МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витамина А

Издание официальное

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ
ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
Минск

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Госстандартом России

ВНЕСЕН Техническим секретариатом Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации

2 ПРИНЯТ Межгосударственным Советом по стандартизации, метрологии и сертификации 21 октября 1993 г.

За принятие проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа по стандартизации
Киргизская Республика	Киргизстандарт
Республика Молдова	Молдовастандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Республика Таджикистан	Таджикгосстандарт
Туркменистан	Главная государственная инспекция Туркменистана
Украина	Госстандарт Украины

3 Постановлением Комитета Российской Федерации по стандартизации, метрологии и сертификации от 2 июня 1994 г. № 160 межгосударственный стандарт ГОСТ 26573.1—93 введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта Российской Федерации с 1 января 1995 г.

4 ВЗАМЕН ГОСТ 26573.1—85

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витамина А

Premixes. Methods for determination of vitamin A

ГОСТ 26573.1—93

ОКСТУ 9209

Дата введения 1995—01—01

Настоящий стандарт устанавливает методы определения витамина А в премиксах, предназначенных для обогащения комбикормов, белково-витаминных добавок и кормовых смесей.

1. Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 13496.0.

2. Определение витамина А методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Сущность метода заключается в экстракции витамина А (ретинола ацетат) из премикса экстрагентом и хроматографическом анализе содержания витамина в испытуемом растворе с использованием жидкостного хроматографа.

Метод применим в диапазоне концентраций витамина А 20—10000 международных единиц (МЕ) на 1 г премикса. Предельная погрешность метода — 10 %.

2.1. Аппаратура и реактивы

Хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром» по ТУ 25—05.2830 или его последующие модификации со спектрофотометрическим детектором и спектральным диапазоном 190—360 нм.

Колонка хроматографическая одного из указанных размеров: 2 × 64, 2 × 80, 2 × 120 мм с числом теоретических тарелок не менее 4000 (по прилагаемому к колонке паспорту), заполненная одним из следующих сорбентов: Силасорб C_{18}, Силасорб $SPHC_{18}$, Сепарон C_{18}.

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

Баня водяная, обеспечивающая постоянство температуры (75±1) °С.

Спектрофотометр со спектральным диапазоном работы 186—1100 нм.

Колбы конические со шлифом вместимостью 25 $см^3$, КН-2—25—18 МХС по ГОСТ 25336.

Пипетка 4—1(2)—1 (исполнения 4, 1-го или 2-го класса, вместимостью 1 $см^3$).

Пипетка 6—1(2)—10 или 7—1(2)—10.

Пипетка 2(3)—1(2)—50.

Колбы мерные 2—25—1(2) (исполнения 2, вместимостью 25 $см^3$, 1-го или 2-го класса точности) по ГОСТ 1770.

Колбы мерные 2—50—1(2) по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1(2, 3, 4)—100, 1(2, 3, 4)—500 по ГОСТ 1770.

Воронка ВФО-40-ПОР 16 ХС по ГОСТ 25336.

Издание официальное

Холодильник ХПТ-1—100—18 ХС по ГОСТ 25336.

Насос водоструйный по ГОСТ 25336.

Бюретка 6—2—2 (исполнения 6, 2-го класса точности, вместимостью 2 $см^3$).

Склянки с притертой пробкой.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.

Спирт этиловый абсолютированный по ТУ 84—11—99.

Спирт изопропиловый (пропанол-2), х. ч., по ТУ 6—09—402.

Спирт пропиловый (пропанол-1), х. ч., по МРТУ 6—09—6628.

Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, х. ч., по ТУ 6—09—06—1092.

Ретинола ацетат в масле, 3,44 %-ный раствор с активностью 90000—110000 МЕ/$см^3$ по фармакопее.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечание. При проведении испытаний допускается использовать импортные аппаратуру, материалы и реактивы с характеристиками не ниже отечественных аналогов.

2.2. Подготовка к испытанию

2.2.1. *Приготовление элюента для хроматографии*

Трехкомпонентный элюент готовят смешиванием пропилового спирта, дистиллированной воды и ацетонитрила в соотношении 50:8:42 (% об.). Для этого в склянку вместимостью 1000 $см^3$ вносят цилиндром 500 $см^3$ пропилового спирта, 420 $см^3$ ацетонитрила и 80 $см^3$ дистиллированной воды.

Приготовленную смесь растворителей фильтруют через стеклянный фильтр для удаления возможных механических примесей и пузырьков воздуха и помещают в стеклянный сосуд с притертой пробкой. Полученный раствор можно хранить в течение 1 мес.

2.2.2. *Подготовка хроматографической колонки*

При работе на неиспользованной ранее колонке или колонке, которая не была подключена к прибору «Милихром», из нее следует удалить воздух и тщательно промыть элюентом до получения стабильной нулевой линии. Для этого через колонку пропускают элюент в количестве 20—30 свободных объемов колонки, т. е. два полных шприца насоса хроматографа при расходе элюента сначала 50 $мкдм^3$/мин, а затем 100 $мкдм^3$/мин. Промывку колонки заканчивают при получении стабильной нулевой линии.

После промывки колонки проводят ее насыщение витамином А. Для этого выполняют 7—10 анализов наиболее концентрированного градуировочного раствора витамина А. Насыщение колонки прекращают, когда отношение разности между двумя последовательными определениями концентрации витамина А к среднему арифметическому значению этих операций не превышает 3 % отн.

При правильной эксплуатации колонка выдерживает до 500—600 анализов.

2.2.3. *Приготовление растворителя для экстракции витамина А из премикса*

Для экстракции витамина А из премиксов используют двухкомпонентный экстрагент состава: изопропиловый спирт и дистиллированная вода в соотношении 97:3 (% об.). Для этого в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят пипеткой 30 $см^3$ дистиллированной воды и доводят до метки изопропиловым спиртом. Хранят в стеклянной емкости с притертой пробкой.

2.2.4. *Приготовление абсолютного этилового спирта*

К этиловому ректификованному спирту прибавляют в соотношении 4:1 свежепрокаленную при температуре 800—1000 °С в течение 2 ч окись кальция. Смесь кипятят с обратным холодильником в течение 2—3 ч. Затем смесь перегоняют, отбрасывая начальную и конечную порции отгона (по 20—30 $см^3$). Перегнанный абсолютный спирт при измерении на спектрофотометре относительно дистиллированной воды в кювете с толщиной слоя 1 см должен иметь значение оптической плотности, не превышающее 0,01 единиц в области 320—350 нм и 0,05 при 280—300 нм.

Если спирт не отвечает вышеуказанным требованиям, процесс обезвоживания повторяют.

Этиловый абсолютный спирт промышленного изготовления перегоняют над твердой гидроокисью натрия или калия (10 г щелочи на 1 $дм^3$ спирта) и проверяют, как указано выше.

2.2.5. *Определение активности витамина А в масляном препарате*

0,1 г масляного препарата витамина А растворяют в абсолютном этиловом спирте в мерной колбе вместимостью 50 $см^3$, перемешивают. Отбирают 1 $см^3$ раствора в колбу вместимостью 50 $см^3$,

заполняют ее до метки абсолютным спиртом и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм при длине волны 326 нм. В качестве контрольного раствора используется абсолютный спирт.

Активность витамина А (X) в международных единицах (МЕ) в 1 г препарата вычисляют по формуле

$$X = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 1880}{m \cdot V \cdot 100},$$

где D — оптическая плотность раствора при длине волны 326 нм;

V_1, V_2 — первое и второе разведения, см^3;

1880 — коэффициент перевода в МЕ;

m — масса навески масляного препарата, г;

V — объем раствора, используемый для второго разведения, см^3;

100 — коэффициент.

2.2.6. *Построение градуировочного графика*

Для приготовления стандартного раствора взвешивают навеску масляного препарата витамина А (3,44 %-ный раствор), необходимую для получения раствора с активностью 30000 МЕ в 50 см^3 или 600 МЕ/см^3. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, растворяют в изопропиловом спирте, перемешивают и доводят этим спиртом до метки.

Раствор хранят в холодильнике и используют в течение одной недели.

Из этого раствора готовят градуировочные (рабочие) растворы. Для премиксов, содержащих витамин А в количестве от 100 МЕ/г и выше, готовят рабочие растворы с содержанием 120, 300, 600, 1200, 3000, 6000, 12000 МЕ витамина в 25 см^3. Для этого берут соответственно, 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 см^3 исходного раствора, помещают в мерные колбы вместимостью 25 см^3 и доводят до метки изопропиловым спиртом.

Для премиксов, содержащих витамин А в количестве 20—100 МЕ/г, готовят рабочие растворы с содержанием 20, 40, 60, 90, 120 МЕ в 25 см^3. Для этого берут соответственно 0,033; 0,066; 0,1; 0,15; 0,2 см^3 исходного раствора, помещают в мерные колбы вместимостью 25 см^3 при помощи микробюретки и доводят до метки изопропиловым спиртом.

Срок годности растворов — не более 1 мес при хранении в холодильнике при температуре 4—10 °С.

Полученные рабочие растворы анализируют на жидкостном хроматографе «Милихром» при следующих условиях:

хроматографическая колонка 2 × 64 мм (2 × 80 мм), (2 × 120 мм);

сорбент — Силасорб C_{18}; Силасорб $SPHC_{18}$; Сепарон C_{18};

трехкомпонентный элюент на основе ацетонитрила;

объем пробы — 6 мкдм^3;

длина волны — 328 нм;

постоянная времени — 0,2 с;

скорость подачи элюента — 150 мкдм^3/мин.

Удерживаемый объем пика витамина А составляет 300—360 мкдм^3 (может меняться в зависимости от длины колонки).

Каждый раствор хроматографируют три раза. После выхода пика колонку промывают, прокачивая через нее 100—200 мкдм^3 элюента до выхода на нулевую линию.

Значение средних высот хроматографических пиков, выраженное в единицах оптической плотности (е. о. п.), откладывают по оси ординат градуировочного графика, а по оси абсцисс — значение активности витамина А в 25 см^3 раствора. Для концентраций витамина А 120—10000 и 20—120 МЕ/г градуировочные графики строят отдельно.

Градуировочный график строят также, откладывая по оси ординат средние высоты хроматографических пиков (h), выраженные в единицах длины (мм) с учетом чувствительности прибора. В этом случае содержание витамина в пробе определяют, измеряя высоту соответствующего хроматографического пика линейкой.

Пример хроматограммы представлен на черт. 1.

Построение градуировочных графиков можно заменить расчетом коэффициентов наклона (K) по формуле

$$K = \frac{\sum K_i}{n},$$

где K_i — коэффициент наклона градуировочного графика для градуировочного раствора, МЕ/е. о. п. или МЕ/мм;

n — количество точек, по которым строится градуировочная кривая.

Значение коэффициента наклона (K_i) вычисляют по формуле

$$K_i = \frac{Q_i}{h_i},$$

где Q_i — содержание витамина А в соответствующем i-м градуировочном растворе, МЕ;

h_i — высота i-го хроматографического пика, е. о. п. или мм.

2.2.7. *Проверка градуировочного графика*

Градуировочный график контролируют не реже одного раза в неделю. Для этого один-два рабочих раствора хроматографируют, как указано в п. 2.2.6.

Отклонение полученных результатов (высота пика, выраженная в е. о. п. или мм) от измеренных в момент построения градуировочного графика (а) в процентах вычисляют по формуле

$$a = \frac{h_1 - h_2}{h_1} \cdot 100,$$

где h_1 и h_2 — высота хроматографического пика, определенная при построении градуировочного графика и в момент проверки соответственно, е. о. п. или мм.

Указанное отклонение не должно превышать 5 %.

При отклонении более 5 % строят новый градуировочный график свежеприготовленных растворов масляного препарата витамина А в изопропиловом спирте.

2.3. Экстракция витамина А из премиксов

На лабораторных аналитических весах взвешивают пробу премикса с погрешностью не более 0,0005 г. Навески премиксов и объемы растворов для экстракции приведены в таблице. Навеску премикса помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 25 см^3, куда приливают раствор для экстракции в соответствии с требованиями таблицы.

Содержание витамина А в премиксе, МЕ/г	Навеска премикса, г	Объем раствора для экстракции, см^3
20—100	10	15
100—2000	5	10
2000—10000	2	10

Колбы соединяют с обратным холодильником и нагревают на водяной бане при температуре (75±1) °С в течение 10 мин. Колбу с экстрактом премикса отсоединяют от обратного холодильника, закрывают притертой пробкой, охлаждают под струей воды до комнатной температуры и фильтруют через фильтр ПОР-16 размером пор 10—16 мкм с использованием водоструйного вакуумного насоса. Фильтрат собирают в мерную колбу вместимостью 25 см^3. Коническую колбу, в которой содержался экстракт премикса, два-три раза ополаскивают порциями изопропилового спирта на 2—3 см^3 для количественного перенесения премикса на фильтр. При этом промывается и осадок на фильтре. Раствор в мерной колбе доводят до метки изопропиловым спиртом, тщательно перемешивают и хроматографируют.

2.4. Хроматографирование

Полученные экстракты хроматографируют, как описано в п. 2.2.6. Примеры хроматограмм экстрактов витамина А из премиксов представлены на черт. 2.

При возникновении сомнений в правильности выбора пика (по объему или времени удержания), соответствующего витамину А, необходимо в анализируемый экстракт внести небольшое количество одного из градуировочных растворов витамина А (соотношение экстракт : раствор витамина А = 10:2). Увеличение высоты соответствующего пика по сравнению с высотой этого пика

на хроматограмме, полученной до введения градуировочного раствора в анализируемый экстракт, свидетельствует, что этот пик соответствует витамину А.

2.5. Обработка результатов

Для определения содержания витамина А в премиксе проводят две экстракции и каждый экстракт хроматографируют три раза. Находят среднее арифметическое значение высоты пиков, выраженное либо в е. о. п., либо в миллиметрах, и по градуировочному графику определяют содержание витамина А в международных единицах.

Содержание витамина А в премиксах (X_1), МЕ/г, вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{Q}{m},$$

где Q — содержание витамина А, найденное по градуировочному графику, МЕ;

m — масса навески премикса, г.

Содержание витамина А в премиксах (X_1) при использовании коэффициента K вычисляют по формуле

$$X_1 = K \cdot \frac{h}{m}.$$

Полученное числовое значение содержания витамина А округляют до целых чисел.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, полученными в разных условиях, — 15 %.

3. Определение витамина А методом нормальной фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Сущность метода заключается в омылении образца премикса спиртовым раствором гидроокиси калия, экстракции витамина А гексаном с последующим определением витамина методом нормальной высокоэффективной жидкостной хроматографии (НФВЭЖХ). Диапазон измерений 10—10000 МЕ/г. Предельная погрешность метода — 10 %.

3.1. Аппаратура, реактивы и материалы

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

Хроматограф жидкостный с фотометрическим детектором и систематической погрешностью измерений не выше 10 % отн.: Хром 900 (ЧССР), Цвет 304 или 3006, Ликвохром (Венгрия).

Колонка хроматографическая стеклянная или металлическая высотой 150 мм и диаметром 3 мм.

Линейка измерительная металлическая по ГОСТ 427.

Скальпель.

Секундомер механический.

Испаритель ротационный ИР-1М вместимостью 2 дм^3 или его аналоги.

Баня водяная, обеспечивающая нагрев до 80—100 °С.

Холодильники стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336.

Сорбент «Сепарон-SGX» зернением 7 мкм (ЧССР).

Колбы конические со шлифом вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 25336.

Воронки делительные вместимостью 100, 500 см^3 по ГОСТ 25336.

Пипетки 1(2, 4, 5)—1(2)—1; 2(4, 5)—1(2)—2; 6(7)—1(2)—5; 6(7)—1(2)—10.

Микрошприцы МШ-50М по ТУ 2.833.104.

Колбы мерные 2—25—1(2); 2—100—1(2); 2—500—1(2) по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1(2)—10; 1(2, 3, 4)—50; 1(2, 3, 4)—100; 1(2, 3, 4)—250; 1(2, 3, 4)—1000 по ГОСТ 1770.

Пробирки с притертой пробкой 2—10—0,1 по ГОСТ 1770.

Воронки стеклянные диаметром 4—6 см по ГОСТ 25336.

Колонки стеклянные диаметром 2—4 см и высотой 80 см для очистки растворителей.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Гексан по ТУ 6—09—3375, ч.

Спирт изопропиловый по ТУ 6—09—402.

Пирогаллол А по ТУ 6—09—5319.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166.

Алюминия окись, нейтральная по ТУ 6—09—3916.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Ретинола ацетат в масле, 3,44 %-ный раствор с активностью 90000—110000 МЕ/см^3 по фармакопее.

Бумага универсальная индикаторная по ТУ 6—09—1182.

Фильтры бумажные обеззоленные (красная лента) по ТУ 6—09—1678.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

Примечание. При проведении испытаний допускается использовать импортные аппаратуру, материалы и реактивы с характеристиками не ниже отечественных аналогов.

3.2. Подготовка к испытанию

3.2.1. Определение активности витамина А в масляном препарате — по п. 2.2.5.

3.2.2. *Приготовление стандартного раствора витамина А*

Для приготовления стандартного раствора взвешивают навеску масляного препарата витамина А (3,44 %-ный раствор), необходимую для получения 25 см^3 раствора с активностью 10000 МЕ. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3, растворяют в изопропиловом спирте, перемешивают и доводят этим спиртом до метки.

Хранят в холодильнике и используют в течение недели.

3.2.3. *Подготовка растворителей*

Очистку растворителей, применяемых в хроматографии, проводят посредством перегонки, отбрасывая первую и последнюю фракции в количестве $^1/_{10}$ от первоначального объема, или пропусканием через колонку, заполненную активированной окисью алюминия. Окись алюминия активируют при нагревании в течение 1 ч при температуре 400—450 °С. Колонку высотой 60—80 см и диаметром 2—4 см заполняют 80 г активированной окиси алюминия и пропускают через нее 700 см^3 растворителя. Для проверки чистоты в колонку жидкостного хроматографа загружают 50 мкл растворителя. В случае его загрязнения на хроматограмме появляются пики, соответствующие времени удерживания витамина А.

3.2.4. *Приготовление спиртового раствора гидроокиси калия с массовой долей 10 %*

Растворяют 20 г гидроокиси калия в 180 см^3 этилового спирта. Раствор готовят непосредственно перед испытанием.

3.2.5. *Подготовка жидкостного хроматографа к работе*

Подготовка хроматографа и колонки к работе проводится согласно описанию, данному в инструкции к прибору. Элюент представляет собой смесь гексана с этанолом в объемном соотношении 99,5:0,5. Применяют стеклянную колонку высотой 150 мм и диаметром 3 мм, заполненную сорбентом «Сепарон-SGX» с зернением 7 мкм. Скорость элюирования 1,4—1,6 см^3/мин при комнатной температуре. Фотометрический детектор с длиной волны пропускаемого света 254 нм. Перед началом измерений хроматограф прогревают 15 мин и параллельно колонку промывают элюентом до установления постоянства нулевой линии и времени удерживания витамина А, проверяемого по стандартному раствору.

При использовании хроматографов других марок подбирают оптимальные условия для хроматографирования (объем пробы, скорость элюирования).

3.3. Проведение испытания

В коническую колбу вместимостью 250 см^3, снабженную обратным холодильником, помещают 5—10 г премикса (в зависимости от рецепта премикса), добавляют 50 см^3 10 %-ного спиртового раствора гидроокиси калия, на конце скальпеля-пирогаллол, помещают на водяную баню и омыляют при температуре 80—85 °С в течение 30 мин. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, добавляют 50 см^3 дистиллированной воды и 50 см^3 гексана, дают отстояться и осторожно сливают верхний гексановый слой в делительную воронку. Экстракцию раствора в колбе повторяют дважды порциями по 40 см^3 гексана, последнюю фракцию фильтруют через воронку с марлевым слоем. Объединенные гексановые вытяжки промывают в

делительной воронке дистиллированной воды до нейтральной среды (по универсальному индикатору). Промытый экстракт переносят в перегонную колбу через беззольный фильтр (красная лента), заполненный безводным сульфатом натрия (40—50 г). Делительную воронку и сульфат натрия на фильтре промывают два раза порциями по 20 см^3 гексана. Гексан из колбы отгоняют на ротационном испарителе при температуре 70 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см^3 гексана, который добавляют порциями по 2—3 см^3, и переносят в предварительно откалиброванную пробирку вместимостью 10 см^3 с притертой пробкой.

Стандартный раствор витамина А обрабатывают параллельно. Отбирают 1 см^3 стандартного раствора, выполняют омыление и экстрагируют, как при обработке образцов. Полученный экстракт витамина А в 10 см^3 гексана используют для хроматографического анализа в качестве внешнего стандарта. Измерение проводят в нормально-фазном режиме.

Растворы экстрактов анализируемого образца и стандартного раствора хроматографируют в одинаковых условиях. С помощью микрошприца в колонку вводят испытуемые растворы (экстракт стандарта или анализируемого образца). При низком содержании витамина А в премиксе загрузку растворов в колонку увеличивают. Получают хроматограммы, аналогичные приведенным на черт. 3. Измеряют высоты пиков, соответствующих времени удержания витамина А, как расстояния от вершины пиков до линии, проведенной в основании пика. Эти значения используют в дальнейшем для расчета содержания витамина А в испытуемом образце. Наиболее благоприятные условия для определения создаются, когда высоты пиков стандарта и определяемого вещества на хроматограмме соизмеримы. Эти условия могут быть созданы изменением концентрации стандартного раствора или объемов загрузки в хроматограф экстрактов стандарта и премикса.

3.4. Обработка результатов

Содержание витамина $A(X_2)$, МЕ/г, вычисляют по высотам пиков хроматограмм экстрактов стандартного раствора и испытуемых образцов по формуле

$$X_2 = \frac{Q_A \cdot V_a}{V_к} \cdot \frac{1}{m} \cdot \frac{V_{ст}}{V_х} \cdot \frac{h_х}{h_{ст}},$$

где Q_A — количество витамина А, используемое для приготовления стандартного раствора, МЕ;

V_a — аликвота стандартного раствора, используемая на омыление, см^3;

$V_к$ — объем мерной колбы со стандартным раствором витамина А, см^3;

m — масса навески премикса, используемая на омыление, г;

$V_{ст}$, $V_х$ — объемы загрузки в хроматограф пробы стандарта и премикса, мкдм^3;

$h_х$, $h_{ст}$ — высоты пиков премикса и стандарта на хроматограмме, мм.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных измерений. Результаты вычисляют до четвертой значащей цифры и округляют до третьей значащей цифры.

Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ не должны превышать 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, полученными в разных условиях, — 15 %.

4. Колориметрический метод определения витамина А

Сущность метода заключается в омылении пробы премикса спиртовым раствором щелочи, экстракции неомыленной фракции этиловым эфиром и колориметрическом измерении оптической плотности испытуемого раствора с треххлористой сурьмой.

Метод применяют для определения витамина А в премиксах, не содержащих кормовой концентрат лизина.

4.1. Аппаратура, реактивы и материалы

Фотоэлектроколориметр марки КФК-2 или других аналогичных марок со спектральным диапазоном работы 315—980 нм.

Спектрофотометр со спектральным диапазоном работы 186—1100 нм.

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

Шкаф сушильный с терморегулятором, обеспечивающий постоянство температуры (110±2) °С.

Испаритель ротационный по ГОСТ 15150 или аналогичный.

Баня водяная.

Скальпель.

Воронки делительные вместимостью 250, 500 см³ по ГОСТ 25336.

Колбы конические со шлифом вместимостью 250 и 100 см³ по ГОСТ 25336.

Холодильник обратный по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 1(2)—50—1(2) и 1(2)—100—1(2) по ГОСТ 1770.

Пипетки 1(2, 4, 5)—1(2)—1; 2(4, 5)—1(2)—2; 2(6, 7)—1(2)—5; 2(6, 7)—1(2)—10.

Цилиндры 1(2, 3, 4)—25; 1(2, 3, 4)—50; 1(2, 3, 4)—100; 1(2, 3, 4)—500 по ГОСТ 1770.

Склянки с притертой пробкой.

Эксикатор по ГОСТ 25336.

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

Насос водоструйный по ГОСТ 25336.

Ретинола ацетат в масле, 3,44 %-ный раствор с активностью 90000—110000 МЕ/см³ по фармакопее.

Ангидрид уксусный по ГОСТ 5815.

Эфир этиловый по фармакопее.

Хлороформ по ГОСТ 20015 или ГФХ.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363 или натрия гидроокись по ГОСТ 4328, растворы с массовой долей 50 %.

Калий йодистый по ГОСТ 4232, раствор с массовой долей 10 %.

Калий марганцевокислый по ГОСТ 20490, раствор с массовой долей 4 %.

Кислота серная по ГОСТ 4204.

Кислота соляная по ГОСТ 3118.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166.

Пирогаллол А по ТУ 6—09—5319.

Сурьма треххлористая.

Спирт этиловый абсолютированный по ТУ 84—11—99.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300 или по ГОСТ 5962.

Уголь активный по ГОСТ 6217.

Кальция окись по ГОСТ 8677.

Фенолфталеин.

Крахмал.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Фильтры бумажные.

Примечание. При проведении испытаний допускается использовать импортные аппаратуру, материалы и реактивы с характеристиками не ниже отечественных аналогов.

4.2. Подготовка к испытанию

4.2.1. *Приготовление безводного сернокислого натрия*

Реактив высушивают в сушильном шкафу при температуре 105—110 °С в течение 3 ч.

4.2.2. *Проверка этилового эфира на содержание перекисей*

20 см³ этилового эфира взбалтывают с 2 см³ бесцветного раствора йодистого калия с массовой долей 10 % в цилиндре с притертой пробкой вместимостью 25 см³ и оставляют на 1 ч в темном месте. Не должно быть пожелтения ни эфирного, ни водного слоев. Водный слой сравнивают с исходным раствором йодистого калия. Пожелтение раствора указывает на присутствие перекисей, от которых его очищают следующим образом.

В склянку с притертой пробкой помещают 500 см³ эфира, 50 см³ раствора марганцевокислого калия с массовой долей 4 %, 4 см³ раствора гидроокиси натрия или гидроокиси калия с массовой долей 50 %, взбалтывают и оставляют в темноте на 1 сут. Затем смесь переносят в делительную воронку и эфир промывают пять-шесть раз водой в соотношении 2:1, высушивают путем фильтрования через прокаленный безводный сернокислый натрий и перегоняют. Очищенный от перекисей эфир хранят в холодильнике.

4.2.3. *Проверка хлороформа на присутствие свободного хлора и его очистка*

10 см³ хлороформа взбалтывают в делительной воронке с 40 см³ воды, затем водный слой отделяют. К 10 см³ водного слоя добавляют 0,5 см³ раствора йодистого калия с массовой долей 10 % и 0,5 см³ раствора крахмала с массовой долей 1 %. В присутствии свободного хлора водный слой окрашивается в синий цвет. В этом случае хлороформ промывают водой (на две части хлороформа берут одну часть воды). Взбалтывают, дают жидкости расслоиться и нижний слой — хлороформ сливают в склянку, а верхний — воду отбрасывают. Промывают хлороформ пять-шесть раз, затем

для обезвоживания добавляют в него безводный сернокислый натрий и ставят в темное место на 30 мин. После этого хлороформ отгоняют и хранят в темной склянке в прохладном месте.

4.2.4. *Приготовление раствора треххлористой сурьмы*

Для приготовления раствора треххлористой сурьмы в хлороформе берут на каждые 100 см³ хлороформа 23 г треххлористой сурьмы, растворяют при нагревании на водяной бане при температуре около 40 °С и оставляют в темном месте на 7 сут для выделения примесей и воды. Прозрачный раствор сливают в темную склянку, фильтруя через фильтр с безводным сульфатом натрия, добавляют в него 2 % уксусного ангидрида (по объему), закрывают притертой пробкой и хранят в прохладном месте. При появлении в процессе хранения мутного осадка раствор использованию не подлежит.

4.2.5. Определение активности витамина А в масляном препарате — по п. 2.2.5.

4.2.6. *Построение градуировочного графика*

Точную навеску масляного препарата, содержащего около 100 тыс. МЕ витамина А — ретинола ацетата, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и растворяют в хлороформе. Получают основной раствор с активностью 1000 МЕ витамина А в 1 см³.

Из полученного основного раствора готовят рабочие растворы, содержащие 5, 10, 15, 20, 25, 30 МЕ витамина А в 1 см³. Для этого соответственно 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 см³ основного раствора помещают в мерные колбы вместимостью 100 см³ и объем в колбах доводят хлороформом до метки.

Из каждого рабочего раствора отбирают в кювету с толщиной слоя 1 см³ фотоэлектроколориметра 0,4 см³ и вносят в нее 4 см³ раствора треххлористой сурьмы.

Интенсивность образовавшейся окраски определяют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре и длине волны 590 нм не позднее 5 с после внесения раствора треххлористой сурьмы.

По полученным данным строят градуировочный график.

При смене реактивов, особенно раствора треххлористой сурьмы в хлороформе, градуировочный график строят вновь.

Отмывку кювет после треххлористой сурьмы проводят водным раствором соляной кислоты (1:1) с последующим неоднократным ополаскиванием водой. Растворы витамина А готовят в день построения градуировочного графика.

4.3. Проведение испытания

Навеску премикса массой 2—5 г помещают в колбу вместимостью 200—250 см³, снабженную обратным холодильником, приливают 50 см³ 96 %-ного этилового спирта, добавляют 40—50 мг пирогаллола (на кончике скальпеля) и ставят в кипящую баню для омыления. В момент начала кипения прибавляют 5 см³ раствора гидроокиси калия или натрия с массовой долей 50 %.

Омыление проводят в течение 30 мин с момента начала кипения, периодически взбалтывая, по истечении этого времени содержимое колбы быстро охлаждают под струей воды до комнатной температуры.

Для экстракции витамина А в колбу добавляют 50 см³ эфира, хорошо взбалтывают и содержимое колбы переносят в делительную воронку вместимостью 500 см³, в которую предварительно вносят около 50 см³ дистиллированной воды. Экстракцию витамина А эфиром проводят трехкратно порциями по 30—50 см³.

Все эфирные вытяжки собирают в делительную воронку и промывают дистиллированной водой до исчезновения щелочной реакции промывных вод (проба с фенолфталеином).

Затем эфирную вытяжку обезвоживают путем пропускания через бумажный фильтр, на который помещен безводный сернокислый натрий. Последний промывают несколькими порциями эфира, который фильтруют в ту же колбу.

Эфир отгоняют досуха на водяной бане при температуре не выше 50 °С в токе азота или под вакуумом, используя водоструйный насос или ротационный испаритель. Сухой остаток сразу же растворяют в хлороформе, переносят в мерную колбу вместимостью 50—100 см³ (в зависимости от содержания витамина А в рецепте премикса) и объем доводят до метки хлороформом. Допускается проводить омыление и экстрагирование, как указано в п. 3.3.

Далее проводят цветную реакцию с раствором треххлористой сурьмы, как описано при построении градуировочного графика. Интенсивность окраски устанавливают на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром (длина волны 590 нм) относительно хлороформа в кювете с толщиной слоя 1 см.

4.4. Обработка результатов

Содержание витамина А (X_3), в миллионах МЕ на тонну премикса, вычисляют по формуле

$$X_3 = \frac{q \cdot V}{m},$$

где q — содержание витамина А, найденное по градуировочному графику, МЕ/см^3;

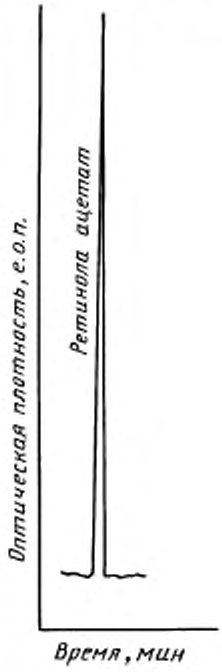
V — объем разведения, см^3;

m — масса навески премикса, г.

При необходимости (в зависимости от содержания витамина А в рецепте премикса) делают дополнительное разведение, которое учитывают в формуле.

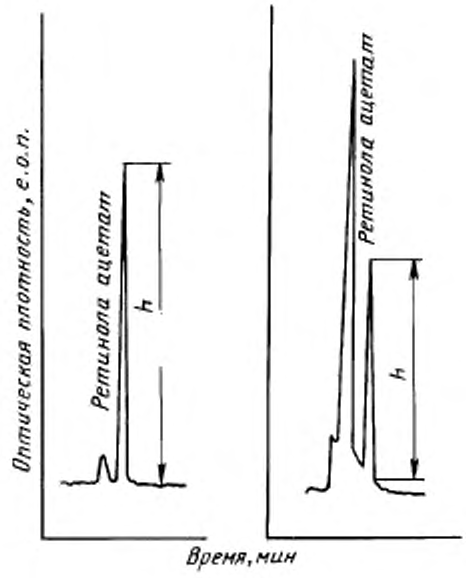
За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 15 % относительно среднего арифметического значения.

Хроматограмма раствора витамина А (ретинола ацетат) в изопропиловом спирте



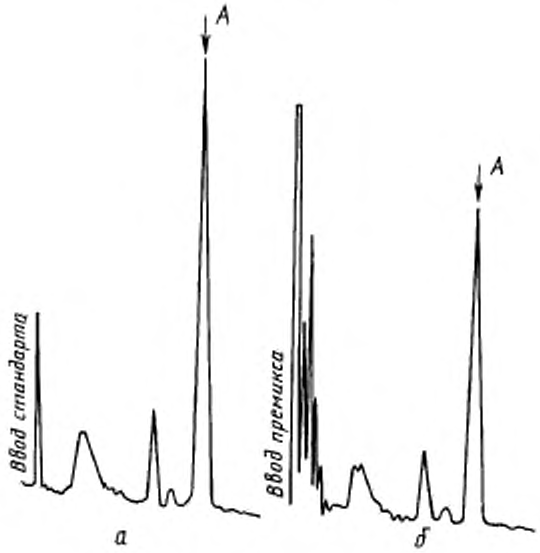
Черт. 1

Хроматограммы экстрактов витамина А (ретинола ацетат) из премиксов



Черт. 2

Хроматограммы экстрактов



а — стандартный раствор витамина А; *б* — премикс

Черт. 3

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта
ГОСТ 427—75	3.1
ГОСТ 1770—74	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 3118—77	4.1
ГОСТ 4166—76	3.1; 4.1
ГОСТ 4204—77	4.1
ГОСТ 4232—74	4.1
ГОСТ 4328—77	4.1
ГОСТ 5815—77	4.1
ГОСТ 5962—67	3.1; 4.1
ГОСТ 6217—74	4.1
ГОСТ 6709—72	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 8677—76	4.1
ГОСТ 9412—93	3.1
ГОСТ 13496.0—80	2
ГОСТ 15150—69	4.1
ГОСТ 18300—87	2.1; 4.1
ГОСТ 20015—88	4.1
ГОСТ 20490—75	4.1
ГОСТ 24104—88	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 24363—80	3.1; 4.1
ГОСТ 25336—82	2.1; 3.1; 4.1
ТУ 2.833.104—85	3.1
ТУ 6—09—402—87	2.1; 3.1
ТУ 6—09—1182—76	3.1
ТУ 6—09—1678—86	3.1
ТУ 6—09—3375—78	3.1
ТУ 6—09—3916—85	3.1
ТУ 6—09—5319—86	3.1; 4.1
ТУ 6—09—06—1092—83	2.1
ТУ 25—05.2830—83	2.1
ТУ 84—11—99—89	2.1; 4.1
МРТУ 6—09—6628—70	2.1

gost.e-ecolog.ru