ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

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

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Вызначэнне змяшчэння вітаміну А метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі

Частка 1

Вымярэнне колькасці поўнага транс-рэтынолу і 13-цыс-рэтынолу

(EN 12823-1:2000, 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: витамин А, ретинол, 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 12823-1:2000 Foodstuffs – Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography – Part 1: Measurement of all-trans-retinol and 13-cis-retinol (Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Часть 1. Измерение количества полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола) Европейского комитета по стандартизации (CEN).

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 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 государственного стандарта ссылочному европейскому стандарту 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 4
6 Отбор проб. 4
7 Проведение испытания. 4
8 Расчет 6
9 Прецизионность результатов 7
10 Протокол испытаний 7
Приложение А (справочное) Примеры высокоэффективных жидкостных хроматограмм. 8
Приложение В (справочное) Данные прецизионности 9
Приложение С (справочное) Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии 10
Библиография. 11
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному европейскому стандарту 12

Введение

Настоящий 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 содержания β-каротина.

Настоящий стандарт представляет собой основу для аналитических методов. Он предназначен для использования в качестве основы, в которой аналитик может оценить свою собственную аналитическую работу в соответствии со стандартной процедурой.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
Часть 1
Измерение количества полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Вызначэнне змяшчэння вітаміну А метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі
Частка 1
Вымярэнне колькасці поўнага транс-рэтынолу і 13-цыс-рэтынолу

Foodstuffs
Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography
Part 1
Measurement of all-trans-retinol and 13-cis-retinol

Дата введения 2013-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина А в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение содержания витамина А осуществляется посредством измерения содержания полного транс-ретинола, 13-цис-ретинола и бета-каротина. В данную часть включено измерение содержания полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола. Экстракт, полученный после омыления в данном методе, может быть использован для определения бета-каротина в соответствии с методом, установленным в EN 12823-2:2000 «Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Часть 2. Определение содержания β-каротина».

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. 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

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

3 Сущность метода

Ретинол омыляют с помощью метанольного или этанольного раствора гидроксида калия и экстрагируют посредством соответствующего растворителя. Определение проводят методом ВЭЖХ с флуорометрическим (Ф) или ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Вещества идентифицируют на основании времени удерживания и количественно определяют с помощью метода внешнего стандарта с использованием площадей или высоты пиков [1] – [4].

4 Реактивы

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

4.1 Метанол.

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

Издание официальное

4.3 Этанол, φ (C_2H_5OH) = 96 %.

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 объемных частей этанола и воды 9 : 1.

4.6 Антиоксиданты, например аскорбиновая кислота (АК), аскорбат натрия, сульфид натрия (Na S), бутилгидрокситолуол (БГТ), пирогаллол или гидрохинон.

4.7 Растворители для экстракции, например диэтиловый эфир (без пероксида), *ди*-изопропиловый эфир, петролейный эфир (с диапазоном кипения 40 °С – 60 °С), *n*-гексан, бутанол или соответствующие смеси из веществ, перечисленных в настоящем пункте.

4.8 Подвижные фазы ВЭЖХ

Примеры соответствующих смесей (в объемных долях) включают в себя:
– *n*-гексан + 2-пропанол (98 : 2);
– *изо*-октан + 2-пропанол (98,5 : 1,5);
– *изо*-октан + *изо*-бутанол (98 : 2);
– *n*-гексан + *n*-бутанол (98 : 2);
– 2-пропанол + *n*-гептан, градиент от (0,5 : 99,5) до (8,5 : 91,5) за 12 мин.

4.9 Стандартные вещества

4.9.1 Общие положения

Полный транс-ретинол (полный транс-витамин А, спиртовая форма) и 13-цис-ретинол существуют в нескольких формах и могут быть приобретены у различных поставщиков. Поэтому необходимо определить концентрацию калибровочного раствора спектрометрически (4.10.4). Если используются сложные эфиры витамина (например, ретинил-пальмитат или ацетат), то их концентрацию проверяют после омыления (см. 7.3.1).

Примечание – Особое внимание следует уделить информации о содержании витамина А в стандартных веществах, поставляемых различными производителями.

4.9.2 Полный транс-ретинол, спиртовая форма витамина А, М ($C_{20}H_{30}O$) = 286,5 г/моль, со степенью чистоты не менее 90 %.

4.9.3 Сложные эфиры витамина А.

4.9.3.1 Ретинил-пальмитат, витамин А, пальмитат, М ($C_{36}H_{60}O_2$) = 524,9 г/моль.

4.9.3.2 Ретинил-ацетат, витамин А, ацетат, М ($C_{22}H_3O_2$) = 328,5 г/моль, со степенью чистоты не менее 90 %.

4.9.4 13-цис-ретинол, М ($C_{20}H_{30}O$) = 286,5 г/моль, со степенью чистоты не менее 60 %, для качественного определения.

4.10 Основные и стандартные растворы

4.10.1 Основной раствор полного транс-ретинола

Взвешивают примерно 50 мг полного транс-ретинола (4.9.2) с точностью до 1 мг в мерной колбе с одной меткой вместимостью 100 мл, растворяют в *n*-гексане или другом соответствующем растворителе (4.7) и доводят раствор до отметки тем же растворителем. Основной раствор содержит приблизительно 0,5 мг/мл.

Взвешивают 100 мг ретинил-пальмитата (4.9.3.1) или 50 мг ретинил-ацетата (4.9.3.2) с точностью до 1 мг в мерной колбе с одной меткой вместимостью 100 мл и проводят манипуляции, как описано для полного транс-ретинола, кроме концентраций, которые будут определяться после омыления (7.3.1).

Альтернативные массы и объемы могут использоваться по 4.10.4 в соответствии с хроматографическим разделением и количественным определением.

Хранят основной раствор в защищенном от света месте при температуре не выше 4 °С.

4.10.2 Основной раствор 13-цис-ретинола

Взвешивают примерно от 1 до 2 мг 13-цис-ретинола (4.9.4) с точностью до 0,1 мг в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл, растворяют в абсолютном этаноле (4.2) или в другом соответствующем растворителе и доводят раствор до метки. Раствор содержит приблизительно от 10 до 20 мкг/мл, его используют только для идентификации.

4.10.3 Стандартный раствор полного транс-ретинола

Пипеткой переносят 5 мл основного раствора полного транс-ретинола (4.10.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл и доводят до метки *n*-гексаном (4.7) или другим соответствующим растворителем, совместимым с подвижной фазой. Пипеткой переносят 5 мл этого раствора в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 мл и доводят до метки тем же растворителем. Концентрация транс-ретинола в стандартном растворе приблизительно равна 2,5 мкг/мл. Затем проводят проверку его концентрации и чистоты в соответствии с 4.10.4.

Основные растворы ретинил-пальмитата или ретинил-ацетата (4.10.1) можно использовать для приготовления стандартного раствора. В этом случае омыляют растворы в условиях, описанных в 7.3.1. После экстракции и выпаривания повторно растворяют остаток в *n*-гексане или ином соответствующем растворителе и далее проводят манипуляции, как в случае с основным раствором полного транс-ретинола.

Хранят стандартный раствор в защищенном от света месте при температуре не выше 4 °С.

4.10.4 Проверка концентрации и чистоты

Готовят стандартный раствор полного транс-ретинола в этаноле и измеряют оптическую плотность в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при максимальной длине волны от 325 до 326 нм с этанолом в сравнительной кювете.

Вычисляют массовую концентрацию полного транс-ретинола $\rho_{all\text{-}T}$, мкг/мл, по формуле

$$c_{all\text{-}T} = \frac{A_{all\text{-}T} \cdot 10^4}{1830} \cdot P. \qquad (1)$$

Вычисляют массовую концентрацию ρ_{13cis} 13-цис-ретинола, мкг/мл, по формуле

$$c_{13cis} = \frac{A_{13cis} \cdot 10^4}{1686} \cdot P, \qquad (2)$$

где $A_{all\text{-}T}$ – значение абсорбции при максимальной длине волны от 325 до 326 нм;

A_{13cis} – значение абсорбции при максимальной длине волны 328 нм;

1830 – значение $E^{1\%}_{1см}$ для полного транс-ретинола, растворенного в этаноле. Это значение может изменяться в зависимости от вида используемого растворителя;

1686 – значение $E^{1\%}_{1см}$ для 13-цис-ретинола, растворенного в метаноле. Это значение может изменяться в зависимости от вида используемого растворителя;

P – поправочный коэффициент для чистоты полного транс-ретинола или 13-цис-ретинола, определенный с помощью ВЭЖХ, вычисляют по формуле

$$P = \frac{B}{B_{total}}, \qquad (3)$$

где B – площадь пика или высота стандартного раствора полного транс-ретинола или 13-цис-ретинола (4.10.3);

B_{total} – суммарная площадь пиков или высот стандартного раствора полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола (4.10.3).

При использовании стандартных веществ витамина А, вновь приобретенного или хранящегося в течение длительного периода, проверяют, находится ли значение максимальной абсорбции стандартного раствора полного транс-ретинола (4.10.3) в диапазоне длин волн между 325 и 326 нм, используя соответствующий спектрометр.

Для дальнейшей проверки показателей витамина А измеряют оптическую плотность стандартного раствора в кварцевой кювете при длине волны 300, 350 и 370 нм относительно 2-пропанола (или другого подходящего растворителя, см. 4.7). Определяют следующее соотношение для каждой длины волны:

$\frac{E}{E_{325}}$ для полного транс-ретинола.

Если это соотношение не превышает 0,602 (300 нм), 0,452 (350 нм) и 0,093 (370 нм) для спиртовой формы витамина А, то стандартное вещество пригодно для использования [5], [6].

Для ретинил-пальмитата (4.9.3.1) определяют соотношение E/E326 при длине волн 300, 350 и 370 нм относительно 2-пропанола (или другого подходящего растворителя). Если соотношение не превосходит 0,593 (300 нм), 0,537 (350 нм) и 0,142 (370 нм), то стандартное вещество пригодно для использования по [5], [6], [7].

5 Аппаратура и приборы

Для проведения измерений используют стандартное лабораторное оборудование.

5.1 УФ-ВОС спектрометр, применяемый для измерения оптической плотности при определенной длине волны, с кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 1 см.

5.2 Роторный испаритель, с водяной баней и вакуумным насосом.

Примечание – Рекомендуется использовать азот для восстановления атмосферного давления.

5.3 Система ВЭЖХ, состоящая из высокоэффективного жидкостного хроматографа, насоса, устройства для ввода пробы, УФ-ВОС детектора или флуоресцентного детектора и интегратора данных/устройства обработки данных.

5.4 Колонки для ВЭЖХ

Применяют аналитические стандартные колонки, например LiChrospher® Si 60 [1)] (5 мкм, 250 × 4 мм) и LiChrosorb® Si 60 [1)] (5 мкм, 250 × 4 мм и 125 × 4 мм). Критерий выбора подходящей колонки основан на разделении полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола.

Допускается использовать колонки других типов и размеров, отличающиеся от установленных в настоящем стандарте. Условия для проведения хроматографии должны быть подобраны к таким колонкам с целью гарантии получения адекватных результатов.

5.5 Устройство для фильтрования

Чтобы отфильтровать подвижные фазы ВЭЖХ и растворы проб, используют устройства для фильтрации крупных и небольших размеров соответственно, например с размером пор 0,45 мкм.

Примечание – Фильтрация подвижной фазы, а также раствора анализируемой пробы через мембранный фильтр перед использованием или введением увеличивает долговечность колонок.

5.6 Экстракционные колонки (дополнительные), например Extrelut® [1)].

5.7 Фильтры для разделения фаз (дополнительные).

6 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с EN ISO 5555.

7 Проведение испытания

7.1 Общие положения

Витамин А чувствителен к УФ-излучению и окислителям (например, атмосферному кислороду). Поэтому необходимо исключить воздействие УФ-света (используя посуду из темного стекла, алюминиевую фольгу или ***УФ-абсорбционные материалы***) и кислорода (промывание азотом) при работе с ним. В частности, воздух над жидкостью при омылении должен быть вытеснен слоем азота. Испарение растворителей должно проводиться при пониженном давлении с использованием ротационного испарителя (5.2) при температуре не выше 50 °С.

7.2 Приготовление пробы

Анализируемую пробу гомогенизируют. Измельчают грубый материал при помощи мельницы и тщательно перемешивают. Чтобы предотвратить длительное воздействие на пробу высокой температуры, ее необходимо предварительно охладить.

7.3 Приготовление раствора пробы

7.3.1 Омыление

Омыляют от 2 до 10 г анализируемой пробы желательно в атмосфере азота, используя соответствующее количество метанола (4.1) или этанола (4.3), антиоксиданты (4.6) (необязательно) и один из растворов гидроксида калия (4.5). Если используют такие антиоксиданты, как аскорбиновая кислота (АК), пирогаллол или бутилгидрокситолуол, то их необходимо добавлять к пробе перед внесением раствора гидроксида калия. Можно также добавить сульфид натрия, чтобы устранить влияние окислительного каталитического воздействия следовых количеств металлов.

[1)] LiChrospher™ Si 60 – это пример продукта, имеющегося в продаже. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанного продукта.

Примеры подходящих соотношений реагентов приведены в таблице 1.

Таблица 1

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

Омыление обычно длится от 15 до 40 мин при температуре от 80 °С до 100 °С. Омыление также может быть проведено при комнатной температуре в течение ночи (приблизительно 16 ч) при тех же условиях.

Если после омыления и охлаждения на поверхности омыленной смеси присутствует жир или масло, добавляют дополнительное количество этанолового раствора гидроксида калия и увеличивают время омыления.

7.3.2 Экстрагирование

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

Экстрагирование ретинола из омыленного раствора пробы проводят соответствующим растворителем или соответствующей смесью растворителей (4.7) и процедуру повторяют 3 – 4 раза с объемами растворителя от 50 до 150 мл. Промывают комбинированные экстракты водой до нейтральной среды (2 – 4 раза, объем воды от 50 до 150 мл). Экстрагировать также можно с помощью системы жидкостной экстракции (например, Extrelut@ [2)]), если содержание ретинола не очень низкое и содержание жира в пробе меньше 10 % [1].

7.3.3 Концентрирование

Экстракт отгоняют на ротационном испарителе (5.2) при пониженном давлении и температуре не более 50 °С. Удаляют следы воды высушиванием с сульфатом натрия (4.4) или посредством азеотропной перегонки с абсолютным этанолом (4.2) или используют фильтровальную бумагу для разделения фаз (5.5).

7.3.4 Разведение

Повторно растворяют остаток в подвижной фазе (4.8) или в другом совместимом с ВЭЖХ растворителе для получения соответствующей концентрации для ввода в колонку ВЭЖХ (5.4). Это раствор анализируемой пробы.

7.4 Приготовление стандартных растворов

Используя стандартные растворы (4.10.3), готовят градуировочные растворы для ВЭЖХ, используя соответствующие растворители, удовлетворяющие аналитическим требованиям.

7.5 Идентификация и проверка чистоты

Идентифицируют полный транс-ретинол и 13-цис-ретинол, сравнивая время удержания пробы с временем удержания стандартных растворов, полученным при тех же условиях хроматографирования. Также идентификацию пиков можно осуществить, добавляя стандартные вещества в раствор анализируемой пробы.

Примечание 1 – Разделение и количественное определение будут удовлетворительными, если будут выполняться следующие хроматографические условия (также рисунок А.1). Для альтернативных систем ВЭЖХ см. таблицу С.1.

Колонка:	Merck LiChrosorb® Si 60,5 мкм
Размер колонки:	250 × 4 мм
Подвижная фаза:	гексан + *n*-бутанол (98 + 2) (объемные части)
Поток:	2 мл/мин
Объем введенной пробы:	50 μм
Детектор:	флуоресцентный, возбуждение: 325 нм, эмиссия: 475 нм УФ: 325 нм

[2)] См. сноску [1)].

Проверяют чистоту стандартных растворов полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола посредством ввода соответствующего объема (например, 20 мкл) стандартного раствора (4.10.3), содержащего приблизительно 10 мкг полного транс-ретинола или 13-цис-ретинола в микролитре, в систему ВЭЖХ. Интегрируют площади или высоту пиков полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола и, если необходимо, корректируют массовую концентрацию стандартного раствора полного транс-ретинола.

Примечание 2 – Свежеприготовленный стандартный раствор полного транс-ретинола (4.10.3) обычно не содержит 13-цис-ретинола или других пиков, указывающих на присутствие примесей. Эфирная форма витамина А (ретинил-пальмитат или ацетат) может содержать некоторое количество 13-цис-ретинола после омыления.

7.6 Определение

Вводят соответствующий объем (например, 20 мкл) стандартного раствора (4.10.3) и раствора анализируемой пробы (7.3.4) в систему ВЭЖХ (5.3). Чтобы провести определение методом внешнего стандарта, интегрируют площади пиков или определяют высоту пиков, полученных при исследовании раствора анализируемой пробы, и сравнивают результаты с соответствующими значениями стандартных веществ, имеющих подобное время удержания, или строят калибровочную кривую.

Вводят равные объемы раствора анализируемой пробы и стандартных растворов, приготовленных с использованием растворителей, совместимых с ВЭЖХ-системой, или компенсируют в вычислениях результаты соответствующей поправкой (раздел 8). Проверяют линейность калибровочной кривой.

Примечание – Метод внутреннего стандарта также может быть использован, если в результате соответствующих испытаний получены такие же характеристики внутреннего стандарта, как и самого анализируемого вещества. Кроме того, соответствующие вещества могут быть добавлены к раствору анализируемой пробы перед вводом в колонку ВЭЖХ для количественного определения [6].

7.7 Количество определений

Выполняют не менее двух независимых определений.

8 Расчет

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

Вычисляют массовую концентрацию $\rho_{\text{all-trans}}$ полного транс-ретинола в пробе, мг/100 г, по формуле

$$c_{\text{all-trans}} = \frac{A_s \cdot C_{\text{all-T}} \cdot V_s \cdot V_{\text{St}} \cdot 100}{A_{\text{all-T}} \cdot m \cdot V_{\text{is}} \cdot 1000}, \quad (4)$$

где A_S – площадь пика или высота полного транс-ретинола, полученные при исследовании раствора анализируемой пробы (7.3.4), в единицах площади или высоты;

$C_{\text{all-T}}$ – концентрация полного транс-ретинола, измеренная УФ-спектрометром (5.1) в стандартном растворе (7.4), мкг/мл;

V_S – общий объем раствора анализируемой пробы (7.3.4), мл;

V_{St} – объем введенного стандартного раствора (7.4), мкл;

100 – коэффициент пересчета массовой концентрации на 100 г;

$A_{\text{all-T}}$ – площадь пика или высота, полученные при исследовании стандартного раствора полного транс-ретинола (7.4), в единицах площади или высоты;

m – масса навески пробы, г;

V_{is} – объем введенного раствора анализируемой пробы, мкл;

1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы.

Вычисляют массовую концентрацию $\rho_{\text{13-cis}}$ 13-цис-ретинола, мг/100 г, по формуле

$$c_{\text{13-cis}} = \frac{A_{13-S} \cdot C_{\text{all-T}} \cdot V_s \cdot V_{\text{St}} \cdot 100}{A_{\text{all-T}} \cdot F_R \cdot m \cdot V_{\text{is}} \cdot 1000}, \quad (5)$$

где $A_{13\text{-}S}$ – площадь пика или высота 13-цис-ретинола, полученные при исследовании раствора анализируемой пробы (7.3.4), в единицах площади или высоты;

$C_{\text{all-T}}$ – концентрация полного транс-ретинола, измеренная с помощью УФ-спектрометра (5.1) в стандартном растворе (7.4), мкг/мл;

V_S – общий объем раствора анализируемой пробы (7.3.4), мл;

V_{St} – объем введенного стандартного раствора (7.4), мкл;

100 – коэффициент пересчета массовой концентрации на 100 г;

$A_{\text{all-T}}$ – площадь пика или высота полного транс-ретинола, полученные при исследовании стандартного раствора (7.4), в единицах площади или высоты;

m – масса навески пробы, г;
V_{is} – объем введенного раствора анализируемой пробы, мкл;
1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы;
F_R – коэффициент соответствия 13-цис-ретинола полному транс-ретинолу, определенный с помощью ВЭЖХ с использованием стандартного раствора известной концентрации, вычисляют по формуле

$$F_R = \frac{B_{13cis} \cdot C_{all\text{-}T}}{B_{all\text{-}T} \cdot C_{13cis}}, \quad (6)$$

где B_{13cis} – площадь пика или высота, полученные при исследовании стандартного раствора 13-цис-ретинола;
$B_{all\text{-}T}$ – площадь пика или высота, полученные при исследовании стандартного раствора полного транс-ретинола;
C_{13cis} – массовая концентрация стандартного раствора 13-цис-ретинола;
$C_{all\text{-}T}$ – массовая концентрация стандартного раствора полного транс-ретинола.

9 Прецизионность

9.1 Общие положения

Результаты межлабораторных испытаний прецизионности методов приведены в приложении В. Данные, полученные в исследованиях, могут быть применены только для диапазонов концентраций и образцов, приведенных в приложении В.

9.2 Повторяемость

Абсолютная разность между независимыми результатами анализа, полученными на идентичном анализируемом материале одним и тем же оператором, который использовал одно и то же оборудование в пределах самого короткого промежутка времени, не должна превышать предел повторяемости r более чем в 5 % случаев.

Значения:

Маргарин	полный транс-ретинол	$\bar{x}$ = 729 мкг/100г	r = 78,4 мкг/100 г
	13-цис-ретинол	$\bar{x}$ = 39 мкг/100г	r = 8,4 мкг/100 г
Сухое молоко	полный транс-ретинол	$\bar{x}$ = 653 мкг/100г	r = 39,2 мкг/100 г
	13-цис-ретинол	$\bar{x}$ = 30 мкг/100г	r = 4,2 мкг/100 г

9.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между результатами двух анализов идентичного материала, анализируемого в двух лабораториях, не должна превышать предел воспроизводимости R более чем в 5 % случаев.

Значения:

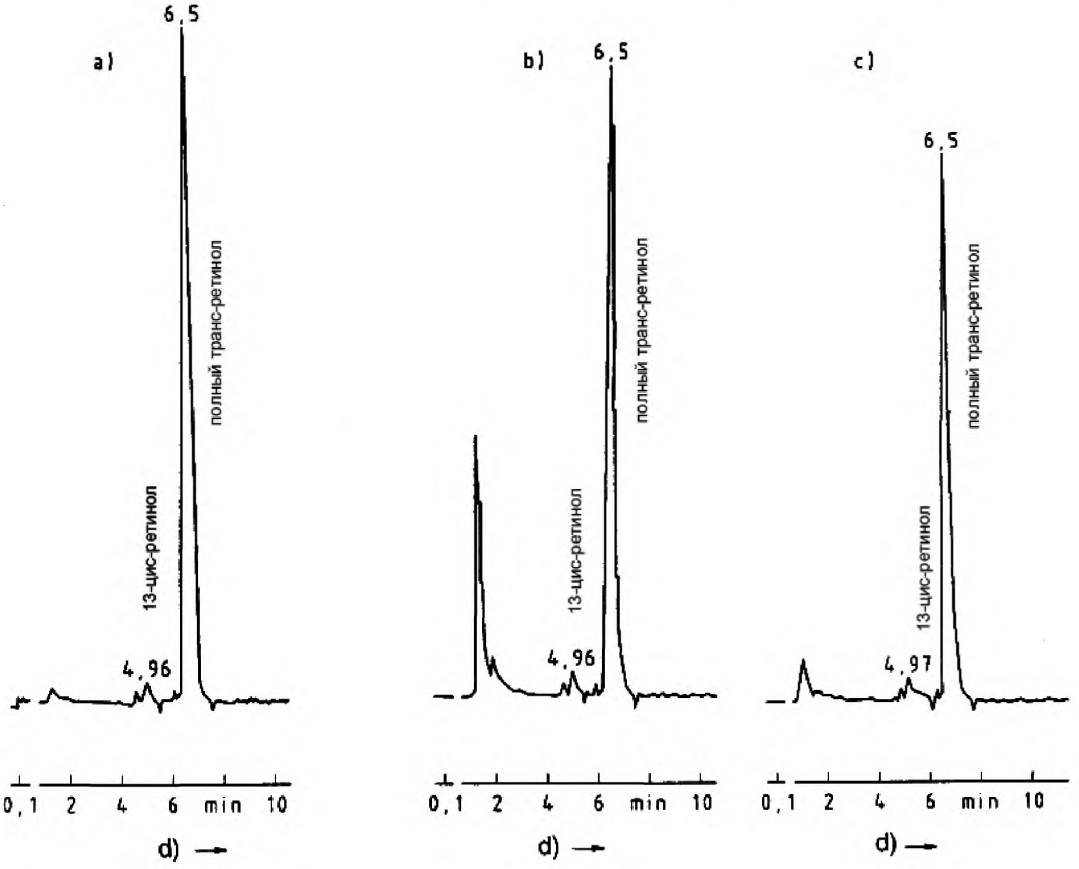
Маргарин	полный транс-ретинол	$\bar{x}$ = 729 мкг/100г	R =204,4 мкг/100 г
	13-цис-ретинол	$\bar{x}$ = 39 мкг/100г	R = 33,6 мкг/100 г
Сухое молоко	полный транс-ретинол	$\bar{x}$ = 653 мкг/100г	R = 61,6 мкг/100 г
	13-цис-ретинол	$\bar{x}$ = 30 мкг/100г	R = 20,2 мкг/100 г

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующие данные:
– всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
– ссылку на настоящий стандарт или на другой используемый метод;
– результаты и единицы измерения, в которых выражены результаты;
– дату и методику отбора проб (если известно);
– дату получения пробы;
– дату проведения испытания;
– любые особенности, которые наблюдались в ходе проведения испытания;
– любые операции, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые в качестве дополнительных, которые могли повлиять на результаты.

Приложение А
(справочное)

Примеры высокоэффективных жидкостных хроматограмм



d)	– время;
колонка	– Merck LiChrosorb® Si 60 (5 мкм);
размер колонки	– 250 × 4 мм;
подвижная фаза	– *n*-гексан + *n*-бутанол (98 : 2) (объемные части);
поток	– 2 мл /мин;
детектор	– флуоресцентный, возбуждение: 325 нм, эмиссия: 475 нм.

Рисунок А.1 – Высокоэффективные жидкостные хроматограммы стандартного раствора витамина А a), витамина А в маргарине b) и сухого молока c)

Приложение В
(справочное)

Данные прецизионности

В соответствии с Руководством по анализу сертификации EU MAT данные, приведенные в таблице В.1, были получены в результате межлабораторных исследований [3]. Исследования проводились Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom.

Таблица В.1

Проба	Маргарин (CRM 122)*		Сухое молоко (CRM 421)*	
	полный транс-ретинол	13-цис-ретинол	полный транс-ретинол	13-цис-ретинол
Год межлабораторного испытания	1994	1994	1994	1994
Количество лабораторий	9	5	8	5
Количество проб	2	2	2	2
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко отклоняющихся значений	9	5	6	5
Количество резко отклоняющихся значений (лабораторий)	0	0	2	0
Количество полученных результатов	45	25	40	21
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/100 г	729	39	653	30
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/100 г	28	3	14	1,5
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	3,8	7,7	2,1	5,0
Предел повторяемости при r, мкг/100 г	78,4	8,4	39,2	4,2
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	73	12	22	7,2
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	10,0	30,8	3,4	24,0
Предел воспроизводимости R, мкг/100 г	204,4	33,6	61,6	20,2
* CRM = Сертифицированный стандартный материал.				

Приложение С
(справочное)

Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии

Разделение и количественное определение полного транс-ретинола и 13-цис-ретинола оказывались удовлетворительными, если соблюдались хроматографические условия, приведенные в таблице С.1 [3].

Таблица С.1

Колонка (размер частиц)	Параметры (длина х диаметр)	Подвижная фаза (объемные доли)	Детектирование (λ/нм)
LiChrospher® Si 60 (5 мкм),	250 × 4 мм	*n*-гексан + 2-пропанол (98 : 2)	Ф (325/480)
LiChrosorb® Si 60 (5 мкм),	250 × 4 мм	*n*-гексан + *n*-бутанол (98 : 2)	Ф (325/475)
LiChrosorb® Si 60 (5 мкм),	250 × 4 мм	*изо*-пропанол: *n*-гептан, содержание градиентов от (0,5 : 99,5) до (8,5 :+ 91,5) за 12 мин	УФ 325

Библиография

[1] Bourgeois, C.F. and Ciba 1988. Disposal cartridge extraction of retinol and alpha-tocopherol from fatty samples. J.A.O.A.C 71 (1), 12 – 15
(Удаление патронной экстракцией ретинола и альфа-токоферола из жирных образцов)

[2] Leth, T., 1993. Vitamin A in Danish pig, calf and ox liver. J. Food Composition & Analysis 6, 3 – 9
(Витамин А в печени датских свиней, телят и быков)

[3] Finglas, P.M., van der Berg, H. & 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 (CRM 431). EUR-Report 18039, Commission of the European Union, Luxembourg
(Сертификация массовых фракций витаминов в трех образцах маргарина (CRM 122), сухом молоке и лиофилизированной брокколи (CRM 431))

[4] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Vitamin A in diatetischen Lebensmitteln L 49.00-3, Mai 1985 (Food Analysis: Determination of vitamin A in dietetic foodstuffs L 49.00-3, 1985-05) in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenstanden/Bundesgesundheitsamt (In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office) Loseblattausgabe, Stand Februar 1996 Bd. 1 (Loose leaf edition, as of 1996-02 Vol. I.) Berlin, Koln: Beuth Verlag GmbH
(Анализ кормов: Определение витамина А в диетических продуктах питания)

[5] Takashima, Y. и др. Stability of retinol analogs. Chem. Pharm. Bull. 27, 1553
(Стабильность аналогов ретинола)

[6] Bolliger, M.R. et al., 1977. The monograph of vitamin A in the European Pharmacopoeia. Pharm. Acta. Helv. 52 (8), 161 – 174
(Монография витамина А в Европейской Фармакопее)

[7] Arens, M. and Gertz, Chr, 1996. Gehaltsbestimmung von Vitamin A-Standardsubstanzen – Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, 124. Mitt.; (Determination of vitamin A content in standard substances – German methods for analysis of fats, fat products, tensids and related products, 124. ann) Fett/Lipid, VCH Verlag, Weinheim, 98, Nr. 5, S. 185 – 187
(Определение витамина А в стандартных веществах)

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному европейскому стандарту

Таблица Д.А.1 – 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. 0,83 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