферин; *7*-десульфоглюкоалиссин; *8*-десульфоглюконапин; *9*-десульфо-4-гидроксиглюкобрассицин; *10*-десульфоглюкобрассицанапин; *11*-десульфоглюкотропаеолин; *12*-десульфоглюкобрассицин; *13*-десульфоглюконастуртин; *14*-десульфо-4-метоксиглюкобрассицин; *15*-десульфоглюкобрассицин

Рисунок 1 — Пример типичной хроматограммы

Приложение А
(обязательное)

Приготовление реактивов

А.1 Синигрин моногидрат

А.1.1 Синигрин моногидрат, раствор концентрацией 5 ммоль/л

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют 207,7 мг моногидрата аллилглюкозинолата калия в воде и доводят до метки водой.

Приготовленный раствор можно хранить в холодильнике неделю при температуре примерно 4 °С или в морозильной камере при минус 18 °С в течение 6 мес.

А.1.2 Синигрин моногидрат, раствор концентрацией 20 ммоль/л

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют 831,0 мг моногидрата аллилглюкозинолата калия в воде и доводят до метки.

Приготовленный раствор можно хранить в холодильнике неделю при температуре примерно 4 °С или в морозильной камере при минус 18 °С в течение 6 мес.

А.1.3 Контроль чистоты

Используется один или несколько из приведенных ниже тестов:

- ВЭЖХ с применением метода, приведенного в ISO 9167-1;
- анализ неизменного синигрина посредством ВЭЖХ (метод ионной пары);
- анализ десульфатированного и силилированного синигрина газовой хроматографией.

Для каждого теста хроматограмма должна показывать только один основной пик, составляющий не менее 98 % от общей площади пиков компонентов.

Для подтверждения чистоты проводят определение количества глюкозы, высвободившейся в результате гидролиза при участии мирозиназы (тиоглюкозид глюкогидролазы; ЕС 3.2.3.1). Количество глюкозы измеряют ферментативным методом с использованием уже готовых коммерчески доступных тестовых наборов. Учитывают все количество свободной глюкозы. Это определение проводят тем же способом, но без добавления мирозиназы. Молярная концентрация глюкозы должна быть не менее 98 % от молярной концентрации исследуемого раствора синигрина.

А.2 Глюкотропаеолин

Примечание 8 — Глюкотропаеолин иногда сложно отделить от других природных минорных глюкозинолатов.

А.2.1 Глюкотропаеолин, раствор концентрацией 5 ммоль/л

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют 223,8 мг глюкотропаеолина и доводят до метки водой.

Приготовленный раствор можно хранить в холодильнике неделю при температуре примерно 4 °С или в морозильной камере при минус 18 °С в течение 6 мес.

А.2.2 Глюкотропаеолин, раствор концентрацией 20 ммоль/л

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют 895,0 мг глюкотропаеолина в воде и доводят до метки водой.

Приготовленный раствор можно хранить в холодильнике неделю при температуре примерно 4 °С или в морозильной камере при минус 18 °С в течение 6 мес.

А.2.3 Контроль чистоты

Чистоту проверяют в соответствии с А.1.3.

А.2.4 Фактор отклика

Проверяют соответствие факторов отклика глюкотропаеолина по сравнению с синигрином, указанным в 9.2.

А.3 Сульфатазы

А.3.1 Подготовка ионообменных колонок

Обрезают пять пипеток Пастера (см. 5.9) на 7 см выше конуса сливного отверстия и вкладывают пробку из стекловаты (см. 5.8) в отверстие пипетки. Пипетки устанавливают вертикально в штативе, после чего в каждую приливают достаточное количество ионообменной смолы (см. 4.7.1) так, чтобы после стекания воды объем ионообменной смолы составлял 500 мкл.

В каждую пипетку вносят по 1 см^3 раствора имидазола формиата (см. 4.4) и дважды промывают порциями воды по 1 см^3.

А.3.2 Очистка

С точностью до 0,1 мг взвешивают 25 мг сульфатазы Helix pomatia типа H1 (см. 4.8) и растворяют в 2,5 см^3 воды, после чего полученный раствор переносят по 0,5 см^3 в каждую из колонок, подготовленных по А.3.1. Каждую колонку промывают 1,5 см^3 воды и промывной элюат отбрасывают. Затем добавляют 1,5 см^3 0,2 моль/л раствора ацетата натрия (см. 4.3) и собирают элюаты из пяти колонок в пробирку для определения.

Элюаты концентрируют путем фильтрации с использованием иммерсионного фильтра[7)] до тех пор, пока не останется примерно 0,1 см^3 жидкости (сульфатаза с молярной массой более 5000 не удаляется). Добавляют 2,5 см^3 воды и концентрируют еще раз, пока не останется 0,1 см^3 жидкости. Разводят до 2,5 см^3 водой и хранят очищенную сульфатазу в морозильной камере при минус 18 °С (в небольших количествах, чтобы было удобно размораживать необходимое количество перед непосредственным использованием).

А.3.3 Определение активности сульфатазы

А.3.3.1 Приготовление раствора синигрина 0,15 ммоль/л, с pH 5,8

Готовят три раствора в следующей последовательности:

a) в мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят 1 см^3 уксусной кислоты и доводят водой до метки;

b) в мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят 1 см^3 этилендиамина и доводят водой до метки;

c) смешивают 73 см^3 раствора a) с 40 см^3 раствора b) и доводят pH до значения 5,8, используя растворы a) или b) по мере необходимости.

В мерную колбу на 100 см^3 вносят 3 см^3 раствора синигрина концентрацией 5 ммоль/л (см. А.1.1) и доводят до метки раствором c).

А.3.3.2 Анализ активности

Используя пипетку, перенести 2 см^3 раствора синигрина (см. А.3.3.1) в контрольную и измерительную кюветы двухлучевого спектрометра (см. 5.3), с установленной длиной волны 228 нм и температурой кювет 30 °С. В момент времени t = 0 в измерительную кювету вносят 50 мкл очищенной сульфатазы (см. А.3.2) и сразу же включают регистратор. Регистратор выключают, когда оптическая плотность больше не меняется (A_c), строят касательную к точке t = 0 и измеряют градиент $\Delta A/\Delta t$.

Единица активности сульфатазы соответствует образованию 1 мкмоль/мин десульфированного синигрина при температуре 30 °С и pH 5,8.

Активность сульфатазы E, выраженная в единицах активности на кубический сантиметр раствора сульфатазы, вычисляют по формуле

$$E = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\Delta \varepsilon} \cdot \frac{1000}{50} \cdot 10^6, \qquad (A.1)$$

где $\Delta A/\Delta t$ — градиент касательной к точке t = 0, в единицах оптической плотности в минуту;

V — объем реакционной среды ($2{,}05 \cdot 10^{-3}$), л;

$\Delta\varepsilon$ — (приблизительно 1500 л моль$^{-1}$ см$^{-1}$), разница между молярным коэффициентом поглощения синигрина и десульфосинигрина при 228 нм, то есть

$$\Delta\varepsilon = \frac{A_e}{l \cdot c}, \qquad (A.2)$$

где A_e — разница между оптической плотностью десульфированного синигрина в состоянии равновесия и оптической плотностью в момент времени t = 0;

l — длина оптического пути кюветы, см (т. е. 1 см);

c — концентрация десульфированного синигрина при равновесии, моль/дм^3, то есть

$$c = \frac{0{,}15 \cdot 10^{-3} \cdot 0{,}95 \cdot 2}{2{,}05} = 1{,}39 \cdot 10^{-3}, \qquad (A.3)$$

где 0,95 — выход десульфированного синигрина при равновесии.

---

7) Millipore PLGC 11K25 — пример подходящего и коммерчески доступного продукта. Эта информация дана для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой данного реактива.

В качестве альтернативы активность сульфатазы может быть рассчитана с использованием следующей упрощенной формулы

$$E = \frac{\Delta A \cdot 5{,}7}{\Delta t \cdot A_e}. \quad (A.4)$$

А.3.4 Разведение сульфатазы

Используя пипетку, в мерную колбу вместимостью 10 см^3 пипеткой переносят 1 см^3 очищенной сульфатазы (см. А.3.2). Объем доводят до метки водой и перемешивают.

Раствор делят на небольшие порции и хранят в морозильной камере при температуре минус 18 °С.

Приложение В
(справочное)

Результаты межлабораторного испытания

Межлабораторное испытание было организовано в 1992 году Международной организацией по стандартизации, результаты его оценены в соответствии с ISO 5725[8)] и приведены в таблице 1. Участвовали одиннадцать лабораторий, каждая из которых провела по два определения каждого образца. «Выпадающие» лаборатории отсутствовали.

Таблица В.1 — Определение содержания глюкозинолатов в масличных семенах

Образец	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	C	C	C	C	C
	TOT	PRO	GNA	4OH	GBN	TOT	PRO	GNA	4OH	GBN	TOT	PRO	GNA	4OH	GBN
Среднее значение (мкмоль/г сухого вещества)	13,4	7,8	2,7	0,9	0,8	47,5	27,4	12,3	2,2	2,6	5,9	2,6	1,4	0,4	0,4
Стандартное отклонение повторяемости s_r	0,41	0,31	0,10	0,08	0,03	1,39	1,18	0,83	0,21	0,16	0,21	0,12	0,07	0,03	0,02
Коэффициент вариации повторяемости, %	3,09	3,94	3,67	9,27	3,66	2,92	4,31	6,78	9,22	6,21	3,61	4,56	5,39	8,88	6,75
Повторяемость $2{,}83s_r$	1,2	0,9	0,3	0,2	0,1	3,9	3,3	2,3	0,6	0,5	0,6	0,3	0,2	0,1	0,1
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R	1,11	0,73	0,33	0,28	0,15	3,71	2,48	1,80	1,19	0,47	0,86	0,29	0,25	0,15	0,18
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	8,33	9,38	12,27	31,85	17,82	7,81	9,06	14,67	53,31	17,83	14,44	11,37	18,02	42,05	48,73
Воспроизводимость, 2,83 s_R	3,1	2,1	0,9	0,8	0,4	10,4	6,9	5,1	3,3	1,3	2,4	0,8	0,7	0,4	0,5

TOT: Сумма глюкозинолатов
PRO: Прогоитрин
GNA: Глюконапин
4OH: 4 — гидроксиглюкобрассицин
GBN: Глюкобрассицанапин

[8)] ISO 5725:1986, Precision of test methods; Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests (Точность методов испытаний. Определение повторяемости и воспроизводимости стандартного метода испытаний с помощью межлабораторных испытаний).

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 771:1977	—	*
ISO 3696:1987	IDT	ГОСТ ISO 3696—2013 «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля»[1)]
ISO 5502:1992	—	*
ISO 9167-1:1992	IDT	ГОСТ ISO 9167-1—2015 «Рапс. Определение содержания глюкозинолатов. Часть 1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии»

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:
- IDT — идентичные стандарты.

[1)] В Российской Федерации качество воды для лабораторного анализа со степенью чистоты 3 соответствует качеству дистиллированной воды по ГОСТ Р 58144—2018 «Вода дистиллированная. Технические условия».

УДК 543.062:006.354 МКС 67.200.20 IDT

Ключевые слова: глюкозинолаты, высокоэффективная жидкостная хроматография, жмыхи и шроты

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 04.07.2022. Подписано в печать 13.07.2022. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,90.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru