ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EACC)
EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 12080-2— 2016

МОЛОКО ОБЕЗЖИРЕННОЕ СУХОЕ

Определение содержания витамина А

Часть 2

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 12080-2:2009, IDT)
(IDF 142-2:2009, IDT)

Издание официальное

Зарегистрирован
№ 12538
28 июля 2016 г.

Минск
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации по результатам голосования в АИС МГС (протоколом от 27 июля 2016 г. №89-П)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Грузия	GE	Грузстандарт
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 12080-2:2009|IDF 142-2:2009 Dried skimmed milk — Determination of vitamin A content — Part 2: Method using high-performance liquid chromatography (Молоко сухое обезжиренное. Определение содержания витамина А. Часть 2. Метод с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в национальных органах по стандартизации вышеуказанных государств.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных (государственных) органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

Содержание

1 Область применения 1
2 Термины и определения 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы 1
5 Оборудование и материалы 2
6 Отбор проб 3
7 Подготовка пробы для испытания 3
8 Методика проведения испытания 3
8.1 Общие положения 3
8.2 Испытуемый раствор 3
8.3 Омыление и экстрагирование 3
8.4 Приготовление анализируемого и эталонного растворов 4
8.5 Определение 4
9 Расчет и представление результатов 4
10 Прецизионность 4
10.1 Межлабораторное испытание 4
10.2 Повторяемость 4
10.3 Воспроизводимость 4
11 Протокол испытания 5
Приложение А (справочное) Активность, выражаемая в международных единицах (МЕ) 6
Библиография 7

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МОЛОКО ОБЕЗЖИРЕННОЕ СУХОЕ
Определение содержания витамина А
Часть 2
Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Dried skimmed milk
Determination of vitamin A content
Part 2
Method using high-performance liquid chromatography

Дата введения —

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ. Применение настоящего стандарта может быть связано с проведением опасных операций, использованием вредных веществ, опасного оборудования. Настоящий стандарт не охватывает всех проблем безопасности, связанных с его применением. Ответственность за соблюдение техники безопасности и установление необходимых ограничений при применении настоящего стандарта несет его пользователь

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания витамина А в сухом обезжиренном молоке с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод применим при содержании витамина А не менее 10 МЕ/г (международные единицы на грамм).

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

2.1 **содержание витамина А в сухом обезжиренном молоке** (vitamin A content of dried skimmed milk): Массовая доля веществ, определяемых методикой, установленной в настоящем стандарте.

Примечание — Содержание витамина А выражается в микрограммах ретинола на грамм или в международных единицах на грамм (активность витамина А).

3 Сущность метода

Проводят омыление пробы для испытания с последующим экстрагированием витамина А соответствующим растворителем. Определение проводят методом ВЭЖХ с ультрафиолетовым или флуориметрическим детектором.

4 Реактивы

Используют реактивы только требуемой аналитической чистоты, дистиллированную и/или деминерализованную воду или воду, эквивалентную по чистоте.

4.1 **Ректификованный этиловый спирт** (CH_3CH_2OH) объемной долей этилового спирта не менее 95 %, не содержащий альдегида.

4.2 **Раствор аскорбата натрия** массовой концентрацией 200 г/л. Раствор может быть приобретен в готовом виде или изготовлен самостоятельно. Растворяют 3,5 г аскорбиновой кислоты ($C_6H_8O_6$) в 20 мл раствора гидроксида натрия (NaOH) молярной концентрацией 1 моль/л и перемешивают. Используют свежеприготовленный раствор.

4.3 **Водный раствор гидроксида калия** (KOH) массовой долей 50 %. Растворяют 50 г гидроксида калия в 50 мл воды. Раствор перемешивают и охлаждают. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

4.4 **Водно-спиртовой раствор гидроксида калия** массовой концентрацией 30 г/л. В мерной колбе с одной меткой вместимостью 100 мл растворяют 3 г гидроксида калия (KOH) в воде, добавля-

Издание официальное

ют 10 мл ректификованного этилового спирта (4.1), доводят до метки водой и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

4.5 **Петролейный эфир**, перегнанный при температуре 40 °С — 60 °С или 60 °С — 80 °С.

4.6 **Метанол** (CH_3OH) для ВЭЖХ.

4.7 **Подвижная фаза:** смесь метанола (4.6) и воды в объемном соотношении 90 : 10 (см. предостережение, указанное в 8.5).

4.8 **Стандартный раствор витамина А**. Используют стандартный образец раствора витамина А, отвечающий требованиям Фармакопеи Соединенных Штатов Америки [1)], представляющий собой кристаллический полный транс-ретинол ацетата, растворенный в хлопковом масле, содержащий 30 мг ретинола (витамин А-спирт, $C_{20}H_{30}O$) на грамм масла, или с другим содержанием, указанным изготовителем.

Отрезают наконечник капсулы, содержащей стандартный образец раствора витамина А, и извлекают в колбу для омыления приблизительно 20 мг ее содержимого. Взвешивание проводят с точностью до 0,1 мг. Добавляют в колбу для омыления 40 мл ректификованного этилового спирта (4.1), 10 мл раствора аскорбата натрия (4.2) и 10 мл водного раствора гидроксида калия (4.3).

Проводят омыление и экстрагирование согласно 8.3.2–8.3.6. Приготовление эталонного раствора осуществляют в соответствии с 8.4.

4.9 **Бутилгидрокситолуол** (БГТ).

5 Оборудование и материалы

Используют стандартное лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

5.1 **Высокоэффективный жидкостный хроматограф**, укомплектованный ультрафиолетовым (УФ) детектором.

Условия проведения испытания:

- УФ-детектор с перестраиваемой длинной волны, установленный на длину волны 325 нм или детектор с фиксированной длиной волны, установленный на длину волны 300–360 нм при чувствительности детектора от 0,128 единицы поглощения на всю шкалу (AUFS);
- скорость потока: 2 мл/мин (при давлении до 10 МПа);
- температура: комнатная;
- объем вводимой пробы: 20 мкл;
- скорость движения ленты самописца: 10 мм/мин.

Если используют флуоресцентный детектор, то длину волны на линии возбуждения устанавливают 325 нм, на линии эмиссии — 450 нм.

5.2 **Хроматографическая колонка** из нержавеющей стали, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, с наполнителем С8 или С18 с размером частиц 10 мкм, химически связанных с пористыми частицами микросилики или аналогичная.

5.3 **Стакан** или **коническая колба** вместимостью 250 мл.

5.4 **Колба для омыления** вместимостью 200 мл, оснащенная обратным холодильником.

5.5 **Мерные колбы с одной меткой** вместимостью 100, 200 мл класса А по [3].

5.6 **Пипетки с одной меткой** вместимостью 2, 10, 25, 50 мл класса А по [1].

5.7 **Паровая баня**, **кипящая водяная баня** или **электрический колбонагреватель**.

5.8 **Ротационный испаритель** с регулятором нагрева, поддерживающий температуру до 40 °С.

5.9 **Делительная воронка** вместимостью 500 мл, предпочтительнее с политетрафторэтиленовой (ПТФЭ) пробкой.

5.10 **Ультразвуковая баня**.

5.11 **Фильтровальная бумага** диаметром 90 мм.

6 Отбор проб

Метод отбора проб не регламентирован настоящим стандартом. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в [2].

В лабораторию должна быть передана представительная проба, не поврежденная или измененная во время транспортирования и/или хранения.

[1)] Указаны примеры продуктов, имеющихся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанных продуктов со стороны ISO или IDF.

7 Подготовка пробы для испытания

Пробу для испытания тщательно перемешивают, вращая и переворачивая емкость, в которую она отобрана. В случае необходимости пробу для испытания помещают в герметичную емкость.

8 Методика проведения испытания

8.1 Общие положения

При необходимости проверки повторяемости результатов испытания (10.2) проводят два независимых испытания в соответствии с 8.2–8.5.

Все операции должны выполняться в помещении при затемненном свете или с использованием лабораторной посуды из темного стекла.

8.2 Испытуемый раствор

В стакане или конической колбе (5.3) взвешивают с точностью до 0,001 г около 20 г пробы для испытания и растворяют в 50 мл воды при температуре не менее 80 °С. В случае образования комков их разбивают лопаткой или используют ультразвуковую баню (5.10). Раствор охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл (5.5) и доводят до метки водой.

8.3 Омыление и экстрагирование

8.3.1 С помощью пипетки (5.6) переносят 25 мл испытуемого раствора (8.2) в колбу для омыления (5.4). Добавляют 20 мл водного раствора гидроксида калия (4.3), 10 мл раствора аскорбата натрия (4.2), 50 мл ректификованного этилового спирта (4.1) и тщательно перемешивают.

8.3.2 Колбу для омыления с обратным холодильником нагревают в течение 30 мин на паровой бане, кипящей водяной бане или электрическом колбонагревателе (5.7), периодически перемешивая круговыми движениями. По окончании нагревания содержимое колбы быстро охлаждают под проточной водой.

8.3.3 Содержимое из колбы для омыления переносят в делительную воронку (5.9). Колбу для омыления дважды ополаскивают смесью, состоящей из 30 мл воды, 10 мл ректификованного этилового спирта (4.1) и 40 мл петролейного эфира (4.5), которую сливают в ту же делительную воронку. Интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 30 с и дают отстояться.

После разделения слоев водный (нижний) слой сливают во вторую делительную воронку, добавляют в нее 10 мл ректификованного этилового спирта (4.1), 40 мл петролейного эфира (4.5) и встряхивают.

8.3.4 После разделения слоев водный слой сливают еще в третью делительную воронку, а слой петролейного эфира — в первую делительную воронку. Дважды ополаскивают вторую делительную воронку 10 мл петролейного эфира (4.5) и смывы сливают в первую делительную воронку.

8.3.5 В третью делительную воронку добавляют 40 мл петролейного эфира (4.5), 10 мл ректификованного этилового спирта (4.1) и встряхивают. Слой петролейного эфира сливают в первую использованную делительную воронку. Объединенный экстракт петролейного эфира промывают тремя порциями (по 40 мл) свежеприготовленного водно-спиртового раствора гидроксида калия (4.4), каждый раз интенсивно встряхивая делительную воронку. Затем объединенный экстракт петролейного эфира отмывают от щелочи порциями воды (по 40 мл) до нейтральной реакции промывной воды по фенолфталеину. После того как из делительной воронки полностью сольют воду, в нее добавляют разрезанную на полоски две единицы фильтровальной бумаги (5.11) и встряхивают.

8.3.6 После удаления из него остатка воды (8.3.5) объединенный экстракт петролейного эфира переносят в мерную колбу с одной меткой вместимостью 200 мл (5.4) и ополаскивают делительную воронку с полосками фильтровальной бумаги в ней петролейным эфиром (4.5). Смывы сливают в мерную колбу, добавляют 10–20 мг БГТ (4.9), доводят до метки петролейным эфиром и тщательно перемешивают.

8.4 Приготовление анализируемого и эталонного растворов

Переносят аликвоты разбавленных экстрактов (8.3.6), полученных после омыления и экстрагирования испытуемого раствора (8.2) и стандартного раствора витамина А (4.8), с помощью пипетки в отдельные круглодонные колбы.

Далее экстракты упаривают досуха под вакуумом на ротационном испарителе (5.8) при температуре не выше 40 °С. После упаривания остатки охлаждают под проточной водой, выравнивают давление внутри колбы предпочтительно азотом и сразу растворяют в 10 мл метанола (4.6).

8.5 Определение

В колонку вводят 20 мкл испытуемого и эталонного растворов (8.4). Условия детектирования варьируют таким образом, чтобы получить максимальную высоту пиков витамина А на хроматограмме. Для каждого раствора определяют площадь пика.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ. Результаты хроматографического анализа зависят от нескольких факторов, в том числе от используемого оборудования, детектора, типа, срока службы и изготовителя колонки, способа ввода и объема пробы испытуемого и эталонного растворов. Объемное соотношение метанол — вода можно варьировать с учетом указанных факторов, при этом необходимо учесть, что увеличение объема воды в подвижной фазе приводит к увеличению времени удерживания.

9 Расчет и представление результатов

Рассчитывают содержание витамина А w, мкг ретинола/г (или активность витамина А, МЕ/г), используя формулу

$$w = \frac{\rho \cdot A_s \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot V_4}{A_r \cdot V_2 \cdot V_5 \cdot m},$$

где ρ — массовая концентрация витамина А (или активность витамина А) в эталонном растворе (8.4), мкг ретинола/мл (МЕ/мл);

A_s — численное значение площади пика витамина А в испытуемом растворе (8.5);

A_r — численное значение площади пика витамина А в эталонном растворе (8.5);

V_1 — общий объем разбавленного экстракта петролейного эфира, мл (V_1 = 200 мл);

V_2 — объем аликвоты, взятой из V_1 (8.4), мл;

V_3 — объем метанола, в котором растворяют упаренный досуха остаток, мл (V_3 = 10 мл);

V_4 — общий объем испытуемого раствора (8.2), мл (V_4 = 100 мл);

V_5 — объем аликвоты испытуемого раствора (8.3.1), мл (V_5 = 25 мл);

m — масса навески пробы для испытания (8.2), г.

10 Прецизионность

10.1 Межлабораторное испытание

Информация о межлабораторном испытании по определению прецизионности метода, проведенном в соответствии с [4] и [5], была опубликована (см. [6]). Значения, полученные в результате указанного межлабораторного испытания, не могут быть применимы к другим интервалам массовой концентрации и типам матриц, кроме тех, которые указаны.

10.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между двумя отдельными результатами испытания, которые были получены при применении одного и того же метода на идентичном испытуемом материале одним и тем же оператором на одном и том же оборудовании в течение короткого промежутка времени, не должно превышать 14 % среднего арифметического значения двух результатов более чем в 5 % случаев.

10.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между двумя отдельными результатами испытания, которые были получены при применении одного и того же метода на идентичном испытуемом материале разными операторами на разном оборудовании, не должно превышать 42 % среднего арифметического значения результатов более чем в 5 % случаев.

11 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать следующие данные:

а) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) применяемый метод отбора проб;

c) применяемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все операции, не оговоренные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также подробности о любых инцидентах, которые могли повлиять на результаты испытания;

e) полученные результаты испытания или окончательный заявленный результат, если была проверена повторяемость.

Приложение А
(справочное)

Активность, выражаемая в международных единицах (МЕ)

А.1 Активность витамина А

Активность витамина А выражается в международных единицах. Установлено (см. [7]), что 1 МЕ витамина А соответствует активности 0,344 мкг полный транс-ретинола ацетата.

На основе стехиометрических расчетов для других соединений витамина А установлено, что 1 МЕ витамина А соответствует активности 0,300 мкг полный транс-ретинола, 0,359 мкг полный транс-ретинола пропионата или 0,500 мкг полный транс-ретинола пальмитата.

Активность 1 г чистого полный транс-витамина А (спирта) и полный транс-витамина А (сложного эфира), выраженного в международных единицах, равняется:

- витамин А-спирт (ретинол) 3 333 000 МЕ;
- витамин А-ацетат 2 907 000 МЕ;
- витамин А-пропионат 2 785 000 МЕ;
- витамин А-пальмитат 1 818 000 МЕ.

А.2 Испытание стандартного раствора витамина А (сложный эфир витамина А чистый или разведенный в масле)

См. ссылку [7].

25–100 мг сложного эфира витамина А взвешивают с точностью до 0,1 мг в колбе, добавляют 5 мл пентана и растворяют. С учетом взвешенного количества сложного эфира витамина добавляют 2-пропанол в объеме, достаточном для получения раствора с содержанием витамина А в диапазоне 10–15 МЕ/мл.

При измерении оптической плотности раствора сложного эфира витамина А против холостой пробы, представляющей собой 2-пропанол, максимум поглощения раствора A_m должен находиться в диапазоне длины волны 325–327 нм. Измеряют оптическую плотность раствора A_n при длинах волны 300, 326 и 370 нм.

Рассчитывают коэффициент A_n/A_m для каждой длины волны. Если коэффициенты не превышают 0,593 при 300 нм, 0,537 при 350 нм или 0,142 при 370 нм, тогда рассчитывают содержание витамина А w, МЕ/г, используя формулу

$$w = \frac{A_m \cdot V \cdot f}{100 \cdot m},$$

где A_m — численное значение максимума поглощения, полученное при 326 нм;

V — общий объем, раствора сложного эфира витамина А, мл;

f — коэффициент пересчета оптической плотности сложного эфира витамина А в международные единицы на грамм (f = 1900);

m — масса навески сложного эфира витамина А, г.

Библиография

[1] ISO 648:2008 — Laboratory glassware — Single-volume pipettes
(Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной меткой)

[2] ISO 707:2008| IDF 50:2008 — Milk and milk products — Guidance on sampling
(Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)

[3] ISO 1042:1998 — Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks
(Посуда лабораторная стеклянная. Колбы мерные с одной меткой)

[4] ISO 5725-1:1994 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)

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

[6] De Vries, E.J. et al. Dried skimmed milk — Determination of vitamin A — Colorimetric and liquid chromatographic methods, pp. 53-64. In: Reference materials and interlaboratory collaborative studies (third series). [Bull. IDF 1993, (285)]
(Молоко обезжиренное сухое. Определение содержания витамина А. Колориметрический метод и метод с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии)

[7] Vitamin A monograph. In: European Pharmacopoeia
(Монограмма по витамину А)

УДК 637.143.074:543.544.068.7(083.74)(476) МКС 67.100.10 IDT
Ключевые слова: молоко

gost.e-ecolog.ru