ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ EN 12823-2-2012

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Часть 2

Определение содержания β-каротина

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Вызначэнне змяшчэння вітаміну А метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі

Частка 2

Вызначэнне змяшчэння β-караціну

(EN 12823-2:2000, IDT)

Издание официальное

БЗ 9-2011



Госстандарт

Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 664:543.544.5.068.7:543.645.5(083.74)(476) МКС 13.060.50 КП 06 IDT

Ключевые слова: витамин А, β-каротин, α-каротин, высокоэффективная жидкостная хроматография, отбор проб, антиоксиданты

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

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

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 28 мая 2012 г. № 26

3 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 12823-2:2000 Foodstuffs – Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography – Part 2: Measurement of β-carotene (Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Часть 2. Определение содержания β-каротина).

Европейский стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт и европейских стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на европейские стандарты актуализированы.

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным европейским стандартам приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2012

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

Введение IV
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы 1
5 Аппаратура и приборы 3
6 Отбор проб 3
7 Проведение испытания 3
8 Расчет 5
9 Прецизионность 5
10 Протокол испытаний 6
Приложение А (справочное) Пример хроматограммы и высокоэффективной жидкостной хроматографической системы 7
Приложение В (справочное) Данные прецизионности 8
Приложение С (справочное) Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии 10
Библиография 11
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным европейским стандартам 12

Введение

Международный стандарт «Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» состоит из двух частей:

Часть 1: Измерение содержания полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола.

Часть 2: Измерение β-каротина.

Настоящий стандарт предназначен для измерения каротиноидов (α-каротина, β-каротина и ликопина) в пищевых продуктах, ссылки приведены на литературу для расчета и выражения β-каротина в качестве эквивалента витамина А [1], [2].

Содержание витамина А можно рассчитать при соблюдении определенных факторов, зная содержание β-каротина.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
Часть 2
Определение содержания β-каротина

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Вызначэнне змяшчэння вітаміну А метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі
Частка 2
Вызначэнне змяшчэння β-караціну

Foodstuffs
Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography
Part 2
Measurement of β-carotene

Дата введения 2013-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения общего β-каротина в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения).

EN ISO 3696:1995 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний

EN ISO 5555:2001 Масла и жиры животные и растительные. Отбор проб

EN 12823-1:2000 Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Часть 1. Измерение количества полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола.

3 Сущность метода

Сумму изомеров β-каротина определяют в растворе пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием в установленном диапазоне измерений. Для количественного определения может использоваться экстракт, полученный после омыления пробы согласно EN 12823-1. Идентификацию изомеров β-каротина проводят по времени удерживания, количественно определяют методом внешнего стандарта по площадям или высотам пиков [3] – [7].

Для подготовки пробы могут использоваться другие стандартные методы, прошедшие подтверждение характеристик с помощью внутреннего стандарта.

4 Реактивы

В ходе анализа, если не указано иное, используют только реактивы признанной аналитической чистоты и воду, не ниже 1-й степени чистоты в соответствии с EN ISO 3696.

4.1 Метанол.

4.2 Этанол абсолютный, объемная доля φ (C_2H_5OH) = 100 %.

4.3 Этанол, φ (C_2H_5OH) = 96 %.

Издание официальное

4.4 Сульфат натрия безводный.

4.5 Раствор гидроокиси калия (КОН) для омыления в соответствующих массовых концентрациях, например ρ (КОН) = 50 г/100 мл или 60 г/100 мл, или спиртовые растворы, например 28 г КОН в 100 мл смеси этанола/воды (9 +1) (V + V).

4.6 Антиоксиданты: аскорбиновая кислота (АК), аскорбат натрия, сульфид натрия (Na_2S), бутилгидрокситолуол (ВНТ), пирогаллол или гидрохинон.

4.7 Растворители и их смеси для экстракции: диэтиловый эфир (пероксид-чистый), ди-изопропил, петролейный эфир (с диапазоном кипения 40°С – 60 °С), *n*-гексан, дихлорметан, тетрагидрофуран, толуол или соответствующие их смеси.

4.8 Раствор ацетата аммония в метаноле ($CH_3CO_2NH_4$) = 0,05 моль/л.

4.9 Триэтиламин.

4.10 Подвижная фаза ВЭЖХ, ацетонитрил (4.7): метанольный раствор ацетата аммония (4.8) + дихлорметан (4.7) (75 + 20 + 5) (части объема), содержащий 0,1 % по массе бутилгидрокситолуола (4.6) и 0,05 % по массе триэтиламина (4.9). Для ознакомления с подвижными фазами альтернативных ВЭЖХ-систем см. приложение С.

4.11 Стандартные вещества

4.11.1 Общие положения

β-каротин и α-каротин могут быть получены от различных поставщиков, например Sigma [1)]. Чистота стандартных растворов может варьироваться от 90 % до 100 %. Поэтому необходимо определить концентрацию градуировочного раствора спектрометрически [см. концентрацию и контроль чистоты (4.12.2)].

4.11.2 β-каротин, М ($C_{40}H_{56}$) = 536,85 г/моль, с минимальной массовой долей 95 %.

4.11.3 α-каротин, М ($C_{40}H_{56}$) = 536,85 г/моль, для качественного определения.

4.11.4 Ликопин, М ($C_{40}H_{56}$) = 536,85 г/моль, для качественного определения.

4.12 Основные стандартные растворы

4.12.1 Исходный раствор β-каротина

В мерную колбу вместимостью 100 мл взвешивают 3 мг стандартного вещества β-каротина (4.11.2), растворяют в 20 мл дихлорметана, тетрагидрофурана или толуола (4.7). Помещают мерную колбу примерно на 30 с в ультразвуковую ванну (5.6). Разбавляют полученный раствор *n*-гексаном до объема 100 мл. Затем 10,0 мл полученного раствора разбавляют *n*-гексаном до 100 мл.

1 мл полученного стандартного раствора содержит около 3 мг каротина в *n*-гексане/дихлорметане (98 + 2) (V/V), *n*-гексане/тетрагидрофуране (98 + 2) (V/V) или *n*-гексане/толуоле (98 + 2) (V/V).

Хранят исходный раствор в месте, защищенном от света, при температуре менее чем 4 °С.

4.12.2 Концентрация и контроль чистоты

Измеряют оптическую плотность исходного раствора β-каротина (4.12.1) при максимальной длине волны около 453 нм с использованием спектрометра (5.1). Рассчитывают массовую концентрацию ρ, мкг/мл, по формуле

$$\rho = \frac{Б_{453} \cdot 10^4}{2592}, \qquad (1)$$

где A_{453} – значение поглощения исходного раствора при максимальной длине волны около 453 мм;

2592 – значение $E^{1\%}_{1см}$ β-каротина в *n*-гексане. Может значительно изменяться в зависимости от используемого растворителя [8].

Соотношение A_{455}/A_{340} должно быть больше 15, а соотношение A_{455}/A_{483} должно быть в диапазоне от 1,14 до 1,18 для полного переноса β-каротина [8].

4.12.3 Стандартный раствор β-каротина

Пипеткой отбирают 20 мл основного раствора β-каротина (4.12.1), помещают в круглодонную колбу и отгоняют растворитель при пониженном давлении (5.2) при температуре не более чем 50 °С. Растворяют остаток в 20 мл растворителя, совместимого с обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Стандартный раствор годен в течение 7 сут при хранении в защищенном от света месте при температуре ниже 4 °С.

[1)] Эта информация дана для удобства пользователей данного стандартного метода и не представляет рекламу CEN названного поставщика. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если они могут привести к тем же результатам.

4.12.4 Стандартные растворы α-каротина и ликопина [2)]

Для качественных целей предварительно растворяют около 0,3 мг α-каротина (4.11.3) или ликопина (4.11.4) примерно в 10 мл тетрагидрофурана (4.7) и разводят до объема 100 мл этанолом (4.3) или другим растворителем, совместимым с системой ВЭЖХ.

Стандартный раствор годен в течение 7 сут при хранении в защищенном от света месте при температуре ниже 4 °С.

5 Аппаратура и приборы

Используют стандартное лабораторное оборудование и следующеее:

5.1 Ультрафиолетовый UV-VIS спектрометр (UV-VIS) с кварцевой кюветой на 1 см, способный измерять абсорбцию при определенной длине волны.

5.2 Ротационный вакуумный испаритель с водяной баней и вакуумной камерой.

Примечание – Для заполнения вакуума рекомендуется использовать азот.

5.3 Система ВЭЖХ, состоящая из насоса, представляющего собой устройство для ввода пробы, детектора UV-VIS и системы обработки данных, например интегратор или записывающее устройство.

5.4 Колонка для ВЭЖХ

Аналитическая колонка обратной фазы, C_{18} (размер частиц – 5 мкм, диаметр 4,0 – 4,6 мм, длина колонки – 250 мм).

Могут быть использованы и другие типы колонки и размеры частиц, кроме указанных в настоящем стандарте. Чтобы гарантировать эквивалентные результаты, для таких материалов допускается адаптировать условия хроматографии.

Критерием эффективности для соответствующих аналитических колонок является степень разделения для всех транс-α-каротинов и для всех транс-β-каротинов, которая должна быть выше чем 1.

Подходящими сорбентами для RP колонки являются, например, VydacB® 201TP54 [3)], VydacB® 218TP54 [3)], Eurospher 100-C_{18} [3)], UltraspherB® ODS [3)], SpherisorbB® ODS2 [3)], ZorbaxB® ODS [3)] и LiChrospherB® RP-18 [3)]. Колонки также могут быть использованы в комплекте. Кроме того, целесообразно использовать предколонки, чтобы увеличить долговечность аналитической колонки.

5.5 Устройство для фильтрования

Устройство для фильтрования жидкостей под вакуумом с платформой для фильтра; мембранные фильтры, диаметр пор 0,45 мкм.

Примечание – Для увеличения долговечности колонок подвижные фазы, а также раствор анализируемой пробы перед использованием или вводом можно фильтровать через мембранный фильтр.

5.6 Ультразвуковая ванна

5.7 Фильтры разделения фаз (необязательные)

6 Отбор проб

Отбор проб – по СТБ ISO 5555, если подходит.

7 Проведение испытания

7.1 Приготовление пробы

Пробу гомогенизируют. Твердую пробу измельчают на соответствующей мельнице и тщательно перемешивают. Предусматривают предварительное охлаждение пробы в случае, когда проба подвергалась воздействию высокой температуры в течение длительного периода времени. β-каротин чувствителен к UV-излучению и свету.

[2)] Стандартные растворы α-каротина и ликопина не являются необходимыми для количественной оценки β-каротина в стандартном экстракте, но помогают четко определить различные соединения.

[3)] VydacB® 201TP54, Vydac® 218TP54, Eurospher® 100-C_{18}, Ultrasphere® ODS, Spherisorb® ODS2, Zorbax® ODS и LiChrospher® RP18 являются доступными для пользователя. Эта информация приведена для удобства пользователя настоящего стандартизованного метода и не содержит рекламы CEN указанных сорбентов.

7.2 Приготовление образца контрольного раствора

7.2.1 Омыление

Омыление от 2 г до 10 г пробы предпочтительно проводить в атмосфере азота, используя соответствующее количество этанола (4.3) или метанола (4.1), воды, антиоксидант (4.6) и один из растворов гидроокиси калия (4.5). Можно также добавить сульфид натрия для предотвращения окислительных каталитических эффектов следов металлов.

Примеры соответствующих соотношений реагентов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Масса образца, г	Спирт	Антиоксидант	Гидроксид калия
2 – 5	50 мл метанола	0,25 г АК	5 мл раствора 50 г/100 мл
5 – 10	100 мл этанола	1 г АК + 0,04 г Na_2S	20 мл раствора 60 г/100 мл
10	150 мл этанола	1 г АК	50 мл раствора 60 г/100 мл

Обычно продолжительность омыления составляет в пределах от 30 до 45 мин при температуре нагревания от 80 °С до 100 °С.

Если после омыления и охлаждения на поверхности пробы присутствует жир или масло, добавляют дополнительное количество этанолового раствора гидроксида калия и этап омыления продлевают.

Примечание – Из обезжиренных образцов, таких как фрукты или овощи, можно получить вытяжку, используя непосредственно подходящий растворитель, с помощью соответствующего метода (например, как описано в [9] – [11]). Однако рекомендуется, чтобы хроматографическое разделение выполнялось согласно вышеописанным требованиям (проблема вмешательства).

7.2.2 Экстрагирование

Во избежание образования эмульсии количество воды, которое добавляют в омыленный раствор пробы, должно быть таким, чтобы соотношение спирта к воде в конечном растворе было 1 : 1.

Экстрагируют β-каротин из омыляемого раствора образца с помощью подходящего растворителя или смеси растворителей (4.7). Повторяют экстракцию 3 – 4 раза, используя растворители объемом от 50 до 150 мл. Промывают комбинированный экстракт до нейтрального значения pH водой (обычно 2 – 4 раза объемом от 50 до 150 мл).

7.2.3 Концентрирование

Экстракт отгоняют на ротационном испарителе (5.2) при использовании вакуума при температуре не более 50 °С.

Для удаления следов воды к экстракту пробы добавляют сульфат натрия безводный (4.4) или используют азеотропную перегонку с абсолютным этанолом (4.2) или бутилгидрокситолуолом (4.6). Могут применяться для удаления следов воды другие эквивалентные методы, такие как фазовое разделение фильтровальной бумагой (5.5), при условии, что они не повлияют на результаты.

7.2.4 Разведение

Повторно растворяют остаток в той же смеси растворителей, с использованием которой были приготовлены стандартные растворы (4.12.3 – 4.12.4), предпочтительно в смеси растворителей подвижной фазы или другом растворителе ВЭЖХ, совместимом со способом получения β-каротина концентрацией до 5 мкм/мл. Это раствор анализируемой пробы.

7.3 Идентификация

Идентифицируют β-каротин, сравнивая время удерживания отдельных пиков на хроматограммах анализируемого раствора пробы со временем удерживания стандартных растворов при одинаковых условиях, полученных с раствором пробы (7.2.4) и стандартными растворами (4.12.3 – 4.12.4). Также можно идентифицировать пики, добавляя небольшое количество соответствующего стандартного раствора в раствор пробы.

Примечание – Разделение и количественное определение будет достаточным, если будут выполняться следующие хроматографические условия (см. рисунок А.1).

Стационарная фаза: SpherisorbB® [4] ODS2, 5 мкм, патрон 100 × 4,6 мм в сочетании с VydacB® [4] 201TP54, 5 мкм, 250 × 4,6 мм.

Подвижная фаза ВЭЖХ: ацетонитрил + метанольный раствор ацетата аммония + дихлорметан (75 + 20 + 5) (части объема), содержащий 0,1 % по массе бутилгидрокситолуола и 0,05 % по массе триэтиламина.

Поток: 1,5 мл/мин.

Объем ввода: 50 мкл.

Спектрометрическое детектирование: длина волны поглощения 450 нм.

7.4 Определение

Вводят соответствующий объем (например, 20 мл) стандартного раствора (4.12.3) и раствора пробы (7.2.4) в систему ВЭЖХ (5.3). Проводят количественное определение методом внешнего стандарта, интегрируя площади пиков или определяя высоту пиков, полученную от стандартных растворов пробы, и сравнивая результаты с соответствующими значениями стандартных веществ, имеющих такое же время удерживания, или строя калибровочную кривую.

Вводят равные объемы раствора пробы и стандартных растворов (4.12.3 – 4.12.4) или компенсируют с соответствующим фактором в вычислениях результатов. Проверяют линейность калибровочной кривой. Проверяют линейность калибровочной функции с использованием как минимум трех уровней разведения исходного раствора β-каротина (4.12.1).

7.5 Количество определений

Выполняют не менее двух независимых определений.

8 Расчет

Вычисления основывают или на определении по калибровочному графику в линейной области, или по следующей упрощенной процедуре.

Рассчитывают массовую концентрацию общего β-каротина ρ, мг/100 г пробы, по формуле

$$\rho = \frac{A_S \cdot c \cdot V_S \cdot V_{St}}{A_{St} \cdot m \cdot V_{IS} \cdot 1000} \cdot 100, \qquad (2)$$

где A_S – площади пиков или высоты пиков для изомеров β-каротина, полученные из раствора пробы (7.2.4), в единицах площади или высоты;

C – откорректированая концентрация (4.12.2) β-каротина в стандартном растворе, мкг/мл;

V_S – общий объем раствора пробы (7.2.4), мл;

V_{St} – объем введенного стандартного раствора, мкл;

A_{St} – площадь пика или высота пика для β-каротина, полученные из стандартного раствора пробы (4.12.3), в единицах площади или высоты;

m – масса пробы, г;

V_{IS} – объем вводимого раствора пробы, мкл;

1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы;

100 – коэффициент пересчета содержимого на 100 г.

9 Прецизионность

Данные межлабораторных испытаний на прецизионность метода указаны в приложении В. Данные, полученные в результате этих испытаниях, не могут быть применены для других диапазонов концентраций и проб, не указанных в приложении В.

---

[4] Spherisorb® является продуктом, поставляемым Phase Separations Inc; Vydac® является продуктом, поставляемым The Separations Group. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанного продукта. Могут использоваться эквивалентные продукты, если они приведут к аналогичным результатам.

9.1 Сходимость

Абсолютная разница между независимыми результатами анализа, полученными на идентичном испытательном материале одним и тем же оператором, который использует то же оборудование в пределах короткого промежутка времени, не должны превышать предел повторяемости *r* более чем в 5 % случаев.

Значениями для общего β-каротина являются:

Маргарин	$\bar{x}$ = 0,253 мг/100 г	*r* = 0,032 мг/100 г
Витаминизированный напиток	$\bar{x}$ = 2,248 мг/100 г	*r* = 0,19 мг/100 г
Порошок для пудинга	$\bar{x}$ = 1,531 мг/100 г	*r* = 0,24 мг/100 г
Овощная смесь	$\bar{x}$ = 18,05 мг/100 г	*r* = 2,0 мг/100 г

9.2 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя результатами анализа идентичного испытательного материала двух лабораторий не должна превышать предел воспроизводимости *R* более чем в 5 % случаев.

Значениями для общего β-каротина являются:

Маргарин	$\bar{x}$ = 0,253 мг/100 г	*R* = 0,069 мг/100 г
Витаминизированный напиток	$\bar{x}$ = 2,248 мг/100 г	*R* = 0,41 мг/100 г
Порошок для пудинга	$\bar{x}$ = 1,531 мг/100 г	*R* = 0,40 мг/100 г
Овощная смесь	$\bar{x}$ = 18,05 мг/100 г	*R* = 7,6 мг/100 г

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен как минимум содержать следующие данные:

– всю информацию, необходимую для идентификации образца;

– ссылку на настоящий стандарт или на другой используемый метод;

– результаты и единицы, в которых выражены результаты;

– дату и метод отбора проб (если известно);

– дату получения;

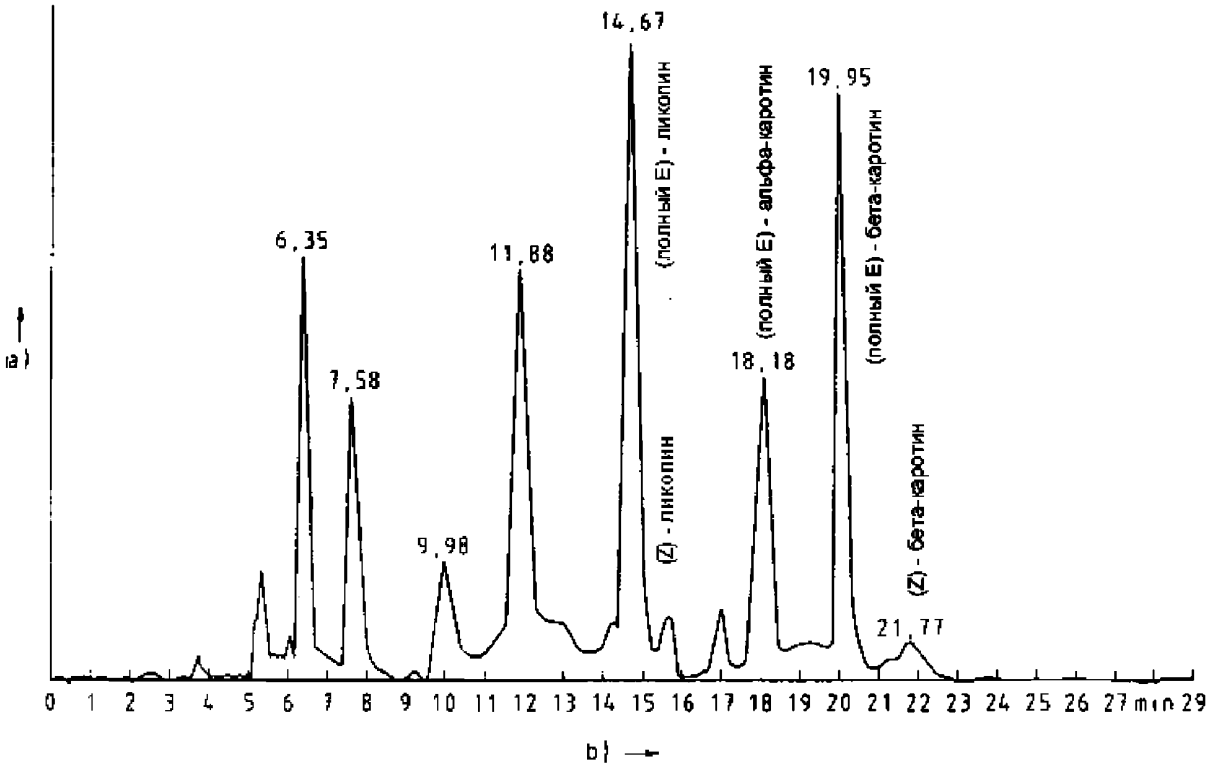
– дату исследования;

– любые особенности, которые наблюдались на протяжении исследования;

– все операционные особенности, не указанные в настоящем стандарте или указанные как дополнительные, вместе с другими деталями, которые могли повлиять на результаты.

Приложение А
(справочное)

Пример хроматограммы высокоэффективной жидкостной хроматографической системы



a) – поглощение;
b) – время

Стационарная фаза:	SpherisorbB ® [5] ODS2, 5 мкм, патрон 100 × 4,6 мм в сочетании с VydacB® [4] 201TP54, 5 мкм, 250 × 4,6 мм
Подвижная фаза:	Ацетонитрил + метанольный раствор ацетата аммония + дихлорметан (75 + 20 + 5) (объемные части), содержащий 0,1 % по массе бутилгидрокситолуола и 0,05 % по массе триэтиламина
Поток:	1,5 мл/мин
Объем впрыска:	50 мм^3
Детектирование:	450 нм

Рисунок А.1 – Пример по разделению ВЭЖХ α- и β-каротина и ликопина в смешанном растительном образце

[5] Spherisorb® является продуктом, поставляемым Phase Separations Inc; Vydac® является продуктом, поставляемым The Separations Group. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не представляет собой рекламу CEN указанных продуктов. Могут использоваться эквивалентные продукты, если они приведут к аналогичным результатам.

Приложение В
(справочное)

Данные прецизионности

Статистические результаты и данные прецизионности, приведенные в таблице В.1 для определения общего β-каротина, были установлены посредством межлабораторных испытаний в соответствии с ISO 5725-2:1994 [12], организованных W. Schuep и J. Schierle [11].

Таблица В.1

Проба	Маргарин	Витаминизированный напиток	Порошок для пудинга	Овощная смесь
Аналит-вещество	Общий β-каротин	Общий β-каротин	Общий β-каротин	Общий β-каротин
Год межлабораторного испытания	1995	1995	1995	1995
Количество лабораторий	13	13	13	13
Количество проб	1	1	1	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко отклоняющихся значений	12	12	11	12
Количество резко отклоняющихся значений	1	1	2	1
Количество полученных результатов	55	59	51	56
Среднее значение, мкг/100 г	0,253	2,248	1,531	18,05
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/100 г	0,011	0,065	0,085	0,71
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	4,5	2,9	5,6	3,9
Значение повторяемости r (2,83 × s_r), мкг/100 г	0,032	0,19	0,24	2,0
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	0,024	0,15	0,14	2,7
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	9,7	6,5	9,3	15
Значение воспроизводимости R (2,83 × s_R), мкг/100 г	0,069	0,41	0,40	7,6

Проверка данных, приведенных в таблице В.2, осуществлялась Европейской комиссией в рамках Программы испытаний и стандартных измерений, которая проводилась Institute of Food Research, Norwich, United Kingtom, в 1996 г. по измерению общего β-каротина в смешанной растительной пробе [10].

Таблица В.2

Проба	Овощная смесь
Год межлабораторного испытания	1996
Количество лабораторий	14
Количество проб	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко отклоняющихся значений	14
Количество резко отклоняющихся значений	0
Количество записей	14
Количество полученных результатов	60
Среднее значение, мг/100 г	2,37

Окончание таблицы В.2

Проба	Овощная смесь
Стандартное отклонение повторяемости S_r, мг/100 г	0,159
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	6,7
Значение повторяемости r (2,83 × s_r), мг/100 г	0,450
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	0,241
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	10,2
Значение воспроизводимости R (2,83 × s_R), мг/100 г	0,682
Примечание – Данные, полученные в данном международном сравнительном исследовании, были сформированы с использованием различных методов, идентичных процедурам анализа участвующих лабораторий с системами HPLC, как описано в приложении С.	

Приложение С
(справочное)

Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии

Разделение и количественное определение может быть удовлетворительным, если выполняются хроматографические условия, приведенные в таблице С.1 [10]. См. также [11].

Таблица С.1 [6)]

Колонка	Размеры колонки, мм	Подвижная фаза	Поток	Детектирование
Spherisorb® ODS2, 5 мкм дополнительно Vydac® 201TP54, 5 мкм	100 × 4,6 250 × 4,6	CH_3CN + (MeOH + 0,05 моль/л NH_4Ac) + DCM (75 + 20 + 5), содержащий 0,1 % BHT и 0,05 % TEA	1,5 мл/мин	450 нм
NucleosilB® 3 мкм Vydac TP54, 5 мкм	125 × 4,6 250 × 4,6	CH_3CN + (MeOH + 0,05 моль/л NH_4Ac) + DCM (70 + 20 + 5), содержащий 0,05 % TEA	–	Диодная матрица
Vydac® 201TP54, 5 мкм	250 × 4,6	MeOH + THF (95 + 5) + 0,1 % BHT	1,0 мл/мин	Диодная матрица
Vydac® 218TP54, 5 мкм	250 × 4,6	MeOH + THF (99 + 1) + 50 ppm АК	1,5 мл/мин	450 нм
Eurospher® 100-C18, 5 мкм	250 × 4,6	CH_3CN + MeOH (85 + 15)	0 мин – 6 мин: 1,8 мл/мин 6 мин – 20 мин: 3,5 мл/мин	Диодная матрица
Spheri-5-ODS, 5 мкм	220 × 4,6	CH_3CN + MeOH (85 + 15) и CH_3CN	–	Диодная матрица

[6)] Обозначения:
MeOH – метанол;
EtOH – этанол;
АК – аскорбиновая кислота или аскорбат натрия;
KOH – гидроксид калия;
THF – тетрагидрофуран;
CH_3CN – ацетонитрил;
DCM – дихлорметан;
NH_4Ac – ацетат аммония;
TEA – триэтиламин;
BHT – бутилгидрокситолуол.

Библиография

[1] World Health Organisation, Expert Committee on Biological Standardisation, Techn. Report No. 147, 11, WHO, Geneva, 1958 and Techn. Report 222, 10, 51-52, WHO, Geneva, 1961.
(Технический доклад № 147, 222 Комитета экспертов по биологической стандартизации Всемирной организации здравоохранения)

[2] Int. Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), The Vitamin A Potency of β-Carotene, Butterworths Scientific Publications, London 1959
(Витамин А, активность β-каротина)

[3] Bushway, R.J.: Separation of Carotenoids in Fruits and Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography, J. Liq. Chromatogr. 8, 1985, 1527-47
(Разделение каротиноидов в овощах и фруктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии)

[4] Quackenbush, F.W.: Reversed Phase HPLC Separation of Cis- and Trans-Carotenoids and its Application in Food Materials, J. Liq. Chromatogr. 10, 1987, 643-653
(Разделение цис- и транс-каротиноидов и их применение в пищевых веществах)

[5] O Neil, C.A., Schwartz, S.J., Catignani, G.L.: Comparison of Liquid Chromatographic Methods for Determination of Cis-Trans Isomers of β-Carotene, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74, 1991, 36-42
(Сравнение жидкостной хроматографии. Методы определения цис-транс-изомеров β-каротина)

[6] Saleh, H.M., Tan, B.: Separation and Identification of Cis/Trans Carotenoid Isomers, J. Agric. Food Chem.,39, 1991, 1438-1443
(Разделение и идентификация изомеров цис/транс каротиноида)

[7] Lumley, I. D.: in The Technology of Vitamins in Food, ed. by P. B. Ottaway, Blacie Academic & Professional, Glasgow, 1993, 183-186
(Технология витаминов в продуктах питания)

[8] De Ritter, E. and Purcell, A.E.: Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors, ed. by J. Christopher Bauernfeind, Academic Press Inc., New York, 1981, 889
(Каротиноиды как красители и провитамины витамина А)

[9] Hart, D.J.and Scott, K.J., 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis ofcarotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. Food Chem 54, 101-111
(Разработка и оценка методом ВЭЖХ для анализа каротиноидов в продуктах питания и измерение содержания каротиноидов в овощах и фруктах, обычно потребляемых в Великобритании)

[10] Finglas, P.M., Scott, K.J., Wilthoft, C. M., van der Berg, H. & de Froidmont – Gortz, I., 1999. The certificationof the mass fractions of vitamins in four reference materials: wholemeal flour (CRM 121), milk powder (CRM421), lyophilized mixed vegetables (CRM 485) and lyophilized pig's liver (CRM 487). EUR-ReportDOC/BCR/01/98. Commission of the European Union, Luxembourg
(Сертификация массовой доли витаминов в четырех стандартных материалах: мука грубого помола (CRM 121), молочный порошок (CRM 421), лиофилизированная смесь овощей (CRM 485) и лиофилизированная печень свиньи (CRM 487))

[11] Schuep, W. and Schierle, J., 1997. Determination of β-Carotene in Commercial Foods: Interlaboratory Study. Journal of AOAC International Vol. 80 No. 5, 1057-1064
(Определение β-каротина в коммерческих продуктах: Межлабораторное исследование)

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

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным европейским стандартам

Таблица Д.А.1 – Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному европейскому стандарту

Обозначение и наименование ссылочного европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование государственного стандарта
EN 12823-1:2000 Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Измерение количества полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола	IDT	СТБ EN 12823-1-2012 Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Часть 1. Измерение количества полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола

Таблица Д.А.2 – Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному европейскому стандарту, который является идентичным международному стандарту

Обозначение и наименование ссылочного европейского стандарта	Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование государственного стандарта
EN ISO 5555:2001 Масла и жиры животные и растительные. Отбор проб	ISO 5555:2001 Жиры и масла животные и растительные. Отбор проб	IDT	СТБ ISO 5555:2009 Жиры и масла животные и растительные. Отбор проб (ISO 5555:2001; IDT)

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 10.07.2012. Подписано в печать 15.08.2012. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,97 Уч.- изд. л. 0,81 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru