ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ EN 12822-2012

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение содержания витамина Е методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Измерение количества α-, β-, γ- и δ-токоферолов

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Вызначэнне змяшчэння вітаміну Е метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі. Вымярэнне колькасці α-, β-, γ- і δ-такаферолаў

(EN 12822:2000, IDT)

Издание официальное

Б3 9-2011

Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 664:543.645.5:543.544.5.068.7(083.74)(476) МКС 67.050 КП 06 IDT

Ключевые слова: токоферол, высокоэффективная жидкостная хроматография, стандартный раствор, антиоксиданты, пищевые продукты

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 18 января 2012 г. № 4

3 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 12822:2000 Foodstuffs – Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography – Measurement of α-, β-, γ- and δ-tocopherols (Продукты пищевые. Определение содержания витамина Е методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Измерение количества α-, β-, γ- и δ-токоферолов).

Европейский стандарт разработан техническим комитетом 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 3
6 Отбор проб 4
7 Проведение испытания 4
8 Расчет 6
9 Прецизионность 6
10 Протокол испытаний 7
Приложение А (справочное) Примеры высокоэффективных жидкостных хроматограмм 8
Приложение В (справочное) Данные прецизионности 10
Приложение С (справочное) Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии 12
Библиография 13
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии государственного стандарта ссылочному европейскому стандарту 15

Введение

Поскольку настоящий стандарт устанавливает методику измерения массовой доли α-, β-, γ- и δ-токоферолов в пищевых продуктах, приводятся ссылки на литературу по расчету и выражению содержания витамина Е в единицах биологической активности [1], [2], [3].

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Определение содержания витамина Е методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Измерение количества α-, β-, γ- и δ-токоферолов

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Вызначэнне змяшчэння вітаміна Е метадам высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі. Вымярэнне колькасці α-, β-, γ- и δ-такаферолаў

Foodstuffs
Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography
Measurement of α-, β-, γ- and δ-tocopherols

Дата введения 2012-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина Е в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение содержания витамина Е осуществляют посредством измерения α-, β-, γ- и δ-токоферолов.

Активность витамина Е можно рассчитать по содержанию токоферолов, учитывая соответствующие факторы, указанные во введении.

2 Нормативные ссылки

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

EN ISO 3696:1995 Вода для лабораторного анализа. Технические условия и методы испытания

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

3 Сущность метода

Измерение количества α-, β-, γ- и δ-токоферолов осуществляют в соответствующем растворе пробы посредством высокоэффективного жидкостного хроматографического (ВЭЖХ) разделения и последующего фотометрического [ультрафиолетовый (УФ) диапазон] или, предпочтительно, флуорометрического определения. В большинстве случаев необходимо омыление анализируемой пробы с последующей экстракцией. Идентификацию проводят по времени удерживания пиков и по количественному определению с помощью метода внешнего стандарта, используя значения площади пика и высоты пика. Методы внутреннего стандарта можно также использовать, если соответствующие исследования восстановления подтверждают такой же характер изменения внутреннего стандарта во время анализа, как и самого анализируемого вещества [4] – [13].

4 Реактивы

В ходе анализа используют реактивы только признанной аналитической 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 %.

4.3 Этанол, φ (C_2H_5OH) = 96 %.

4.4 Сульфат натрия, безводный.

Издание официальное

4.5 Растворы KOH для омыления, в подходящих концентрациях, например (KOH) = 50г/100 мл или 60 г/100 мл, или спиртовые растворы, например 28 г KOH в 100 мл смеси этанола и воды 9 : 1.

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

4.7 Растворители для экстракции, например диэтиловый эфир (без пероксида), дихлорметан, петролейный эфир (диапазон кипения от 40 °С до 60 °С), *n*-гексан, этилацетат или соответствующие смеси из вышеперечисленных в настоящем пункте веществ.

4.8 Подвижная фаза ВЭЖХ: соответствующие смеси, выраженные в объемных долях, например 3 % 1,4-диоксана или 0,5 % 2-пропанола, 3 % трет-бутилметилового эфира в *n*-гексане или *n*-гептане для хроматографии с нормальными фазами (НФ) или 1 % – 10 % воды в метаноле для обращенно-фазовой (ОФ) хроматографии.

В случае альтернативных систем ВЭЖХ см. приложение С.

4.9 Стандартные вещества

4.9.1 Общие положения

β-, γ- и δ-токоферолы можно получить у фармацевтической и химической компании Merck [1)]; α-токоферол можно получить у различных поставщиков. Чистота стандартных веществ токоферола может варьировать от 90 % до 100 %. Поэтому необходимо определить концентрацию калибровочного раствора с помощью УФ-спектрометра (см. проверку степени чистоты 4.10.5).

4.9.2 α-токоферол, M ($C_{9}H_{50}O_2$) = 430,7 г/моль, с массовой долей не менее 95 %, α-токоферол ацетат, M ($C_{31}H_{52}O_3$) = 472,7 г/моль можно также использовать в качестве стандартного вещества после омыления.

4.9.3 β-токоферол, M ($C_{8}H_{48}O_2$) = 416,7 г/моль, с массовой долей не менее 90 %.

4.9.4 γ-токоферол, M ($C_{28}H_{48}O_2$) = 416,7 г/моль, с массовой долей не менее 90 %.

4.9.5 δ-токоферол, M ($C_{7}H_{46}O_2$) = 402,6 г/моль, с массовой долей не менее 90 %.

4.10 Основные растворы

4.10.1 Основной раствор α-токоферола

Растворяют 10 мг стандартного вещества α-токоферола (4.9.2), взвешенного с точностью до 1 мг, в 100 мл соответствующего растворителя, например *n*-гексана для НФ-хроматографии или метанола для ОФ-хроматографии.

4.10.2 Основной раствор β-токоферола

Растворяют 10 мг стандартного вещества β-токоферола (4.9.3), взвешенного с точностью до 1 мг, в 100 мл соответствующего растворителя, например *n*-гексана для НФ-хроматографии или метанола для ОФ-хроматографии.

4.10.3 Основной раствор γ-токоферола

Растворяют 10 мг стандартного вещества γ-токоферола (4.9.4), взвешенного с точностью до 1 мг, в 100 мл соответствующего растворителя, например *n*-гексана для НФ-хроматографии или метанола для ОФ-хроматографии.

4.10.4 Основной раствор δ-токоферола

Растворяют 10 мг стандартного вещества δ-токоферола (4.9.5), взвешенного с точностью до 1 мг, в 100 мл соответствующего растворителя, например *n*-гексана для НФ-хроматографии или метанола для ОФ-хроматографии.

4.10.5 Проверка концентрации и чистоты

Измеряют оптическую плотность основных растворов (4.10.1 – 4.10.4) при соответствующей длине волны, используя УФ-спектрометр (5.1). Если в качестве растворителя используют *n*-гексан, пипеткой переносят 10 мл основного раствора в круглодонную колбу из темного стекла и удаляют растворитель, используя роторный испаритель (5.2), под воздействием пониженного давления при температуре не выше 50 °С. После восстановления азотом атмосферного давления извлекают колбу и растворяют осадок в 10 мл метанола, вращая колбу круговыми движениями. Данный раствор используют для спектрометрического измерения.

[1)] Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанного продукта.

Рассчитывают массовую концентрацию витамина Е ρ, мкг/мл, соответствующих α-, β-, γ-, δ-токоферолов по формуле

$$\rho = \frac{A \times 10^4}{E^{1\%}_{1\,см}}, \quad (1)$$

где A – поглощающая способность каждого токоферола в соответствующем основном растворе;

$E^{1\%}_{1\,см}$ – значение для каждого токоферола, указанное в таблице 1.

Таблица 1 – Примеры значений $E^{1\%}_{1\,см}$

Вещество	Длина волны (метанол)	$E^{1\%}_{1\,см}$	Ссылка
α-токоферол	292 нм	76	[11]
β-токоферол	296 нм	89	[11]
γ-токоферол	298 нм	91	[11]
δ-токоферол	298 нм	87	[11]

Кроме значения для α-токоферола, полученного при длине волны 292 нм, необходимо также измерить оптическую плотность при минимальной длине волны 255 нм. Значение $E^{1\%}_{1\,см}$ при данной длине волны должно находиться в диапазоне от 6 до 8, в противном случае раствор не подлежит использованию [14], [15].

4.11 Стандартные растворы

4.11.1 Стандартный раствор α-токоферола

Пипеткой переносят 10 мл основного раствора α-токоферола (4.10.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл и разбавляют до метки соответствующим растворителем (например, для НФ-хроматографии – *н*-гексаном, для ОФ-хроматографии – метанолом). Стандартный раствор должен иметь массовую концентрацию α-токоферола от 1 до 10 мкг/мл. Если используют УФ-детектор для осуществления контроля за процессом хроматографии, то следует использовать более концентрированный раствор.

Стандартный раствор хранят в защищенном от света месте при температуре не выше 4 °С, регулярно его проверяя.

4.11.2 Стандартный раствор смеси α-, β-, γ-, δ-токоферолов

Пипеткой переносят 10 мл каждого основного раствора (4.10) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл и разбавляют до метки соответствующим растворителем (например, для НФ-хроматографии – *н*-гексаном, для ОФ-хроматографии – метанолом). В стандартном растворе массовая концентрация каждого токоферола должна составлять от 1 до 10 мкг/мл.

Стандартный раствор хранят в защищенном от света месте при температуре не выше 4 °С, регулярно его проверяя.

5 Аппаратура и приборы

Для проведения измерений используют стандартное лабораторное оборудование.

5.1 УФ-спектрометр, применяемый для измерения значений оптической плотности при заданных длинах волн, с соответствующими 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 насоса, устройства для ввода пробы, флуоресцентного детектора с длиной волны возбуждения, установленной на уровне 295 нм, и длиной волны излучения, установленной на уровне 330 нм, а также системы оценки, например интегратора.

Можно использовать УФ-детектор. Длину волны устанавливают на уровне 292 нм. В данном случае стандартный раствор и раствор пробы должны быть более концентрированными. Кроме того, увеличивается возможность обнаружения мешающих соединений.

5.4 Колонка для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Используют аналитическую нормально-фазовую колонку диаметром от 4,0 до 4,6 мм, длиной от 100 до 250 мм, которую заполняют силикагелем с размером частиц 5 мкм.

Допускается использовать колонки иного диаметра и длины и сорбенты с размерами частиц, отличающимися от установленных в настоящем стандарте. Параметры разделения должны быть подобраны с учетом особенностей исследуемых материалов с целью гарантии получения адекватных результатов.

Критерием качества соответствующих аналитических колонок является исходное разделение веществ, определяемых при анализе.

Допускается применять имеющиеся в продаже силикагелевые наполнители – Lichrosorb® Si 60 [2)], Spherisorb® Si [2)], Hypersil® Si [2)] и Lichrospher® 100 DIOL [2)].

Допускается использовать аналитические обращенно-фазные колонки, например C_{18}, с размером частиц 5 мкм, диаметром от 4,0 до 4,6 мм, длиной от 100 до 250 мм. Подходящие наполнители для обращенно-фазных колонок − Spherisorb® ODS [2)] и Hypersil® ODS [2)]. Большинство обращенно-фазных колонок не разделяют β-токоферол и γ-токоферол. Однако данные колонки могут использоваться для количественного определения α- и δ-токоферолов.

5.5 Устройство для фильтрования

Чтобы отфильтровать подвижные фазы ВЭЖХ и растворы пробы, 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 Фильтр для разделения фаз (дополнительный)

6 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с EN ISO 5555.

7 Проведение испытания

7.1 Подготовка пробы

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

7.2 Подготовка анализируемого раствора пробы

Примечание – Анализируемые растворы пробы должны быть защищены от света до анализа.

7.2.1 Проба масел и жиров с низким содержанием воды, содержащая неэтерифицированные токоферолы

7.2.1.1 Масла и жиры (низкое содержание воды)

Настоящая методика применяется только для проб, содержащих неэтерифицированные токоферолы. Если эти соединения не являются предметом исследования, продолжают согласно 7.2.2.

Взвешивают 2 г анализируемой пробы с точностью до 1 мг в мерной колбе с одной меткой вместимостью 25 мл. Добавляют *n*-гексан или другой подходящий растворитель (4.7) и растворяют навеску, вращая колбу круговыми движениями. Обработка ультразвуком ускоряет процесс растворения. Разбавляют до метки тем же растворителем. Полученный раствор анализируемой пробы используют только для НФ-хроматографии.

При необходимости допускается дополнительно разбавлять полученный раствор перед началом хроматографического разделения или использовать меньшую навеску пробы.

[2)] Lichrosorb® Si 60, Spherisorb® Si, Hypersil® Si и Lichrospher® 100 DIOL, Spherisorb® ODS, Hypersil® ODS – это примеры продуктов, имеющихся в продаже. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанного продукта.

7.2.1.2 Маргарин, масло

До этапа разбавления для маргарина и масла необходимо выполнить отделение жира. Отделение выполняют, смешав пробу с безводным сульфатом натрия (4.4), добавив *n*-гексан (4.7) и обработав смесь в ультразвуковой ванне. Отфильтровывают твердые частицы и промывают *n*-гексаном не менее двух раз. Растворитель удаляют при помощи роторного испарителя (5.2) при пониженном давлении, растворяют полученный осадок в установленном объеме *n*-гексана и проводят количественное определение на высокоэффективном жидкостном хроматографе с нормально-фазовой колонкой.

7.2.2. Другие пробы

7.2.2.1 Омыление

Омыляют от 2 до 10 г анализируемой пробы посредством дефлегмации, желательно в атмосфере азота, используя подходящее количество этанола (4.3) или метанола (4.1), воды, антиоксидантов – аскорбиновой кислоты, гидрокситолуола, пирогаллола или ВНТ (4.6) и водного раствора гидроксида калия (4.5.1). Спирт и антиоксиданты добавляют в пробу перед внесением гидроксида калия.

Примеры подходящих соотношений реактивов приведены в таблице 2.

Таблица 2

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

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

7.2.2.2 Экстрагирование

Во избежание образования эмульсии в раствор омыленной пробы добавляют такое количество воды, чтобы отношение спирта к воде в конечном растворе составило 1 : 1.

Экстрагируют токоферолы соответствующим растворителем (4.7). Если в качестве растворителя для экстракции γ-токоферола и δ-токоферола используют *n*-гексан, то необходимо добавить определенное количество более полярного растворителя, чтобы избежать неполного извлечения, о котором информируют в случае его появления. Используют смесь петролейного эфира и 20 % диэтилового эфира для получения количественной экстракции данных соединений. Проверяют полноту извлечения, чтобы идентифицировать возможные потери [16], [17].

Повторяют процедуру экстракции 3 – 4 раза, используя объемы растворителя в пределах от 50 до 150 мл. Промывают объединенные экстракты водой до нейтральной реакции (2 – 4 раза объемом от 50 до 150 мл).

Если содержание витамина Е не слишком низкое [18], то извлечение может быть проведено с помощью системы жидкостной экстракции (например, Extrelut® [3]).

7.2.2.3 Концентрирование

Экстракт отгоняют на роторном испарителе (5.2). Удаляют следы воды высушиванием с сульфатом натрия или азеотропной перегонкой с абсолютным этанолом (4.2) или толуолом. Можно использовать другую равноценную экстракционную методику, например фазовое разделение фильтровальной бумагой для удаления следов воды, если проверено, что эта методика не влияет на результат.

7.2.2.4 Разведение

Повторно растворяют остаток в подвижной фазе (4.8) или в другом растворителе, совместимом с ВЭЖХ, для получения конечной концентрации от 1 до 10 мкг/мл каждого токоферола.

7.3 Идентификация

Идентифицируют токоферолы, сравнивая время удержания отдельных пиков на хроматограммах, полученных от раствора анализируемой пробы и стандартного раствора. Также идентификацию пиков

[3] Extrelut® – пример подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанного продукта.

можно осуществить, добавив небольшое количество соответствующего стандартного раствора в раствор анализируемой пробы.

Примечание – Разделение и количественное определение будут удовлетворительными, если будут соблюдаться следующие экспериментальные условия (см. также рисунок А.1 и А.2). Для альтернативных систем ВЭЖХ см. таблицу С.1.

Стационарная фаза:	Lichrosorb® Si 60, 5 мкм;
Размер колонки:	125 × 4 мм;
Подвижная фаза:	Объемная доля 3 % 1,4-диоксана в *n*-гексане;
Скорость потока:	1,0 мл/мин;
Объем введенной пробы:	10 – 100 мкл;
Детектор:	Флуорометрический: возбуждение – 295 нм; эмиссия – 330 нм.

7.4 Определение

Вводят соответствующие объемы (до 100 мкл) стандартного раствора, а также раствора анализируемой пробы в систему ВЭЖХ. Чтобы провести количественное определение методом внешнего стандарта, интегрируют площади пиков или определяют высоту пиков и сравнивают результаты с соответствующими значениями стандартного вещества.

Вводят равные объемы пробы и стандартных растворов или компенсируют соответствующим коэффициентом при расчете результатов (см. раздел 9). Проверяют линейность калибровочной кривой.

7.5 Количество определений

Выполняют не менее двух независимых определений.

8 Расчет

Расчет производят по калибровочному графику или с помощью соответствующих программ интегратора или выполняют следующий порядок вычисления.

Рассчитывают массовую концентрацию ρ, мг/100 г, α-, β-, γ- или δ-токоферолов в пробе по формуле

$$\rho = \frac{A_S \times c \times V \times V_{ST}}{A_{ST} \times m \times V_S \times 1000} \times 100, \qquad (2)$$

где A_S – площадь пика или высота пика α-, β-, γ- или δ-токоферолов, полученные при исследовании раствора анализируемой пробы;

A_{ST} – площадь пика или высота пика α-, β-, γ- или δ-токоферолов, полученные при исследовании стандартного раствора;

V – общий объем раствора анализируемой пробы (7.2.1 – 7.2.2), мл;

c – концентрация с откорректированной чистотой (4.10.5) α-, β-, γ- или δ-токоферолов в стандартном растворе (4.11.1 – 4.11.2), мкг/мл;

m – масса пробы, г;

V_{ST} – вводимый объем стандартного раствора, мкл;

V_S – вводимый объем раствора анализируемой пробы, мкл;

1000 – коэффициент перерасчета микрограммов в миллиграммы;

100 – коэффициент перерасчета массовой доли в 100 г.

Результаты, полученные для α-, β-, γ- или δ-токоферолов, выражают в милиграммах на 100 граммов. Для вычисления активности витамина Е см. введение и ссылки [1] – [3].

9 Прецизионность

9.1 Общие положения

Прецизионные данные различных ВЭЖХ методов определения α-токоферола были получены в 1994 г. в результате международного сравнительного исследования, проводимого в рамках Программы испытаний и стандартных измерений, организованной Европейской комиссией. Были проведены испытания проб маргарина (CRM 122) [4] и сухого молока (CRM 421) [4] и получена статистическая информация, представленная в приложении В. Данные, полученные в ходе этих сравнительных исследований,

[4] CRM – сертифицированный стандартный материал.

могут применяться при анализе только тех диапазонов концентрации и образцов проб, которые указаны в приложении В.

Данные прецизионности для сухого молока и овсяной муки были получены в результате межлабораторного исследования в соответствии с требоваениями ISO 5725:1986 [19], проведенного Max von Pettenkofer-Institute of the Federal Health Office Food Chemistry Department, Berlin, Germany (в настоящий момент: Государственный институт охраны здоровья потребителей и ветеринарии) [20]. Данные, полученные в ходе данного межлабораторного исследования, могут применяться только для тех диапазонов концентраций и образцов пробы, которые указаны в приложении В.

9.2 Повторяемость

Абсолютная разность между результатами двух отдельных испытаний, полученными при исследовании идентичного анализируемого материала одним и тем же оператором, использующим одно и то же оборудование, в течение самого короткого промежутка времени, не должна превышать предел повторяемости *r* более чем в 5 % случаев. Повторяемость зависит от уровня концентрации анализируемого вещества, находящегося в пробе.

Значения:

Маргарин	α-токоферол	$\bar{x}$ = 24,09 мг/100 г	*r* = 2,765 мг/100 г
Сухое молоко	α-токоферол	$\bar{x}$ = 9,89 мг/100 г	*r* = 1,130 мг/100 г
Сухое молоко	α-токоферол	$\bar{x}$ = 10,2 мг/100 г	*r* = 0,853 мг/100 г
	β-токоферол	$\bar{x}$ = 0,081 мг/100 г	*r* = 0,025 мг/100 г
	γ-токоферол	$\bar{x}$ = 1,989 мг/100 г	*r* = 0,311 мг/100 г
	δ-токоферол	$\bar{x}$ = 0,280 мг/100 г	*r* = 0,082 мг/100 г
Овсяная мука	α-токоферол	$\bar{x}$ = 0,279 мг/100 г	*r* = 0,071 мг/100 г
	β-токоферол	$\bar{x}$ = 0,057 мг/100 г	*r* = 0,017 мг/100 г

9.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между результатами двух отдельных испытаний, полученных при исследовании идентичного материала в двух лабораториях, не должна превышать предел воспроизводимости *R* более чем в 5 % случаев.

Значения:

Маргарин	α-токоферол	$\bar{x}$ = 24,09 мг/100 г	*R* = 4,18 мг/100 г
Сухое молоко	α-токоферол	$\bar{x}$ = 9,89 мг/100 г	*R* = 1,96 мг/100 г
Сухое молоко	α-токоферол	$\bar{x}$ = 10,2 мг/100 г	*R* = 3,705 мг/100 г
	β-токоферол	$\bar{x}$ = 0,081 мг/100 г	*R* = 0,046 мг/100 г
	γ-токоферол	$\bar{x}$ = 1,989 мг/100 г	*R* = 0,978 мг/100 г
	δ-токоферол	$\bar{x}$ = 0,280 мг/100 г	*R* = 0,134 мг/100 г
Овсяная мука	α-токоферол	$\bar{x}$ = 0,279 мг/100 г	*R* = 0,133 мг/100 г
	β-токоферол	$\bar{x}$ = 0,057 мг/100 г	*R* = 0,030 мг/100 г

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующие данные:

– всю информацию, необходимую для идентификации пробы;

– ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;

– результаты и единицы измерения, в которых выражаются результаты;

– дату и методику отбора пробы (если известна);

– дату получения пробы;

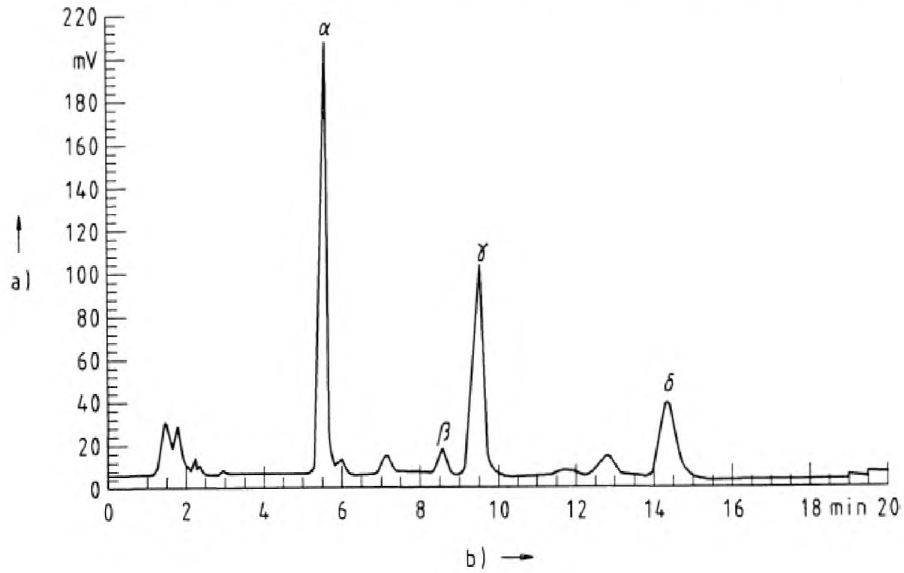
– дату проведения испытания;

– любые особенности, которые наблюдались в ходе проведения испытания;

– любые операции, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые как дополнительные, которые могли повлиять на результаты.

Приложение А
(справочное)

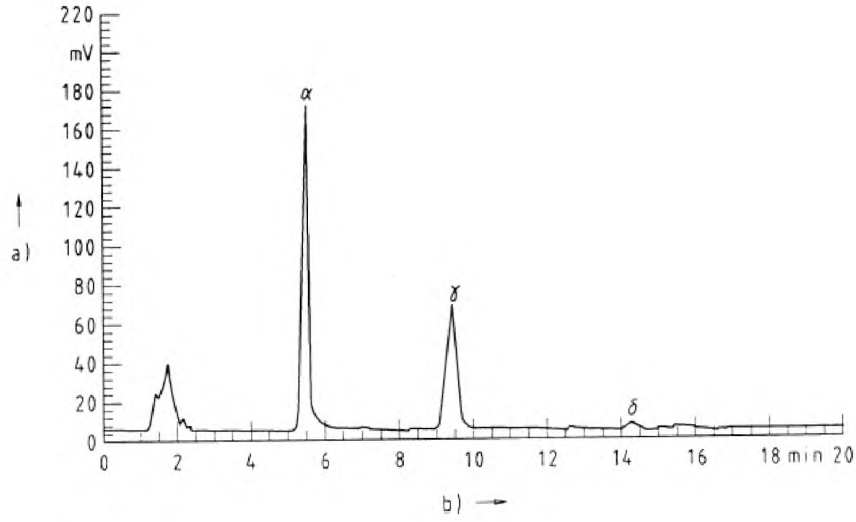
Примеры высокоэффективных жидкостных хроматограмм



a) – поглощающая способность;
b) – время;
стационарная фаза – Lichrosorb® Si 60 [5)], 5 мкм;
размер колонки – 125 × 4 мм;
подвижная фаза – объемная доля 3 % 1,4-диоксана в *n*-гексане;
скорость потока – 1,0 мл/мин;
объем введенной пробы – 20 мкл;
детектор – флуорометрический: возбуждение – 295 нм; эмиссия – 330 нм

Рисунок А.1 – Пример высокоэффективного жидкостного хроматографического разделения α-, β-, γ-, δ-токоферолов в пробе маргарина (CRM 122)

[5)] См. сноску «[2)]».



a) – поглощающая способность;
b) – время;
стационарная фаза – Lichrosorb® Si 60 [5)], 5 мкм;
размер колонки – 125 × 4 мм;
подвижная фаза – объемная доля 3 % 1,4-диоксана в *n*-гексане;
скорость потока – 1,0 мл/мин;
объем введенной пробы – 20 мкл;
детектор – флуорометрический: возбуждение – 295 нм; эмиссия – 330 нм

Рисунок А.2 – Пример высокоэффективного жидкостного хроматографического разделения α-, β-, γ-, δ-токоферолов в пробе сухого молока (CRM 421)

[5)] См. сноску «[2)]».

Приложение В
(справочное)

Данные прецизионности

Параметры разных методов определения витамина Е (α-токоферол) были установлены в результате международного сравнительного исследования, проводимого в рамках Программы испытаний и стандартных измерений, организованной Европейской комиссией [18].

Таблица В.1

	Маргарин (CRM 122)	Сухое молоко (CRM 421)
Анализируемое вещество	α-токоферол	α-токоферол
Год межлабораторного испытания	1994	1994
Количество лабораторий	9	10
Количество проб	1	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко отклоняющихся значений	9	10
Количество резко отклоняющихся значений	0	0
Количество наборов данных	9	10
Количество повторяемых измерений	45	50
Среднее значение $\bar{x}$, мг/100 г	24,09	9,89
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,977	0,399
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r	4,1 %	4,0 %
Значение повторяемости r (2,83 × s_r), мг/100 г	2,765	1,130
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	1,477	0,693
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R	6,1 %	7,0 %
Значение воспроизводимости R (2,83 × s_R), мг/100 г	4,180	1,960

Примечание – Данные, полученные в результате международного сравнительного исследования систем ВЭЖХ при использовании утвержденных лабораториями-участниками методов, идентичных общепринятому порядку испытания, представлены в приложении С.

В результате межлабораторного испытания, проведенного в соответствии с ISO 5725:1986 [19], были получены следующие данные по валидации. Исследование было проведено Max von Pettenkofer-Institute of the Federal Health Office Food Chemistry Department, Berlin, Germany [20].

Таблица В.2

	Сухое молоко			
Анализируемое вещество	α-токоферол	β-токоферол	γ-токоферол	δ-токоферол
Год межлабораторного испытания	1993	1993	1993	1993
Количество лабораторий	13	12	13	10
Количество проб	5	5	5	5
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко отклоняющихся значений	12	9	11	8
Количество резко отклоняющихся значений	1	3	2	2
Количество полученных результатов	66	51	65	40
Среднее значение $\bar{x}$, мг/100 г	10,2	0,081	1,989	0,280
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,301	0,009	0,110	0,029
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r	3,0 %	11,1 %	5,5 %	10,4 %
Значение повторяемости r (2,83 × s_r), мг/100 г	0,853	0,025	0,311	0,082
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	1,31	0,016	0,346	0,047
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R	12,8 %	19,8 %	17,4 %	16,8 %
Значение воспроизводимости R (2,83 × s_R), мг/100 г	3,705	0,046	0,978	0,134

Таблица В.3

	Овсяная мука	
Анализируемое вещество	α-токоферол	β-токоферол
Год межлабораторного испытания	1993	1993
Количество лабораторий	13	13
Количество проб	5	5
Количество лабораторий, оставшихся после исключения резко отклоняющихся значений	12	11
Количество резко отклоняющихся значений	1	2
Количество полученных результатов	70	64
Среднее значение $\bar{x}$, мг/100 г	0,279	0,057
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,025	0,006
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r	9,0 %	10,5 %
Значение повторяемости r (2,83 × s_r), мг/100 г	0,071	0,016
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	0,047	0,011
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R	16,8 %	19,3 %
Значение воспроизводимости R (2,83 × s_R), мг/100 г	0,133	0,030

Приложение С
(справочное)

Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии

Разделение и количественное определение оказывались удовлетворительными, если соблюдались следующие условия при проведении хроматографии [18].

Таблица С.1

Неподвижная фаза	Размеры колонки, мм × мм	Подвижная фаза (объемные доли)	Поток в течение одной минуты	Обнаружение: Ф – флуометрическое; УФ – ультрафиолетовое; ОФ – обращенная фаза; Воз – длина волны возбуждения; Эм – длина волны эмиссии
Knauer polygosil® 60-5	250 × 4,6	*n*-гексан + *ди*-изопропилэфир (80 + 20)	1,5 мл	Ф: Воз: 296 нм Эм: 320 нм
Si 60	250 × 4,6	*n*-гексан + 2-пропанол (98 + 2)	1,5 мл	Ф: Воз: 284 нм Эм: 330 нм
Кварц, 5 мкм	100 × 8	*Изо*-октан + *ди*-изопропилэфир (с 0,15 % пропанола) (97,5 + 2,5)	2,0 мл	Ф: Воз: 295 нм Эм: 330 нм
Lichrospher® Si 100, 5 мкм	250 × 4	*n*-гексан + 2-пропанол (99,85 + 0,15)	2,5 мл	Ф: Воз: 290 нм Эм: 330 нм
Lichrosorb® Si 60, 5 мкм	250 × 4,6	*n*-гексан + 2-пропанол (99,3 + 0,7)	1,2 мл	Ф: Воз: 290 нм Эм: 330 нм
Lichrosorb® Si 60, 5 мкм	250 × 4	*n*-гексан + диоксан (97 + 3)	1,0 мл	Ф: Воз: 293 нм Эм: 326 нм
Lichrosorb® Si 60, 5 мкм	250 × 4	Градиент: от 1 % 2-пропанола в *n*-гептане на 7 мин до 1,5 % 2-пропанола в *n*-гептане	1,0 мл	Ф: Воз: 290 нм Эм: 327 нм
Амино, 3 мкм	100 × 4,6	*Изо*-октан + *изо*-пропанол (98 + 2)	1,5 мл	Ф: Воз: 290 нм Эм: 330 нм
Nucleosil C_{18}, 5 мкм	250 × 4	Метанол + вода (97 + 3)	2,0 мл	УФ: 292 нм
ОФ-8, 10 мкм	250 × 4,6	Ацетонитрил + метанол + вода (50 + 45 + 5)	2,0 мл	Ф: Воз: 293 нм Эм: 326 нм УФ: 290 нм

Библиография

[1] Subcommittee on the Tenth Edition of the RDA s, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Counsil, Recommended Dietary Allowances, 10th Edition, National Acadamy Press, Washington, D.C. 1989
(Рекомендуемые дозировки определенных пищевых элементов)

[2] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE): Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr; 5. Überarbeitung 1991
(Немецкое общество питания. Рекомендации по подаче питательных веществ)

[3] Brubacher, G. and Wiss, O. (1972), The Vitamins, eds Sebrell & Harris, 5th Edition, Academic Press, New York, 255
(Витамины)

[4] Brubacher, G. et al., (1985). Methods for the Determination of Vitamins in Food, Elsevier App. Science Publishers, London, 97 – 106
(Методы определения витаминов в пищевых продуктах)

[5] Gertz, C. and Kerrman, K. (1982). Z. Lebensmittelunters. Forsch., 174, 390 – 394
(Отравления пищевыми продуктами)

[6] Nobile, S. and Moor, H. (1953). Mitt. Lebensmittel Unters. Hyg., 44, 396
(Запрещенные пищевые продукты)

[7] Determination of Tocopherols in fats and oils. L-13.03/04. September 1987 in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/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 September 1998, Bd. 1 (Loose leaf edition as of 1998-09, Vol.1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
(Определение токоферолов в жирах и маслах)

[8] Balz, M., Schulte, E. and Thier, H.P. (1992). Fat. Sci. Technol. 6, 209 – 213
(Жир)

[9] Speek, A.J., Schrijver, J. and Schreurs, W.H.P. (1985), J. Food Sci. 50, 121 – 124
(Наука о продуктах питания)

[10] Manz, U. and Philipp, K. (1981). Internat. J. Vit. Nutr. Res., 51, 342 – 348
(Международный журнал о питательности витаминов)

[11] Pocklington, W.D. and Diefenbacher, A. (1988). Pure & Appl. Chem. 60, 877 – 892
(Чистота. Прикладная химия)

[12] Bourgeois, C. (1992). Determination of Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols, Elsevier App.Science Publishers, London
(Определение витамина Е: токоферолы и токотриенолы)

[13] Lumley, I. D. (1993), in The Technology of Vitamins in Food, ed. by P. B. Ottaway, Blacie Academic & Professional, Glasgow, 186 – 190
(Технология витаминов в пищевых продуктах)

[14] DAB 10 (1991), Deutsches Arzneibuch 10. Ausgabe 1991, Stand 1993; Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart
(Немецкая рецептурная книга)

[15] Balz, M., Schulte, E. and Thier, H.-P.: A new parameter for checking the suitability of tocopherol standards, (1996), Z Lebensm Unters Forsch, 202, 80 – 81
(Новые параметры для проверки пригодности эталонов токоферола (1996) Запрещенные продукты питания)

[16] VDLUFA-Methodenbuch: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln (The chemical analysis of animal feeding stuffs), Band III (vol III), 4. Erg (4th Add), Kapitel 13.5.5 (chapter 13.5.5), VDLUFA-Verlag, Darmstadt
(Химический анализ кормов для животных)

[17] Konings, E.J.M., Roomans, H.H.S., and Beljaars, P.R.: Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Margarine, Infant Foods and Vegetables, JAOAC, Vol 79; № 4, 1996, 902 – 906
(Определение токоферолов и токотриенолов в маргарине, детском питании и овощах методом жидкостной хроматографии)

[18] 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 (CRM 431). EUR-Report 18039, Commission of the European Union, Luxembourg
(Сертификация массовых долей витаминов в трех стандартных материалах: маргарине (CRM 122), сухом молоке (CRM 421) и лифилизированой брюссельской капусте (CRM 431). Евродоклад 18039, Комиссия Европейского союза, Люксембург)

[19] ISO 5725:1986 Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by interlaboratory tests
(Точность (правильность и прецизионность) методов испытания. Определение повторяемости и воспроизводимости стандартного метода с помощью межлабораторных испытаний)

[20] Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung von Tocopherolen und Tocotrienolen in dietätischen Lebensmitteln L 49.00-5 September 1998 (Food Analysis – Determination of tocopherols and tocotrienols in dietetic foodstuffs L 49.00-5 September 1998) in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedargsgegenständen/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 September 1998, Bd. 1 (Loose leaf edition as of 1998-09, Vol.1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
(Анализ пищевых продуктов: определение токоферолов и токотриенолов в диетических продуктах питания)

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 5555:2011, ITD)

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 21.02.2012. Подписано в печать 29.03.2012. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 2,20 Уч.- изд. л. 1,08 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