ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EACC)
EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 14892— 2016

МОЛОКО СУХОЕ ОБЕЗЖИРЕННОЕ

Определение содержания витамина D с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 14892:2002, IDT)
(IDF 177:2002, IDT)

Издание официальное

Зарегистрирован
№ 12541
28 июля 2016 г.

Минск
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации по результатам голосования в АИС МГС (протоколом от 27 июля 2016 г. №89-П)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 14892:2002|IDF 177:2002 Dried skimmed milk — Determination of vitamin D content using highperformance (Молоко сухое обезжиренное. Определение содержания витамина).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в национальных органах по стандартизации вышеуказанных государств.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международный стандарт актуализированы.

Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному международному стандарту приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

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

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сущность метода 1
5 Реактивы и материалы 1
5.17 Эталонные растворы витамина D_2 2
5.18 Контрольный раствор 2
5.19 Подвижная фаза очистительной колонки 3
5.20 Подвижная фаза аналитической колонки 3
6 Оборудование 3
7 Отбор проб 3
8 Подготовка пробы для испытания 4
9 Проведение испытания 4
9.1 Общие положения 4
9.2 Подготовка пробы 4
9.3 Омыление и экстракция 4
9.4 Очистка 5
9.5 Определение 5
10 Расчет и представление результатов 5
10.1 Расчет 5
10.2 Представление результатов 5
11 Прецизионность 6
11.1 Межлабораторное испытание 6
11.2 Повторяемость 6
11.3 Воспроизводимость 6
12 Протокол испытаний 6
Приложение А (обязательное) Примечание о процедуре 7
Приложение В (справочное) Активность, выраженная в международных единицах (МЕ) 8
Библиография 9
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту 10

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

МОЛОКО СУХОЕ ОБЕЗЖИРЕННОЕ Определение содержания витамина D с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии

Dried skimmed milk
Determination of vitamin D content using high-performance liquid chromatography

Дата введения —

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания витамина D в образце для испытаний, содержащем не менее 10 мкг витамина D в 100 г (равного 400 МЕ (международных единиц) витамина D на 100 г), с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Результаты определения действительны только в том случае, если при определении содержания витамина D_3 образец для испытаний содержит только витамин D_3 и не содержит витамина D_2 (который будет добавлен как внутренний эталон), а при определении содержания D_2 образец для испытаний содержит только витамин D_2 и не содержит витамина D_3 (который будет добавлен как внутренний эталон). Это должно подтверждаться процедурой, проводимой без добавления внутреннего эталона (витамин D_2).

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный стандарт.

ISO 3696:1987 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытания

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **содержание витамина D в сухом обезжиренном молоке** (vitamin D content of dried skimmed milk): Массовая доля веществ, определяемых методикой, установленной в настоящем стандарте.

Примечание — Содержание витамина D выражается в микрограммах на грамм или в международных единицах (МЕ) активности витамина D на грамм.

4 Сущность метода

Проводят омыление и экстрагирование пробы для испытания. Витамин D отделяют от примесей путем полупрепаративной очистки с использованием метода нормально-фазовой ВЭЖХ. Собирают витамин D из очистной колонки. Содержание витамина D определяют используя метод обратно-фазовой ВЭЖХ с UV-обнаружением. Витамин D_2 используется как внутренний эталон при определении витамина D_3 и наоборот. Внутренний эталон добавляют в каждую рабочую часть перед омылением.

5 Реактивы и материалы

Используют реактивы только требуемой аналитической чистоты, если не предусмотрено иное.

5.1 **Вода**, соответствующая требованиям ISO 3696 (1 степени чистоты).

5.2 **Этанол** (C_2H_5OH), объемной долей 95 %, не содержащий альдегида.

5.3 **Раствор аскорбата натрия**, $c(NaC_6H_5O_6 \cdot H_2O)$ = 200 г/л.

При отсутствии раствора в готовом виде приготавливают этот раствор, растворяя 3,5 г аскорбиновой кислоты ($C_6H_8O_6$) в 20 мл раствора гидроксида натрия (NaOH) молярной концентрацией 1 моль/л. Используют свежеприготовленный раствор.

5.4 **Водный раствор гидроксида калия**, c(KOH) = 500 г/л.

Растворить 50 г гидроксида калия (KOH) в 50 мл воды в мерной колбе номинальной вместимостью 100 мл (6.6). Полученный раствор перемешивают и охлаждают до температуры окружающей среды. Доводят до метки водой и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Издание официальное

5.5 **Водно-спиртовой раствор гидроксида калия**, *c*(KOH) = 30 г/л.

Растворить 3 г гидроксида калия (KOH) в воде в мерной колбе номинальной вместимостью 100 мл с одной меткой (6.6) и добавляют 10 мл этанола (5.2). Доводят до метки водой и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

5.6 **Петролейный эфир**, перегнанный при температуре 40 °С — 60 °С или 60 °С — 80 °С.

5.7 **Метанол** (CH_3OH), квалификации «для ВЭЖХ».

5.8 **н-Гексан** (C_6H_{14}), квалификации «для ВЭЖХ».

5.9 **н-Пентанол** ($C_5H_{11}OH$), квалификации «для ВЭЖХ».

5.10 **Ацетонитрил** (CH_3CN), квалификации «для ВЭЖХ».

5.11 **Пропан-2-ол** (C_3H_7OH), квалификации «для ВЭЖХ».

5.12 **Азот**, химически чистый, не содержащий кислорода.

5.13 **Бутилгидрокситолуол** (БГТ), химически чистый.

5.14 **Антиокислительный раствор**, 10 мг БГТ (5.13) на миллилитр н-гексана (5.8).

5.15 **Фильтровальная бумага**, диаметром 9 см.

5.16 **Эталонные растворы витамина D_3**.

5.16.1 **Эталонный исходный раствор витамина D_3**, например Ph Eur или USP [1)] эталонный стандарт холекальциферола.

В мерной колбе номинальной вместимостью 100 мл с одной меткой (6.6) взвешивают приблизительно 20 мг холекальциферола. Доводят до метки этанолом (5.2) и перемешивают.

Полученный раствор может храниться в течение 1 мес при температуре минус (18 ± 1) °С.

5.16.2 Эталонный рабочий раствор I витамина D_3

В мерную колбу номинальной вместимостью 100 мл с одной меткой (6.6) с помощью пипетки (6.7) добавляют 10 мл эталонного исходного раствора витамина D_3 (5.16.1). Доводят до метки этанолом (5.2) и перемешивают.

5.16.3 Эталонный рабочий раствор II витамина D_3

Во вторую мерную колбу номинальной вместимостью 100 мл с одной меткой (6.6) с помощью пипетки (6.7) добавляют 1 мл эталонного рабочего раствора I витамина D_3 (5.16.2). Доводят до метки этанолом (5.2) и перемешивают. Полученный раствор содержит 0,2 мкг/мл (=8 МЕ/мл).

5.17 Эталонные растворы витамина D_2

5.17.1 **Эталонный исходный раствор витамина D_2**, например Ph Eur или USP [1)] эталонный стандарт эргокальциферола.

В мерной колбе номинальной вместимостью 100 мл с одной меткой (6.6) взвешивают приблизительно 20 мг эргокальциферола. Доводят до метки этанолом (5.2) и перемешивают.

Полученный раствор может храниться в морозильнике в течение 1 мес.

5.17.2 Эталонный рабочий раствор I витамина D_2

В мерную колбу номинальной вместимостью 100 мл с одной меткой (6.6) с помощью пипетки (6.7) добавляют 10 мл эталонного исходного раствора витамина D_2 (5.17.1). Доводят до метки этанолом (5.2) и перемешивают.

5.17.3 Эталонный рабочий раствор II витамина D_2

Во вторую мерную колбу номинальной вместимостью 100 мл с одной меткой (6.6) с помощью пипетки (6.7) добавляют 1 мл эталонного рабочего раствора I витамина D_2 (5.17.2). Доводят до метки этанолом (5.2) и перемешивают. Полученный раствор содержит 0,2 мкг/мл (8 МЕ/мл).

5.18 Контрольный раствор

В мерной колбе номинальной вместимостью 100 мл готовят контрольный раствор путем смешивания 1 мл эталонного рабочего раствора I витамина D_3 (5.16.2) и 1 мл эталонного рабочего **раствора I** витамина D_2 (5.17.2) и доводят до метки метанолом (5.7). Полученный контрольный раствор содержит 0,2 мкг/мл холекальциферола и 0,2 мкг/мл эргокальциферола (8 МЕ/мл витамина D_3 и 8 МЕ/мл витамина D_2).

[1)] Ph Eur и USP — это примеры подходящих продуктов, имеющихся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанных продуктов со стороны ISO.

5.19 Подвижная фаза очистительной колонки

Дегазируют н-гексан (5.8) при пониженном давлении. Смешивают 3 мл н-пентанола (5.9) с 997 мл только что дегазированного н-гексана (см. 6.3 и А.2.1).

5.20 Подвижная фаза аналитической колонки

Используют смесь ацетонитрил/пропан-2-ол/вода (соотношение 90:7:3); например, смешивают 900 мл ацетонитрила (5.10), 70 мл пропана-2-ол (5.11) и 30 мл воды (5.1) (см. 6.4 и А.3.1).

6 Оборудование

Для проведения измерений используют стандартное лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

6.1 **Аналитические весы**, способные взвешивать с точностью до 0,1 мг с отсчетом до 0,01 мг.

6.2 **Жидкостной хроматограф**, оснащенный ультрафиолетовым детектором.

Обычными рабочими условиями являются:

- УФ-детектор, который контролирует абсорбцию при длине волны 265 мм или приблизительно такой длины для детектора с фиксированной длиной волны;
- две колонки — очистительная и аналитическая;
- чувствительность детектора 0,128 оптических единиц на всю шкалу (AUFS);
- скорость протяжки ленты — 10 мм/мин;
- температура окружающей среды.

6.3 **Очистная хроматографическая колонка**, изготовленная из нержавеющей стали, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, имеющая силиконовую прокладку с частицами размером 5 мкм (материал для нормальной фазы), способная выдержать испытание на пригодность системы (А.2.1); скорость потока элюанта 3 мл/мин; объем вводимой пробы 600 мкл.

6.4 **Аналитическая хроматографическая колонка**, изготовленная из нержавеющей стали, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, имеющая силиконовую прокладку с размером частиц 5 мкм (материал для обращенной фазы С-18 или ODS (октадецильдиметилсилан)), способная выдержать испытание на пригодность системы (А.3.1); скорость потока элюанта 2 мл/мин; объем вводимой пробы 200 мкл.

6.5 **Стаканы или конические колбы** номинальной вместимостью 250 мл.

6.6 **Мерные колбы с одной меткой** номинальной вместимостью 100, 250 мл.

6.7 **Пипетки с одной меткой** номинальной вместимостью 1, 4, 5, 10, 20, 50 мл.

6.8 **Колба для омыления** номинальной вместимостью 200 мл, присоединенная к обратному холодильнику.

6.9 **Паровая баня или электрический колбонагреватель**.

6.10 **Делительная воронка** номинальной вместимостью 500 мл, предпочтительнее с политетрафторэтиленовой (ПТФЭ) пробкой.

6.11 **Колбы с коническим дном** номинальной вместимостью 20, 250 мл.

6.12 **Водяные бани** с регулятором нагрева, поддерживающие температуру до (40 ± 1) °С и температуру до 39 °С.

6.13 **Ротационный испаритель**, оснащенный вакуумной системой.

6.14 Верхнеприводная **мешалка**.

7 Отбор проб

Метод отбора проб не регламентирован настоящим стандартом. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO 707.

В лабораторию должна быть передана представительная проба, не поврежденная или измененная во время транспортирования и/или хранения.

8 Подготовка пробы для испытания

Пробу для испытания тщательно перемешивают, вращая и переворачивая емкость, в которую она отобрана. В случае необходимости пробу для испытания помещают в герметичную емкость.

9 Проведение испытания

9.1 Общие положения

Все операции, работы должны выполняться при приглушенном освещении и с использованием посуды из темного стекла или обычной стеклянной посуды, защищенной алюминиевой фольгой.

Все испарения растворителя происходят при пониженном давлении и температуре ниже 40 °С. При пониженном давлении не должно происходить полного испарения. Восстанавливают атмосферное давление с помощью азота. В потоке азота должны испариться последние капли.

См. приложение А для получения дополнительной информации о хроматографической процедуре.

9.2 Подготовка пробы

В стакан или коническую колбу (6.5) отвешивают с точностью до 0,01 г около 50 г (m_1) пробы для испытания и растворяют в 50 мл воды (температурой 60 °С — 80 °С). В случае образования комков их разбивают шпателем. Добавляют еще 50 мл воды (температурой 60 °С — 80 °С) и перемешивают до однородного состояния. Раствор охлаждают до комнатной температуры. Взвешивают с точностью до 0,01 г и вычисляют массу (m_2) содержимого стакана (или конической колбы). Гомогенизируют и отвешивают в колбу для омыления (6.8) с точностью до 0,01 г 20 г (m_3) подготовленной таким образом рабочей части пробы.

9.3 Омыление и экстракция

9.3.1 В колбу для омыления добавляют рабочую часть пробы (9.2), 20 мл водного раствора гидроксида калия (5.4), 10 мл раствора аскорбата натрия (5.3), 50 мл этанола (5.2) и в качестве внутреннего эталона (эталона) 4 мл эталонного рабочего раствора II витамина D_3 (5.16.3) и тщательно перемешивают.

9.3.2 Колбу для омыления с обратным холодильником (9.3.1) нагревают в течение 30 мин на паровой бане или электрическом колбонагревателе (6.9), периодически перемешивая круговыми движениями. По окончании нагревания содержимое колбы быстро охлаждают под проточной водой.

9.3.3 Содержимое из колбы для омыления (9.3.2) переносят в делительную воронку (6.10). Колбу для омыления дважды ополаскивают смесью, состоящей из 30 мл воды, 10 мл этанола (5.2) и 40 мл петролейного эфира (5.6), которую сливают в ту же делительную воронку. Встряхивают сильно раствор в течение 30 с и дают отстояться до четкого разделения на два слоя. После разделения слоев водный (нижний) слой сливают во вторую делительную воронку, добавляют в нее 10 мл этанола (5.2), 40 мл петролейного эфира (5.6) и встряхивают.

9.3.4 После разделения слоев водный слой (9.3.3) сливают в третью делительную воронку, а слой петролейного эфира сливают в первую делительную воронку. Дважды ополаскивают вторую делительную воронку 10 мл петролейного эфира (5.6) и смывы сливают в первую делительную воронку.

9.3.5 В третью делительную воронку добавляют 40 мл петролейного эфира (5.6), 10 мл этанола (5.2) и встряхивают. Слой петролейного эфира сливают в первую делительную воронку. Объединенный экстракт петролейного эфира промывают тремя порциями (по 40 мл) свежеприготовленного водно-спиртового раствора гидроксида калия (5.5), каждый раз интенсивно встряхивая делительную воронку. Затем объединенный экстракт петролейного эфира отмывают от щелочи порциями воды (по 40 мл) до нейтральной реакции промывной воды по фенолфталеину, после того как из делительной полностью сливают воду. Обсушивают делительную воронку от последних капель воды, добавив в нее разрезанные на полоски два листа фильтровальной бумаги (5.15) и встряхивая.

9.3.6 Вышеописанный экстракт переносят в колбу с коническим дном номинальной вместимостью 250 мл с одной меткой (6.11) и ополаскивают делительную воронку с полосками фильтровальной бумаги в ней петролейным эфиром. Смывы сливают в колбу, добавляют 10–20 мг БГТ (5.13), доводят до метки петролейным эфиром и тщательно перемешивают.

9.3.7 Упаривают содержимое колбы с коническим дном (9.3.6) досуха под вакуумом на ротационном испарителе при температуре, не превышающей 39 °С, перемешивая круговыми движениями верхнеприводной мешалкой (6.14). Затем содержимое колбы охлаждают под проточной водой и восстанавливают атмосферное давление с помощью азота (5.12). Выпаривают последние капли петролейного эфира струей азота. Остатки быстро растворяют в 2 мл н-гексана (5.8).

9.4 Очистка

Через клапан для отбора проб в очистительную колонку вводят 600 мкл повторно растворенного стандартного раствора (9.3.7). Регулируют рабочий режим детектора, чтобы получить на шкале наибольшие возможные пиковые значения витамина D_2 и D_3. Фракцию собирают в колбу с коническим

дном номинальной вместимостью 20 мл (6.11) в течение 3 мин до получения пикового значения и в течение 3 мин после получения пикового значения витамина D. Добавляют 1 мл антиокислительного раствора (5.14) и выпаривают до сухого состояния под струей азота. Очищенный таким образом стандартный раствор немедленно растворяют в 2 мл метанола (5.7). Полученный раствор используют для впрыскивания в аналитическую колонку.

9.5 Определение

Через клапан для отбора проб в аналитическую колонку вводят 200 мкл очищенного стандартного раствора (9.4). Регулируют рабочий режим детектора, чтобы получить на шкале наибольшие возможные пиковые значения витамина D_2 и D_3. В очищенном стандартном растворе измеряют максимальные значения витамина D_2 и D_3.

Вводят 200 мкл контрольного раствора (5.18). Используют тот же режим работы, который указан выше для стандартного раствора. Измеряют максимальные значения витамина D_2 и D_3 в контрольном растворе.

10 Расчет и представление результатов

10.1 Расчет

10.1.1 Относительный коэффициент чувствительности детектора

Рассчитывают относительный коэффициент чувствительности детектора R_f по следующей формуле:

$$R_f = \frac{A_e \times m_c}{A_c \times m_e},$$

где A_e — численное значение, представляющее площадь пика (или высоту) эргокальциферола в хроматограмме, полученное на контрольном растворе (9.5);

m_e — масса эргокальциферола в 1 мл контрольного раствора, мкг;

A_c — численное значение, представляющее площадь пика (или высоту) холекальциферола в хроматограмме, полученное на контрольном растворе (9.5);

m_c — масса холекальциферола в 1 мл контрольного раствора, мкг.

10.1.2 Содержание витамина D

Рассчитывают содержание витамина D w, выраженное в микрограммах, холекальциферола на 1 г или в международных единицах (МЕ) активности витамина D на 1 г по следующей формуле:

$$w = \frac{A_{cs} \times m_{es} \times R_f}{A_{es} \times m_s},$$

где A_{cs} — численное значение, представляющее площадь пика (или высоту) холекальциферола в хроматограмме, полученное на стандартном растворе (9.5);

m_{es} — масса эргокальциферола (внутреннего эталона), добавленного к стандартному раствору (9.3.1), мкг;

A_{es} — численное значение, представляющее площадь пика (или высоту) эргокальциферола в хроматограмме, полученное на стандартном растворе (9.5);

m_s — масса рабочей части, г (см. 9.1), используют следующую формулу:

$$m_s = \frac{m_1 \times m_3}{m_2}.$$

10.2 Представление результатов

Результаты испытаний представляют в виде значений, округленных до двух цифр после запятой.

11 Прецизионность

11.1 Межлабораторное испытание

Информация о межлабораторном испытании по определению прецизионности метода, проведенном в соответствии с [2] и [3], была опубликована (см. [4]). Значения, полученные в результате указанного межлабораторного испытания, не могут быть применимы к другим интервалам массовой концентрации и типам матриц, кроме тех, которые указаны.

Следует обратить внимание, что при смешивании витаминов в сухом виде, на прецизионность сильно влияет однородность продукта.

11.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя отдельными результатами испытания, полученными одним лаборантом при использовании им одного и того же метода на идентичном материале для испытаний в одной и той же лаборатории на одном и том же оборудовании в течение короткого промежутка времени, не должна превышать 14 % среднего арифметического значения двух результатов более чем в 5 % случаев.

11.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя отдельными результатами испытаний, полученными разными лаборантами при использовании одного и того же метода на идентичном материале для испытаний в разных лабораториях на разном оборудовании, не должна превышать 17 % среднего арифметического значения результатов более чем в 5 % случаев.

12 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующие данные:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- метод отбора проб, если он известен;
- применяемый метод испытаний со ссылкой на настоящий стандарт;
- любые особенности, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как дополнительные, а также сведения о любых обстоятельствах, которые могли повлиять на результат (ы) испытаний;
- результат (ы) испытаний или, если проводилась проверка повторяемости, окончательный полученный результат.

Приложение А
(обязательное)

Примечание о процедуре

А.1 Общие положения

Результативность хроматографических процедур зависит от типа оборудования, срока службы, поставщика колонки, условий ее функционирования, объема выборки и детектора. Могут использоваться колонки с различной длиной, различные товарные марки наполнителя, могут быть различными объемы впрыскивания, если испытания на пригодность системы (А.2.1 и А.3.1) отвечают требованиям.

А.2 Нормально-фазовая хроматография

А.2.1 Испытание на пригодность очистной колонки

Вводят 600 мкл смеси витаминов D_2 и D_3. В мерной колбе с одной меткой номинальной вместимостью 100 мл (6.6) смешивают 1 мл эталонного исходного раствора витамина D_3 (5.16.1) и 1 мл эталонного исходного раствора витамина D_2 (5.17.1). Доводят до метки н-гексаном (5.8). На хроматограмме не должно быть разделения витаминов D_2 и D_3.

Соотношение н-пентанола к н-гексану влияет на хроматографическое поведение: увеличение содержания спирта подвижной фазы приводит к уменьшению времени удержания.

А.2.2 Время удерживания

Приблизительное время удерживания витаминов D_2 и D_3 в хроматографе с нормальной фазой с н-пентан-2-ол/н-гексаном (3 + 997 мл) в качестве подвижной фазы и колонки 5 мкм Partisil PAC составляет 8 мин.

А.3 Обратно-фазовая хроматография

А.3.1 Испытание на пригодность аналитической колонки

Вводят 200 мкл контрольного раствора (5.18). Разрешение между пиковыми значениями витаминов D_2 и D_3 должно быть не менее 1,5.

Степень разделения или разрешения R рассчитывают по следующей формуле:

$$R = \frac{2D}{B + C},$$

где D – расстояние между максимальным пиковым значением витаминов D_2 и D_3, см;

B – ширина пика витамина D_2, см;

C – ширина пика витамина D_3, см.

Примечание — Содержание воды в подвижной фазе влияет на хроматографическое поведение: увеличение содержания воды вызывает увеличение времени удержания.

А.3.2 Время удерживания

Приблизительное время удерживания витаминов D_2 и D_3 в хроматографе с обращенной фазой с ацетонитрил/пропанол-2ол/водой соотношением 90:7:3 в качестве подвижной фазы и колонкой с герметизирующим материалом 10 мкм Zorbax ODS составляет 13,5 и 15 мин.

Чтобы обеспечить чистоту пика анализируемого вещества и внутреннего эталона, используют контроль двойной длины волны при 265 и 280 нм.

А.4 Нижний предел чувствительности

Нижний предел чувствительности составляет 2,5 мкг на 100 г, который соответствует 100 МЕ на 100 г.

Приложение B
(справочное)

Активность, выраженная в международных единицах (МЕ)

B.1 Активность витамина D

Активность витамина D выражается в международных единицах (МЕ). Было определено ([5]), что одна МЕ витамина D соответствует антирахитической активности 0,025 мкг холекальциферола.

Это означает, что антирахитное действие 1 г чистого холекальциферола, выраженного в международных единицах, составляет 4×10^7 МЕ.

B.2 Количественное определение эталонного витамина D (холекальциферол, чистый)

Подробная информация — в [5].

В мерную колбу с одной меткой номинальной вместимостью 100 мл (6.6) отвешивают с точностью до 0,1 мг 50 мг холекальциферола. Быстро растворяют холекальциферол без нагревания в безальдегидном этаноле. Доводят безальдегидным этанолом до отметки 100 мл и перемешивают полученный раствор (раствор A). С помощью пипетки отбирают 5,0 мл раствора (A) и помещают его в мерную колбу с одной меткой номинальной вместимостью 250 мл (6.6). Доводят до метки безальдегидным этанолом и перемешивают полученный раствор (раствор B). Предполагаемая концентрация витамина D составляет приблизительно 400 МЕ/мл.

Оптическую плотность раствора B измеряют в течение 30 мин с начала приготовления раствора A.

Используя этанол в качестве компенсационной жидкости подтверждают, что максимальная оптическая плотность раствора B, A_m, лежит в пределах (265 ± 1) нм. Оптическую плотность A_n измеряют при 265 нм. Числовое значение полученной оптической плотности должно быть от 0,46 до 0,50.

Примечание — Числовое значение конкретной оптической плотности холекальциферола в этаноле составляет 480 при 265 нм.

Библиография

[1] ISO 707:2008 — Milk and milk products — Guidance on sampling
(Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)

[2] ISO 5725-1:1994 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения)

[3] ISO 5725-2:1994 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений)

[4] Finglas, P.M., Berg van den, H., Froidmont-Goertz de, I. European Commission, BCR Information Reference Materials: The certification of the mass fractions of vitamins in three reference materials: Margarine (CRM 122), Milk powder (CRM 421) and Lyophilized Brussels sprouts powder (CRM 431), EUR Report 18039, 1997 (ISSN 1018-5593)
(Европейская Комиссия, Информационные эталонные материалы BCR. Сертификация массовых долей витаминов в трех эталонных материалах: Маргарин (CRM 122), молочный порошок (CRM 421) и сублимированный порошок брюссельской капусты (CRM 431), Отчет EUR 18039, 1997 (ISSN 1018-5593))

[5] European Pharmacopoeia, Monograph on vitamin D
(Европейская Фармакопея. Монография по витамину D)

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту

Таблица Д.А.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 3696:1987 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний	IDT	ГОСТ ISO 3696—2013 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний

УДК 637.143.074:543.544.5(083.74)(476) МКС 67.100.10 IDT
Ключевые слова: молоко

gost.e-ecolog.ru