ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ EN 12821-2012

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

**Определение содержания витамина D
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
Определение холекальциферола (D_3) или эргокальциферола (D_2)**

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

**Вызначэнне змяшчэння вітаміну D
метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі.
Вызначэнне холекальцыферолу (D_3) або эргакальцыферолу (D_2)**

(EN 12821:2009, IDT)

Издание официальное

БЗ 9-2011

Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 664:543.645.5(083.74)(476) МКС 67.050 КП 06 IDT

Ключевые слова: пищевые продукты, витамин D, холекальциферол D_3, эргокальциферол D_2, высокоэффективная жидкостная хроматография

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 12821:2009 Foodstuffs – Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography – Measurement of cholecalciferol (D_3) or ergocalciferol (D_2) (Продукты пищевые. Определение содержания витамина D методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определение холекальциферола (D_3) или эргокальциферола (D_2)).

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 европейского стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и европейского стандарта, на который дана ссылка, имеются в Национальном фонде ТНПА.

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Определение содержания витамина D методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определение холекальциферола (D_3) или эргокальциферола (D_2)

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Вызначэнне змяшчэння вітаміну D метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі. Вызначэнне холекальцыферолу (D_3) або эргакальцыферолу (D_2)

Foodstuffs
Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography.
Measurement of cholecalciferol (D_3) or ergocalciferol (D_2)

Дата введения 2013-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина D_3 (холекальциферол) или витамина D_2 (эргокальциферол) в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Витамин D_3 содержится преимущественно в пищевых продуктах животного происхождения, а витамин D_2 – в лесных грибах. Оба витамина могут использоваться для получения обогащенных пищевых продуктов. Настоящий стандарт не распространяется на пищевые продукты, которые содержат как витамин D_3, так и витамин D_2.

Кроме активности основных форм витамина D, витамина D_3 и витамина D_2, соответствующие метаболиты 25-гидроксивитамин D и 1,25-дигидроксивитамин D также вносят свой вклад в активность витамина D.

Настоящий стандарт распространяется только на определение витаминов D_3 или D_2.

Стандарт обеспечивает основу для аналитических методов. Он предназначается для создания схемы, согласно которой экспериментатор сможет проводить необходимые анализы в соответствии со стандартной процедурой. Данный метод был валидирован в результате проведения межлабораторных сличений на обогащенных и необогащенных образцах таких пищевых продуктов, как маргарин, молоко, сухое молоко, жидкое питание для грудных детей, молочных смесях, растительных и рыбных жирах при концентрациях от 0,4 мкг/100 г до 14 мкг/100 г. Дополнительные данные по валидации приведены в приложении D.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный стандарт. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

EN ISO 3696:1995 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний (ISO 3696:1987)

3 Сущность метода

Витамины D_2 и D_3 омыляют в пищевых продуктах с использованием спиртового раствора гидроксида калия и экстрагируют с помощью подходящего растворителя. Определение витамина D_2 или D_3 в растворе экстракта пробы осуществляют посредством полупрепаративной нормально-фазной колонки методом ВЭЖХ с последующим определением на аналитической обращенно-фазной колонке.

Если необходимо определить витамин D_3, витамин D_2 используют в качестве внутреннего стандартного вещества. При определении витамина D_2 используют в качестве внутреннего стандартного вещества витамин D_3.

Издание официальное

Содержание витамина D определяют ультрафиолетовой (UV) спектрометрией, причем пики идентифицируют на основе времени удерживания и дополнительно по спектральным UV-профилям, если для определения используется диодная матрица. Определение проводят с помощью метода внутреннего стандартного вещества, используя площадь или высоту пиков, см. [1] – [8].

4 Реактивы

4.1 Общие положения

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты и воду не ниже 1 степени по EN ISO 3696, если иное не указано по ходу проведения анализа.

4.2 Метанол.

4.3 Этанол, объемная доля $\varphi(C_2H_5OH) = 100$ %.

4.4 Этанол, объемная доля $\varphi(C_2H_5OH) = 96$ %.

4.5 Сульфат натрия безводный.

4.6 Растворы КОН для омыления в соответствующих концентрациях, например массовая концентрация $\rho(KOH) = 50$ г/100 мл или $\rho(KOH) = 60$ г/100 мл, или спиртовые растворы, например 28 г КОН в 100 мл смеси этанол/вода с объемной долей этанола 90 %.

4.7 Антиокислительные реагенты: такие, как аскорбиновая кислота, аскорбат натрия, пирогаллол, сульфид натрия (Na_2S) или бутилгидрокситолуол (BHT).

4.8 Растворители и экстрагирующие растворители: эфир диэтиловый (не содержащий перекиси), дихлорметан, эфир петролейный, *n*-гексан, этилацетат или соответствующие их смеси.

4.9 Подвижные фазы для ВЭЖХ

4.9.1 Примеры смесей растворителей для нормально-фазной полупрепаративной ВЭЖХ

Примеры соответствующих смесей растворителей (даны в объемных долях) для нормальной фазы полупрепаративной ВЭЖХ включают:

n-гексан : 2-пропанол (98 : 2), (99 : 1) или (95 : 5);

n-гексан : изоамиловый спирт (99 : 1);

n-гексан : 2-пропанол + тетрагидрофуран (98 : 1 : 1);

изооктан : изобутанол (99 : 1);

n-гептан : 2-пропанол (97 : 3).

4.9.2 Примеры растворителей и смесей растворителей для аналитической обращенно-фазной ВЭЖХ

Примеры соответствующих растворителей и смесей растворителей (даны в объемных долях) для аналитической обращенно-фазной ВЭЖХ включают:

метанол;

метанол : вода (95 : 5) или (93 : 7);

ацетонитрил : метанол (80 : 20), (90 : 10) или (70 : 30);

ацетонитрил, хлороформ : метанол (93 : 4 : 3).

4.10 Стандартные вещества

4.10.1 Стандартное вещество эргокальциферол (витамин D_2), $M(C_{28}H_{44}O) = 396{,}7$ г/моль.

Стандартное вещество витамин D_2 должно иметь наивысшую степень чистоты из всех возможных (массовая доля более 98 %) и должно храниться в соответствии с инструкциями изготовителя (в темном месте, обычно при температуре ниже 4 °С).

4.10.2 Стандартное вещество холекальциферол (витамин D_3), $M(C_{27}H_{44}O) = 384{,}6$ г/моль.

Стандартное вещество витамин D_3 должно иметь наивысшую степень чистоты из всех возможных (массовая доля более 98 %) и должно храниться в соответствии с инструкциями изготовителя (в темном месте, обычно при температуре ниже 4 °С).

4.11 Исходные растворы

4.11.1 Исходный раствор витамина D_2

Взвешивают 100 мг витамина D_2 (4.10.1) с точностью до 1 мг и помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в этаноле (4.4) и этанолом доводят раствор до метки. Такой раствор содержит 1 мг/мл витамина D_2. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре ниже 4 °С.

Рассчитывают массовую концентрацию исходного раствора и массовую долю стандартного вещества витамина D_2 методом, описанным в 4.12.1.

Полученный раствор остается стабильным в течение 6 мес при температуре минус 18 °С.

4.11.2 Исходный раствор витамина D_3

Взвешивают 100 мг витамина D_3 (4.10.2) с точностью до 1 мг и помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в этаноле (4.4) и доводят этанолом раствор до метки. Такой раствор содержит 1 мг/мл витамина D_3. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре ниже 4 °С.

Рассчитывают массовую концентрацию исходного раствора и массовую долю стандартного вещества витамина D в соответствии с методом, описанным в 4.12.2.

Полученный раствор остается стабильным в течение 6 мес при температуре минус 18 °С.

4.12 Стандартные растворы

4.12.1 Стандартный раствор витамина D_2

Отмеряют пипеткой 1 мл исходного раствора витамина D_2 и помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют этанолом (4.4) и доводят этанолом до метки. Такой раствор содержит около 10 мкг/мл витамина D_2. Раствор готовят в день использования.

Примечание – Массовую концентрацию стандартного раствора можно регулировать в случае необходимости соответствовать требованиям проведения анализа.

Измеряют абсорбцию стандартного раствора витамина D_2 в кварцевой кювете на 1 см при длине волны 265 нм относительно этанола (4.4). Рассчитывают массовую концентрацию витамина D_2 ρ_{D2}, в микрограммах на миллилитр стандартного раствора, по формуле

$$\rho_{D2} = \frac{A_{265} \times M_{D2} \times 1000}{\varepsilon \times b}, \quad (1)$$

где A_{265} – величина поглощения стандартного раствора витамина D_2 при 265 нм;

M_{D2} – молярная масса витамина D_2 (M_{D2} = 396,7 г/моль);

ε – коэффициент молярной абсорбции витамина D_2 (здесь: ε = 18 843 м^2/моль, рассчитанный из значения $E^{1\%}_{1\text{см}}$, [9]);

b – длина оптического пути кварцевой кюветы, см;

1000 – коэффициент пересчета размерности.

4.12.2 Стандартный раствор витамина D_3

Отмеряют пипеткой 1 мл исходного раствора витамина D_3, помещают в мерную колбу объемом 100 мл и доводят этанолом (4.4) до метки. Такой раствор содержит около 10 мкг/мл витамина D_3. Раствор готовят в день использования.

Примечание – Массовую концентрацию стандартного раствора можно регулировать в случае необходимости соответствовать требованиям проведения анализа.

Измеряют абсорбцию стандартного раствора витамина D в кварцевой кювете на 1 см при длине волны 265 нм относительно этанола (4.4). Рассчитывают массовую концентрацию витамина D_3 ρ_{D2}, в микрограммах на миллилитр стандартного раствора, по формуле

$$\rho_{D3} = \frac{A_{265} \times M_{D3} \times 1000}{\varepsilon \times b}, \quad (2)$$

где A_{265} – величина поглощения стандартного раствора витамина D при 265 нм;

M_{D3} – молярная масса витамина D_3 (M_D = 384,6 г/моль);

ε – коэффициент молярной абсорбции витамина D_3 (здесь: ε = 18461 м^2/моль, рассчитанный из значения $E^{1\%}_{1\text{см}}$, [9]);

b – длина оптического пути кварцевой кюветы, см;

1000 – коэффициент пересчета размерности.

4.13 Внутренние стандартные растворы

4.13.1 Внутренний стандартный раствор витамина D_2

Отмеряют пипеткой 1 мл исходного раствора витамина D_2 (4.12.1) и помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в этаноле (4.4) и этанолом доводят раствор до метки. Раствор готовят в день использования.

4.13.2 Внутренний стандартный раствор витамина D_3

Отмеряют пипеткой 1 мл исходного раствора витамина D_3 (4.12.2) и помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в этаноле (4.4) и доводят этанолом раствор до метки. Раствор готовят в день использования.

Примечание – При определении витамина D_3 витамин D_2 используется в качестве внутреннего стандартного вещества. При определении витамина D_2 витамин D_3 используется в качестве внутреннего стандартного вещества.

4.14 Полупрепаративный стандартный раствор витамина D_2 и витамина D_3

Отмеряют пипеткой 5 мл стандартного раствора витамина D_2 (4.12.1) и 5 мл стандартного раствора витамина D_3 (4.12.2) в колбу ротационного испарителя и осторожно удаляют растворитель (при температуре не выше 40 °С). Повторно растворяют остатки в 100 мл подвижной фазы полупрепаративной ВЭЖХ (4.9.1).

В случае необходимости концентрацию полупрепаративного стандартного раствора можно изменять в зависимости от системы ВЭЖХ (5.4 и 5.5).

4.15 Аналитический стандартный раствор витамина D_2 и витамина D_3

Пипеткой переносят 5 мл стандартного раствора витамина D_2 и 5 мл стандартного раствора витамина D_3 в колбу ротационного испарителя и тщательно удаляют растворитель (при температуре не выше 40 °С). Повторно растворяют остатки в 50 мл подвижной фазы аналитической ВЭЖХ (4.9.2).

5 Аппаратура

5.1 Общие положения

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее:

5.2 UV-спектрометр, предназначенный для измерения при длине волны 265 нм.

5.3 Ротационный испаритель с водяной баней и вакуумным устройством.

Примечание – Для заполнения вакуума рекомендуется использовать азот.

5.4 Полупрепаративная система ВЭЖХ, состоящая из насоса, приспособления для инжектирования пробы, детектора ультрафиолетового излучения, приспособлений для сбора установленных кратных порций элюента колонки и самописца или интегратора.

5.5 Аналитическая система ВЭЖХ, состоящая из насоса, устройства для инжектирования пробы, UV-детектора и самописца интегратора или аналогичного устройства для сбора данных.

5.6 Колонки ВЭЖХ

5.6.1 Колонка полупрепаративной нормальной фазы, например силикагелевая или с цианоаминовой сшивкой, размер частиц – 5 мкм, диаметр – от 4,0 до 8,0 мм, длина – от 250 до 300 мм. Более подробная информация приведена в приложении А.

5.6.2 Колонка аналитическая обращенно-фазная, например, с обращенной фазой C_{18}, размер частиц – 5 мкм, диаметр – от 4,0 до 4,6 мм, длина – 250 мм. Более подробная информация приведена в приложении А.

5.6.3 Наполнители

Можно использовать другие размеры частиц и параметры колонки, чем указанные в настоящем стандарте, но аналитик должен быть уверен в том, что обеспечивается необходимое отделение витаминов D от примесей и что будут получены эквивалентные результаты.

5.7 Фильтровальное устройство

Фильтровальные устройства в крупногабаритном или малогабаритном исполнении для фильтрования, соответственно, подвижных фаз ВЭЖХ и растворов проб, имеющие, например, поры размером приблизительно 0,45 мкм.

Примечание – Фильтрование подвижной фазы, а также раствора пробы через мембранный фильтр перед использованием или инжектированием обычно увеличивает срок службы колонок.

6 Проведение анализа

6.1 Общие положения

Витамин D_2 и витамин D_3 чувствительны к ультрафиолетовому излучению и окисляющим воздействиям (например, воздействию атмосферного кислорода). Поэтому необходимо исключить ультра-

фиолетовое излучение, используя лабораторную посуду из янтарного стекла, алюминиевую фольгу или материалы, поглощающие UV-излучение. К растворам, содержащим экстрагированные витамины, следует добавлять антиокислительные реагенты, а также использовать ток азота. Растворители должны испаряться при пониженном давлении с использованием ротационного испарителя при температуре не выше 40 °С.

6.2 Подготовка пробы для анализа

Анализируемую пробу гомогенизируют. Крупный материал полностью измельчают и гомогенизируют в блендере для пищевых продуктов. Чтобы проба в течение длительного времени не подвергалась воздействию высоких температур, в целях предосторожности ее заранее охлаждают. После этой подготовки следует незамедлительно проводить анализ пробы. Пробы следует защищать от света.

6.3 Приготовление анализируемого раствора пробы

6.3.1 Омыление

Навеску исследуемого образца массой 10 – 30 г помещают в колбу, добавляют этанол (4.4), воду, антиокислительный реагент (4.7) и раствор гидроксида калия (4.6), хорошо перемешивают. Омыление проводят в токе азота. Антиокислительные реагенты следует добавлять перед добавлением раствора гидроксида калия. Можно также добавлять сульфид натрия (4.7) во избежание окислительных каталитических воздействий от следов металлов.

При определении витамина D_3 в колбу для омыления добавляют пипеткой соответствующее количество внутреннего стандартного раствора витамина D_2 (4.13.1). Количество добавленного внутреннего стандартного раствора витамина D_2 должно соответствовать количеству витамина D_3, ожидаемого в пробе. Если определяют содержание витамина D_2, тогда в качестве внутреннего стандарта добавляют стандартный раствор витамина D_3 (4.13.2).

В ходе выполнения процедуры анализа следует производить отбор пробы, которая не содержит внутренний стандарт, чтобы не происходило наложения матрицы пробы во время удерживания внутреннего стандарта.

В таблице 1 приведены примеры применяемых количественных соотношений реактивов:

Таблица 1 – Примеры количественных соотношений реактивов

Проба	Этанол	Пирогаллол	Аскорбиновая кислота/ аскорбат натрия	Гидроксид калия
От 10 до 30 г	100 мл	От 0,5 до 1 г	От 1,0 до 2,5 г	50 мл раствора 50 г/100 мл

Обычное время омыления составляет от 20 до 45 мин при температурах от 70 °С до 100 °С. Омыление можно проводить также в течение ночи (примерно 16 ч) при комнатной температуре, при этом остальные условия должны остаться неизменными.

Если после омыления и охлаждения на поверхности омыленной смеси присутствует жир или масло, то необходимо добавить дополнительное количество раствора гидроксида калия в этаноле и увеличить время омыления.

Примечание – Условия, подходящие для омыления пробы маргарина и пробы сухого молока, приведены в приложении В.

6.3.2 Экстрагирование

Во избежание образования эмульсий в подвергнутый омылению раствор пробы следует добавить столько воды, чтобы соотношение спирта и воды в конечном растворе составляло 1 : 1.

Экстрагируют витамины D_2 и D_3 из охлажденной омыленной смеси, используя подходящий растворитель или смесь растворителей (4.8) и повторяют данную процедуру от двух до четырех раз с объемами в диапазоне от 100 до 200 мл. Промывают водой объединенные экстракты до нейтральной реакции pH (обычно 5 раз с объемами от 50 л до 100 мл).

Примечание – Некоторые методы предписывают промывание до нейтральной реакции 3%-ным или 5%-ным раствором гидроксида калия в 0,9%-ном растворе хлорида натрия, которому приданы буферные свойства раствором ацетата натрия (2,6 моль/л) (pH = 7) или похожими смесями. Условия экстрагирования, которые оказались подходящими для пробы маргарина и пробы сухого молока, приведены в приложении В.

6.3.3 Концентрирование

Экстракты проб выпаривают в ротационном испарителе (5.3) при сниженном давлении и максимальной температуре не выше 40 °С. Перед выпариванием в экстракт пробы рекомендуется доба-

вить антиокислительный реагент (например, 2 мл бутилгидрокситолуола (BHT) в *n*-гексане с концентрацией 1 мг/мл).

В концентрированный экстракт пробы необходимо добавлять абсолютный этанол (4.3) или безводный сульфат натрия (4.5), чтобы способствовать удалению следов воды (азеотропная дистилляция).

На данной стадии проведения анализа с целью исключения потенциальных посторонних воздействий можно провести дополнительную очистку экстракта пробы. В этом случае необходимо использовать полностью валидированную (утвержденную) методику.

Примечание – Приложение Е устанавливает три различных метода дополнительной очистки. Всегда полезно комбинировать метод дополнительной очистки с использованием колоночной хроматографии (Е.2) и метод с использованием SPE (solid phase extraction – твердофазная экстракция) (Е.3), как было показано для пищевых продуктов, например для маргарина и растительного масла. Метод дополнительной очистки с использованием препаративной тонкослойной хроматографии TLC (thin layer chromatography) (Е.1) предпочтительнее использовать для кормов и добавок, например, в таблетках или капсулах. При испытаниях добавок он может применяться при необходимости с Е.3.

6.3.4 Разведение

Остаток повторно растворяют в небольшом заданном количестве растворителя, который совместим с полупрепаративной системой ВЭЖХ. Добавление небольшого количества безводного сульфата натрия устраняет оставшиеся следы воды.

6.4 Калибровка

Для калибровки полупрепаративной (5.6.1) и аналитической (5.6.2) систем ВЭЖХ, а также для оценки пригодности этих систем используют стандартные растворы витамина D (4.12.1) и витамина D_3 (4.12.2).

6.5 Обеспечение пригодности системы ВЭЖХ

Хроматографируют смешанный полупрепаративный стандартный раствор витаминов D_2 и D_3 (4.14), используя полупрепаративную систему ВЭЖХ (5.6.1) до тех пор, пока единственный пик витамина D не будет элюирован с воспроизводимым временем удержания. Это позволяет точно установить диапазон фракции витамина D из экстрактов пробы.

Хроматографические условия полупрепаративной ВЭЖХ должны устанавливаться так, чтобы достигалось оптимальное отделение витамина D от токоферолов и других примесей из исходного пищевого продукта. Примеры хроматограмм указаны в приложении С.

Хроматографируют смешанный аналитический стандартный раствор витаминов D_2 и D_3 (4.15), используя аналитическую систему ВЭЖХ, и настраивают хроматографические условия так, чтобы разделение витаминов D_2 и D_3 составляло как минимум 98 % (т. е. коэффициент разделения должен составлять более 1,0) и чтобы эти витамины были отделены от всех примесей из исходного пищевого продукта.

6.6 Определение

6.6.1 Полупрепаративная ВЭЖХ

Инжектируют кратную порцию концентрированного экстракта пробы в полупрепаративную систему ВЭЖХ (5.6.1) и собирают фракцию витамина D в заданном отрезке диапазона. Временной интервал для сбора фракции должен быть заранее установлен с использованием стандартного раствора витамина D (6.5). Диапазон должен быть достаточно широким для сбора всех фракций витамина D, но при этом достаточно узким для исключения попадания токоферолов или других примесей.

Типичная полупрепаративная хроматограмма показана в приложении С.

6.6.2 Аналитическая ВЭЖХ

Фракцию из заданного отрезка диапазона для полупрепаративной ВЭЖХ выпаривают до сухого состояния и повторно растворяют в растворителе, совместимом с подвижной фазой аналитической ВЭЖХ.

Кратные порции экстракта пробы инжектируют в аналитическую систему ВЭЖХ, после чего идентифицируют пики витаминов D_2 и D_3 (6.6.3). Пики витаминов D_2 и D_3 должны быть отделены от примесей из исследуемой пробы пищевого продукта.

Типичная аналитическая хроматограмма показана в приложении С.

6.6.3 Идентификация

Идентифицируют витамины D_2 и D_3, сравнивая время удержания на хроматограммах анализируемого раствора пробы со временем удержания стандартных растворов при одинаковых хроматографических условиях (6.5). Использование детектора диодной матрицы позволяет тщательно проверить ультрафиолетовые спектры пиков витамина D и оценить чистоту пиков. Эту проверку можно также осуществлять путем повторной хроматографии экстракта пробы при различных длинах волн UV-детектора.

6.6.4 Количество определений

Следует проводить не менее двух независимых определений.

6.7 Метод внутреннего стандарта и коэффициент чувствительности

Рассчитывают коэффициент чувствительности R_f витамина D_3 в сравнении с D_2 по методу внутреннего стандарта, используя заданные стандартные концентрации (4.13) по формуле

$$R_f = \frac{A_{STD3} \times \rho_{STD2}}{A_{STD2} \times \rho_{STD3}}, \quad (3)$$

где A_{STD3} – полученная для стандартного раствора витамина D_3 площадь пика или высота пика;
A_{STD2} – полученная для стандартного раствора витамина D_2 площадь пика или высота пика;
ρ_{STD2} – массовая концентрация витамина D_2 в стандартном растворе, мкг/мл;
ρ_{STD3} – массовая концентрация витамина D_3 в стандартном растворе, мкг/мл.

7 Расчет

Массовую долю витамина D_3 w_{D3}, мкг/100 г, рассчитывают по формуле

$$w_{D3} = \frac{A_{SD3} \times I_S \times 100}{A_{SD2} \times R_f \times m}, \quad (4)$$

где I_S – масса в испытуемом образце внутреннего стандарта витамина D_2, мкг;
m – масса пробы, взятой для омыления, г;
R_f – см. уравнение (3);
A_{SD3} – полученная для витамина D_3 площадь пика или высота пика в растворе пробы;
A_{SD2} – полученная для витамина D_2 площадь пика или высота пика в растворе пробы.

8 Прецизионность

8.1 Краткий статистический обзор

Данные прецизионности различных методов ВЭЖХ для определения витамина D_3 были получены в 1994 г. при проведении международных сличительных испытаний, организованных по Программе измерений и испытаний стандартов Европейской комиссии, на пробе маргарина (сертифицированный референсный материал – CRM 122) и на пробе сухого молока (CRM 421) и позволили получить статистические данные, указанные в приложении D.

Данные по прецизионности, полученные на овсяной каше и сухом молоке, были получены при проведении межлабораторных сличений посредством метода, использующего расчеты, основанные на внешнем стандарте в соответствии с ISO 5725:1986, и приведены в приложении D.

Данные по прецизионности, полученные на молоке, жидких молочных смесях для питания грудных детей, растительном масле, маргарине, молочных смесях для питания грудных детей и рыбьем жире, были установлены в межлабораторных сличениях в соответствии с Руководящими указаниями AOAC по процедурам совместных испытаний для утверждения метода анализа (см. приложение D).

Данные, полученные в ходе проведения этих сличительных испытаний могут оказаться неприменимыми для других диапазонов концентрации определяемого вещества и матриц проб, отличающихся от приведенных в приложении D.

8.2 Повторяемость (сходимость)

Абсолютная разность между двумя отдельными результатами, полученными одним наблюдателем на идентичном анализируемом материале с помощью одной и той же аппаратуры в течение как можно более короткого отрезка времени, не должна превышать значения предела сходимости r более чем в 5 % случаев.

Это следующие значения:

Маргарин:	$\bar{x}$ = 12,3 мкг/100 г	r = 2,32 мкг/100 г
Сухое молоко:	$\bar{x}$ = 14,3 мкг/100 г	r = 2,09 мкг/100 г
Молоко:	$\bar{x}$ = 0,418 мкг/100 г	r = 0,054 мкг/100 г
Жидкие молочные смеси:	$\bar{x}$ = 1,38 мкг/100 г	r = 0,23 мкг/100 г
Растительное масло:	$\bar{x}$ = 4,61 мкг/100 г	r = 0,96 мкг/100 г
Маргарин:	$\bar{x}$ = 8,39 мкг/100 г	r = 1,52 мкг/100 г
Молочные смеси:	$\bar{x}$ = 10,1 мкг/100 г	r = 0,7 мкг/100 г
Рыбий жир:	$\bar{x}$ = 11,6 мкг/100 г	r = 0,7 мкг/100 г

8.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя отдельными результатами, полученными двумя лабораториями на идентичном анализируемом материале, не должна превышать значения предела воспроизводимости R более чем в 5 % случаев.

Это следующие значения:

Маргарин:	$\bar{x}$ = 12,3 мкг/100 г	R = 2,66 мкг/100 г
Сухое молоко:	$\bar{x}$ = 14,3 мкг/100 г	R = 2,21 мкг/100 г
Молоко:	$\bar{x}$ = 0,418 мкг/100 г	R = 0,106 мкг/100 г
Жидкие молочные смеси:	$\bar{x}$ = 1,38 мкг/100 г	R = 0,47 мкг/100 г
Растительное масло:	$\bar{x}$ = 4,61 мкг/100 г	R = 3,11 мкг/100 г
Маргарин:	$\bar{x}$ = 8,39 мкг/100 г	R = 1,60 мкг/100 г
Молочные смеси:	$\bar{x}$ = 10,1 мкг/100 г	R = 2,0 мкг/100 г
Рыбий жир:	$\bar{x}$ = 11,6 мкг/100 г	R = 5,8 мкг/100 г

9 Протокол анализа

Протокол анализа должен содержать как минимум следующие данные:

a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;

b) ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;

c) результаты и единицы измерения, в которых они выражены;

d) дату и метод отбора проб (если он известен);

e) дату поступления проб;

f) дату проведения анализа;

g) любые особенности, отмеченные в ходе проведения анализа;

h) любые наблюдения, не установленные настоящим методом или рассматриваемые в качестве дополнительных, которые могут повлиять на результаты.

Приложение А
(справочное)

Примеры применяемых полупрепаративных систем высокоэффективной жидкостной хроматографии

Таблица А.1 – Примеры полупрепаративных систем ВЭЖХ, которые использовались для очистки анализируемых растворов проб участниками сертификационных испытаний витамина D по EU MAT (Программа измерений и испытаний Европейского союза) [8]

Колонка	Размеры, мм	Подвижная фаза, (V + V)	Детектор, λ
Polygosil® 60, 5 мкм	250 × 8	изооктан + изобутанол (99 + 1)	265 нм
LiChrospher® Si 60, 5 мкм	250 × 4	*n*-гексан + 2-пропанол (99 + 1)	265 нм
LiChrospher® Si 100, 5 мкм	250 × 8	*n*-гексан + 2-пропанол (98 + 2)	265 нм
μ Porasil® silica	300 × 3,9	*n*-гексан + THF + 2-пропанол (98 + 1+ 1)	265 нм
Partisil® PAC, 5 мкм	250 × 4,6	*n*-гексан + изоамиловый спирт (99 + 1)	265 нм
Lichrosorb ® Si 60	250 × 4	*n*-гексан + 2-пропанол + THF (98 + 1+ 1)	265 нм
Lichrosorb® Si 60	250 × 4	*n*-гексан + 2-пропанол (95 + 5)	265 нм
Lichrosorb® Si 60	250 × 4	*n*-гексан + 2-пропанол (97 + 3)	265 нм
Все торговые наименования предназначены исключительно для удобства пользователей настоящего стандарта. Это не является рекламой названных видов продукции со стороны CEN.			

Таблица А.2 – Примеры аналитических систем ВЭЖХ, используемых для определения витамина D в растворах с исследуемой пробой, которые использовались участниками сертификационных испытаний EU MAT [8]

Колонка	Размеры, мм	Подвижная фаза, (V + V)	Детектор, λ
Hypersil® ODS, 5 мкм	250 × 4,6	метанол	265 нм
LiChrospher® 100 RP, 18,5 мкм	250 × 4	метанол + вода (95 + 5)	264 нм
Vydac® 201TP54	250 × 4,6	метанол + вода (93 + 7)	265 нм
Vydac® 201TP54	250 × 4,6	ацетонитрил + метанол (80 + 20)	265 нм
Shperisorb® ODS 2, 5 мкм	250 × 4,6	ацетонитрил + дихлорметан + метанол (93 + 4 + 3)	диодная матрица
Nucleosil® C_{18}, 5 мкм	250 × 4	ацетонитрил + метанол (70 + 30)	265 нм
Zorbax® ODS	250 × 4,6	ацетонитрил + метанол (95 + 5)	265 нм
Все торговые наименования предназначены исключительно для удобства пользователей настоящего стандарта. Это не является рекламой названных видов продукции со стороны CEN.			

Приложение В
(справочное)

Примеры применяемых условий экстракции и омыления

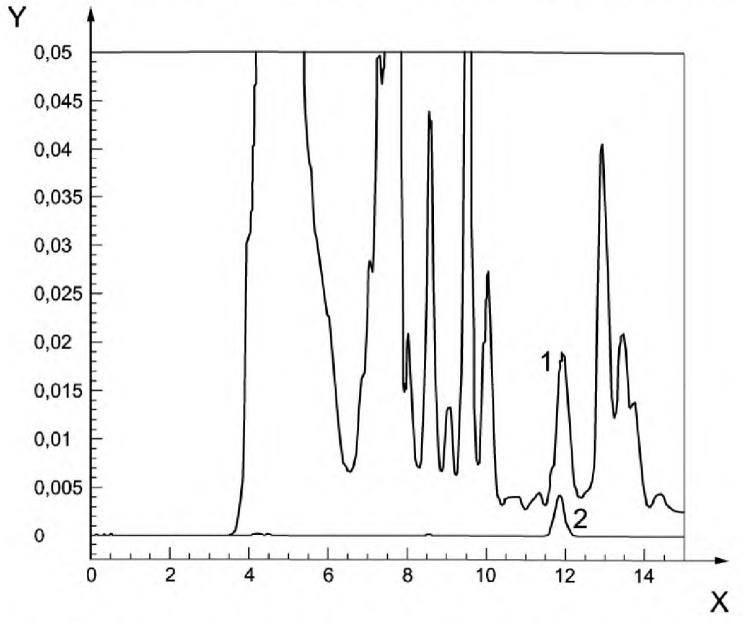
Приведенные в качестве примеров условия экстракции и омыления использовались участниками сертификационных испытаний EU MAT [8] для определения витамина D. Масса проб приведена в граммах жира (для маргарина 82%-ной жирности, для сухого молока 27%-ной жирности).

Таблица В.1 – Примеры аналитических систем ВЭЖХ, которые использовались для определения витамина D в анализируемых растворах проб участниками сертификационных испытаний EU MAT [8]

Омыление	Экстракция
16 г жира + 150 мл этанола + 1 г пирогаллола + + (75 мл воды + 30 г KOH [a]) + азотистое промывание; 30 мин при 70 °С	PE [b] + DEE [c] (9 + 1), 2 × 100 мл; промывание водой, 5 × 100 мл
8 г жира + 100 мл этанола + 1 г аскорбата натрия + 0,04 г сульфида натрия + 12 г KOH + + 50 мл воды + азотистое промывание; 30 мин при 80 °С	*n*-гексан, 3 × 100 мл и 3 × 50 мл; промывание водой, 4 × 100 мл
8 г жира + 35 мл этанола + 2 г аскорбата натрия + + 10 г KOH + 50 мл воды; 45 мин при 100 °С	*n*-гексан, 1 × 100 мл; промывание 5%-ным раствором KOH, 1 × 100 мл; промывание 30%-ным этанолом в 9%-ном растворе хлорида натрия, 1 × 100 мл; промывание 0,9%-ным раствором хлорида натрия, 1 × 100 мл
12 г жира + 30 мл этанола + 30 мл метанола + + 0,1 г аскорбиновой кислоты + 30 мл 50%-ного раствора KOH + азотистое промывание; 30 мин при 100 °С	DEE, 2 × 100 мл; промывание водой 4 × 50 мл
от 6 г до 8 г жира + 100 мл этанола + 1 г аскорбиновой кислоты + 50 мл 50%-ного раствора KOH +азотистое промывание; 20 ч при 20 °С	PE + DEE (1 + 1), 2 × 200 мл; промывание водой, 6 × 50 мл
8 г жира + 1 г пирогаллола + 150 мл 28%-ного раствора KOH в этаноле и воде (9 + 1) + азотистое промывание; 30 мин при 100 °С, обратный поток	DEE + PE (1 + 1), 2 × 500 мл; промывание водой, 5 × 150 мл
24 г жира + 90 мл этанола + 0,5 г аскорбата натрия + 30 мл 60%-ного KOH + азотистое промывание; 45 мин при 100 °С, обратный поток	DEE, 1 × 150 мл, 3 × 75 мл; промывание водой, 5 × 200 мл
[a] KOH = гидроксид калия. [b] PE = петролейный эфир. [c] DEE = диэтиловый эфир.	

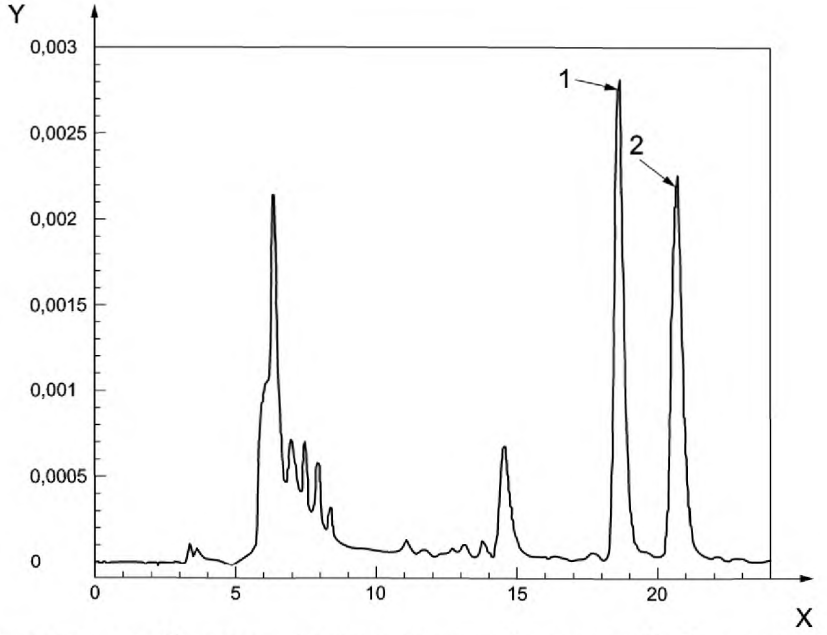
Приложение С
(обязательное)

Примеры применяемых полупрепаративных и аналитических хроматограмм



X – время, мин; Y – сигнал, условные единицы; 1 – витамин D в сухом молоке; 2 – витамин D в стандарте

Рисунок С.1 – Типичная хроматограмма нормально-фазной полупрепаративной ВЭЖХ омыленного и жидкого/сухого молока (CRM 421) и стандарта витамина D (витамин D_2 и витамин D_3)



X – время, мин; Y – сигнал, условные единицы; 1 – витамин D_2; 2 – витамин D_3

Рисунок С.2 – Типичная хроматограмма обращенно-фазной ВЭЖХ, полученная для экстракта сухого молока (CRM 421) в интервале времени от 11,5 до 12,5 мин на полупрепаративном этапе (см. рисунок С.1)

Приложение D
(справочное)

Данные по прецизионности измерений

Характеристики маргарина (CRM 122), приведенные в таблице D.1, были определены в ходе межлабораторных сличений [8] в соответствии с Руководством по сертификационным испытаниям EU MAT, [8]. Исследование было организовано правительственной химической лабораторией, Великобритания.

Характеристики молока, жидкого детского питания, растительного масла, маргарина, сухого детского питания и рыбьего жира (см. примечание к таблице D) были определены в ходе межлабораторных сличений [8] в соответствии с Руководящими указаниями AOAC по процедурам совместных испытаний для оценки характеристик метода анализа [13]. Исследование было организовано NMKL (Скандинавским комитетом по анализу пищевых продуктов) [11]. Применявшийся метод включает омыление, экстракцию, концентрирование, препаративную ВЭЖХ и аналитическую ВЭЖХ.

Таблица D.1 – Данные по прецизионности измерений для маргарина и сухого молока

Проба	1	2
Год проведения межлабораторного сличения	1994	1994
Количество лабораторий	11	11
Количество проб	5	5
Количество лабораторий, после исключения выбросов	11	11
Количество выбросов (лаборатории)	0	0
Количество принятых результатов	48	47
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/100 г	12,30	14,30
Стандартное отклонение повторяемости (сходимости) s_r, мкг/100 г	0,82	0,74
Относительное стандартное отклонение повторяемости (сходимости) RSD_r, %	6,7	5,2
Предел сходимости r [r =2,8 × s_r], мкг/100 г	2,32	2,09
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	0,94	0,78
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	7,6	5,5
Предел воспроизводимости R [R = 2,8 × s_R], мкг/100 г	2,66	2,21
Критерий Гурвица R	0,3	0,3
1 – маргарин, витаминизированный витамином D_3 (CRM 122). 2 – сухое молоко, сушка распылением витаминизированного витамином D_3 цельного молока (CRM 421).		

Таблица D.2 – Данные по прецизионности измерений для молока, жидкого детского питания, растительного масла, маргарина, сухого детского питания и рыбьего жира

Проба	1	2	3	4	5	6
Год проведения межлабораторного сличения	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Количество лабораторий	8	8	8	8	8	8
Количество проб	2	2	2	2	2	2
Количество лабораторий после исключения выбросов	7	8	8	7	7	8
Количество выбросов (лаборатории)	1	0	0	1	1	0
Количество принятых результатов	14	16	16	14	14	16

Окончание таблицы D.2

Проба	1	2	3	4	5	6
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/100 г	0,418	1,38	4,61	8,39	10,1	11,6
Стандартное отклонение повторяемости (сходимости) s_r, мкг/100 г	0,019	0,08	0,34	0,54	0,2	0,3
Относительное стандартное отклонение повторяемости (сходимости) RSD_r, %	4,6	5,9	7,4	6,5	2,4	2,2
Предел сходимости r [$r = 2,8 \times s_r$], мкг/100 г	0,054	0,23	0,96	1,52	0,7	0,7
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	0,038	0,17	1,11	0,57	0,7	2,1
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	9,1	12,1	24,1	6,8	7,1	17,7
Предел воспроизводимости R [$R = 2,8 \times s_R$], мкг/100 г	0,106	0,47	3,11	1,60	2,0	5,8
Восстановление, %	–	–	102	–	93,9	92,9
Критерий Гурвица R [a)]	0,4	0,6	1,1	0,3	0,3	0,8

1 – молоко, подвергнутое высокотемпературной обработке (UHT) с низким содержанием лактозы, невитаминизированное;

2 – готовое к употреблению жидкое детское питание (жидкая каша) с заявленным на этикетке содержанием витамина D_3 – 1,3 мкг/100 г;

3 – растительное масло с добавлением витамина D_3 для совместного испытания;

4 – маргарин с добавлением витамина D_3 для совместного испытания;

5 – сухое детское питание с добавлением витамина D_3 для совместного испытания;

6 – рыбий жир с добавлением витамина D_3 для совместного испытания.

[a)] Все эти значения отличаются от значений, которые даны в [10], так как критерий Гурвица установлен на 22 % меньше, чем 122 ppb (частей на миллиард), в соответствии с [12].

Приложение E
(справочное)

Дополнительный этап предварительной очистки для определения витамина D с использованием препаративной тонкослойной хроматографии

E.1 Дополнительный этап предварительной очистки с использованием препаративной тонкослойной хроматографии (TLC)

E.1.1 Общие положения

Описанный метод тонкослойной хроматографии широко используется для предварительной очистки экстрактов витамина D перед введением препаративной ВЭЖХ. Он был проверен на кормах для поросят с 50 мкг/кг витамина D.

Он имеет следующие преимущества:

– зоны, содержащие витамин D, могут быть легко визуализированы с помощью UV-излучения. В зависимости от матрицы в отношении каждой пробы принимают решение о минимальном размере зоны для разделения D_2/D_3. Таким образом можно свести к минимуму помехи матрицы.

– использование многоэтапной разработки пластин для тонкослойной хроматографии может дополнительно улучшить разделение зон D_2/D_3 и зоны матрицы.

Недостатком этого метода является то, что он не может выполняться автоматически. Время переключения является ограниченным. Более подробная информация по данному методу приведена в [11].

E.1.2 Сущность метода

Кратная часть сырого экстракта после омыления очищается с помощью препаративной тонкослойной хроматографии. С образца, содержащего витамин D_2/D_3, делают соскоб на пластину, которую перемещают в небольшую колонку для экстрагирования витамина D_2/D_3. Объем данного экстракта уменьшают перед применением аналитической ВЭЖХ.

E.1.3 Реактивы

E.1.3.1 Пластины для TLC, например силикагель 60 F 254, Merck 5715 [1], 0,25 мм, 20 × 20 см.

E.1.3.2 Бутилгидрокситолуол.

E.1.3.3 *n*-гексан.

E.1.3.4 Метанол.

E.1.3.5 Ацетон.

E.1.3.6 Диэтиловый эфир.

E.1.3.7 Растворитель для проявления пластины для TLC, смесь 88 мл n-гексан, 2 мл метанола, 10 мл ацетона и 10 мг бутилгидрокситолуола.

E.1.3.8 Растворитель для элюирования изолированной зоны витамина D_2/D_3, смесь 60 мл диэтилового эфира и 40 мл *n*-гексана.

E.1.3.9 Стандартный раствор витамина D_3, 250 мкг/мл в метаноле.

E.1.4 Оборудование

E.1.4.1 ТСХ камера 20 × 20 см для проявления пластин для TLC.

E.1.4.2 Шприц 1 мл газонепроницаемый или подходящая система нанесения проб для TLC.

E.1.4.3 UV-лампа, 254 нм.

E.1.4.4 Открытая трубчатая стеклянная колонка, диаметр 1 см, длина около 15 см, запорный кран из политетрафторэтилена.

E.1.4.5 Небольшой шпатель с острой кромкой.

E.1.5 Методика

Наполняют проявочную камеру растворителем (E.1.3.8) и ждут около 2 ч для пропитывания.

Выпаривают подходящую кратную часть сырого экстракта после омыления досуха при пониженном давлении и сразу же повторно растворяют его в 2 мл *n*-гексана. Наносят 1 мл из этого раствора

[1)] Силикагель 60 F 254, Merc 5715 является примером подходящего продукта, доступного на рынке. Данная информация представлена исключительно для удобства пользователей настоящего стандарта. Это не является рекламой названных изделий со стороны CEN.

в нескольких навесках на пластину для TLC (Е.1.3.1), чтобы получить зону длиной 10 см и не шире 1 см. Для локализации и идентификации наносят от 5 до 10 мкл стандартного раствора витамина D_3 (Е.1.3.9) на обе стороны этой зоны.

Проявляют пластину дважды почти до верхнего края. Для улучшения сортировки может оказаться целесообразным проявлять пластину в несколько этапов. Перед началом новой сортировки после последнего запуска растворитель выпаривают в потоке азота. Визуализируют выделенную зону витамина D_2/D_3, используя UV-излучение (Е.1.4.3), и отмечают карандашом (от 0,5 до 1,5 см). Соскабливают соответствующую зону шпателем (Е.1.4.5) на лист бумаги и переносят ее в открытую трубчатую колонку (Е.1.4.4), заполненную 10 мл растворителя (Е.1.3.8).

Витамин D_2/D_3 элюируют 5 раз в 10 мл растворителя (Е.1.3.8). Выпаривают комбинированные элюаты досуха при пониженном давлении и сразу же растворяют в 1 мл растворителя ВЭЖХ (раствор пробы).

Е.2 Дополнительный этап очистки с использованием колоночной хроматографии

Е.2.1 Методика

Метод очистки используют в колонке, изготовленной из полиэтиленгликоль-целита. Недостатком данного метода очистки является то, что он не может быть выполнен автоматически. Время проведения операций является ограниченным.

Е.2.2 Реактивы

Е.2.2.1 Петролейный эфир, диапазон кипения от 40 °С до 60 °С, дистиллированный.

Е.2.2.2 Петролейный эфир, диапазон кипения от 60 °С до 70 °С, дистиллированный.

Е.2.2.3 Диатомовая земля, кальцинированный поток кальцинированной соды CAS № 68855-54-9.

Е.2.2.4 Сульфат натрия.

Е.2.2.5 Полиэтиленгликоль 600.

Е.2.3 Оборудование

Е.2.3.1 Ротационный испаритель с водяной баней при 40 °С.

Е.2.3.2 Взрывозащищенный высокоскоростной измельчитель.

Е.2.3.3 Хроматографические трубки, длина 30 см, внутренний диаметр 2,5 см, оснащенные краном в нижней части для штепсельной вилки из политетрафторэтилена. Длина 10 см, внутренний диаметр 1,4 см, суженный в нижней части и оснащенный 100 мл резервуаром в верхней части.

Е.2.3.4 UV-лампа, ручная модель для длинноволнового света (366 нм).

Е.2.4 Методика

Е.2.4.1 Подготовка колонки

Готовят суспензию из 25 г диатомовой земли (Е.2.2.3) и 200 мл петролейного эфира (Е.2.2.2) в измельчителе (Е.2.3.2). При перемешивании быстро добавляют 15 мл полиэтиленгликоля (Е.2.2.5) и продолжают перемешивание в течение примерно 20 с.

Альтернативный метод подготовки суспензии с использованием метода, который производит эквивалентное измельчение в порошок полиэтиленгликоля на веществе-носителе. Наливают небольшое количество петролейного эфира (Е.2.2.2) в хроматографическую трубку (Е.2.3.3), помещают на дно деаэрированную ватную пробку и покрывают ее 1-сантиметровым слоем сульфата натрия (Е.2.2.4). Наливают суспензию в бутылку и уплотняют колонку с использованием поршня на стержне до тех пор, пока длина завершенных измерений колонки не достигнет примерно 15 см. В то же время удаляются излишки петролейного эфира. Заливают сверху 1-сантиметровым слоем сульфата натрия.

Е.2.4.2 Изготовление раствора пробы, элюирование и сбор элюата

Перекачивают экстракт из колбы с круглым дном и промывают колбу с использованием трех партий петролейного эфира (Е.2.2.2) примерно по 3 мл из каждой партии. Они также должны быть прокачены в колонку. Элюируют, используя петролейный эфир (Е.2.2.2). Удаляют первые 30 мл элюата. Собирают следующие 50 мл элюата. Продолжают этап очистки SPE (Е.3).

Е.3 Дополнительный этап очистки с использованием SPE

Е.3.1 Методика

Настоящий раздел описывает метод очистки с использованием SPE и окиси кремния. Недостатком данного метода очистки является то, что он не может быть выполнен автоматически. Время проведения операций является ограниченным.

Е.3.2 Реактивы

Е.3.2.1 *n*-гептан р.а.

Е.3.2.2 Диэтиловый эфир.

Удаляет пероксиды путем ежедневной дистилляции осадка KOH после использования.

Е.3.2.3 Петролейный эфир, диапазон кипения от 40 °С до 60 °С, дистиллированный.

Е.3.3 Оборудование

Е.3.3.1 Картридж для твердофазной экстракции Silica, приблизительно 700 мг.

Е.3.3.2 Конические колбы с притертым соединением В 29.

Е.3.4 Выпаривают элюат и растворяют его в 10 мл гептана (Е.3.2.1). Активируют картридж (Е.3.3.1) с 10 мл гептана. Готовят и элюируют 10 мл экстракта пробы. Промывают, используя 10 мл 6%-ного раствора диэтилового эфира (Е.3.2.2) в гептане и элюируют с использованием 20 мл 20%-ного раствора диэтилового эфира (Е.3.2.2) в гептане. Собирают элюат в коническую колбу (Е.3.3.2), испаряют и растворяют его в 1 – 2 мл петролейного эфира (Е.3.2.3). Продолжают этап очистки TLC или полупрепартивной ВЭЖХ.

Библиография

[1] Johnson, H., Hessel, H. and Thorzell, K. Internat. J. Vitamin and Nutr. Res., 1987, 57, 357 – 365
(Витамины и питательные вещества)

[2] Johnson, H., Halen, B., Hessel, H., Nyman, A. and Thorzell, K. Internat. J. Vitamin and Nutr. Res., 1989, 59, 262 – 268
(Витамины и питательные вещества)

[3] Reynolds, S. L. and Judd, H. J. The Analyst, 1984, 109, 489 – 492
(Аналитик)

[4] Bognar, A. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1992, 194, 469 – 475
(Исследование продуктов питания)

[5] Van den Berg, J. Agric. Fd. Chem., 1986, 34, 264 – 268

[6] Mattila, P. J., Piironen, V., Backman, C., Asunmaa, A., Uusi-Rauva, E. and Koivistoinen, P., J. Food Comp. Anal., 1992, 5, 281 – 290
(Состав и анализ продуктов питания)

[7] Lumley, I. D., Lawrance, P. R. J. Micronutrient Anal., 1990, 7, 301 – 313
(Анализ микроэлементов в пище)

[8] Finglas, P. M., van den Berg, H. and de Froidmont-Gortz, I., 1997. 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, Commission of the European Union, Luxemburg
(Сертификация массовых долей витаминов в трех эталонных материалах: маргарин (CRM), порошковое молоко (CRM 421), лиофилизированный порошок брюссельской капусты (CRM 431))

[9] The Pharmaceutical Codex, incorporating the British Pharmaceutical Codex, 11th Edition, The Pharmaceutical Press, 1979

[10] Staffas, A., Nyman, A., J. AOAC Int., 2003, 86, 400 – 406

[11] Methode 13.8.1 (Method 13.8.1): Die Bestimmung von Vitamin D – Verfahren; in: Methodenbuch 3.4. Ergänzungslieferung 1997. VDLUFA Verlag Deutschland
(Определение витамина D. Метод ВЭЖХ)

[12] Thompson, M. 2000, 125, 385 – 386

[13] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development, Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies p. 23 – 51
(Программа официальных методов AOAC, руководство рецензентов ассоциации по разработке, анализу, проверке и одобрению процесса. Часть IV. Руководящие указания AOAC по совместным исследованиям)

[14] ISO 5725:1986 Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Определение сходимости и воспроизводимости для стандартного метода испытаний при проведении межлабораторных испытаний)

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 24.07.2012. Подписано в печать 10.09.2012. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 2,32 Уч.- изд. л. 1,20 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