«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ООО «ЛЮМЭКС»



М.А.Стробыков
«19» декабря 2006 г.

МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВЫХ ДОЛЕЙ ВИТАМИНОВ А (В ФОРМЕ РЕТИНОЛАЦЕТАТА), Е (В ФОРМЕ α-ТОКОФЕРОЛАЦЕТАТА) И D (В ФОРМЕ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА) В ПРЕМИКСАХ И ВИТАМИННЫХ КОНЦЕНТРАТАХ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА «ЛЮМАХРОМ»

Методика М 04-44-2006

Санкт-Петербург
2006

gost.e-ecolog.ru

Информационные данные:
Методика разработана ООО «Люмэкс»
Введена впервые
Аттестована Уральским НИИ Метрологии,
свидетельство № 223.1.16.07.441/2006 от 15.12.2006

© ООО «Люмэкс», 2006

1 ВВЕДЕНИЕ

Настоящий документ устанавливает методику выполнения измерений (МВИ) массовой доли витаминов А (в форме ретинолацетата), D (в форме холекальциферола, или D_3) и Е (в форме α-токофе-ролацетата) в премиксах и витаминных концентратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее - ВЭЖХ) с использованием жидкостного хроматографа «Люмахром».

Диапазон измеряемых массовых долей витаминов приведен в таблице 1. Масса анализируемой навески пробы составляет 0,05 – 5 г в зависимости от содержания витамина и способа пробоподготовки.

Таблица 1 - Диапазоны измерений

Витамин	Единицы массовой доли	
	млн МЕ/кг	г/кг
А	0,1 – 50	0,0344 – 17,2
Е	0,0005 – 0,2	0,5 – 200
D	0,04 –20	0,001-0,4
Примечание - МЕ - международные единицы		

2 ПРИПИСАННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ И ЕЕ СОСТАВЛЯЮЩИХ

Методика обеспечивает получение результатов измерений с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в табл.2, во всем диапазоне измерений, приведенных в табл.1.

Значения показателя точности методики используют при

- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке деятельности лабораторий на качество проведения испытаний,
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики в конкретной лаборатории.

Таблица 2 - Значения показателя повторяемости, воспроизводимости и точности методики

Диапазон измерений	σ_r, %	σ_R, %	$\pm \delta$, %
Витамин А, млн МЕ/кг			
От 0,1 до 2,5 вкл.	10	16	32
Свыше 2,5 до 50 вкл.	5	10	20
Витамин D, млн МЕ/кг			
От 0,04 до 0,5 вкл.	10	16	32
Свыше 0,5 до 20,0 вкл.	5	8	18
Витамин Е, млн МЕ/кг			
От 0,00005 до 0,005 вкл.	9	14	28
Свыше 0,005 до 0,2 вкл.	5	8	16

Примечание. В таблице использованы следующие обозначения: σ_r - показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_R - показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), $\pm\delta$ - показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности P = 0,95).

3 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

3.1 Средства измерений

Жидкостный хроматограф «Люмахром» с фотометрическим детектором «Люмахром ФД 3110» или «Люмахром ФД 3120» по ТУ 4215-329-20506233-2005

Хроматографическая колонка должна быть заполнена обращенно-фазовым сорбентом и в условиях выполнения анализа[1] должна иметь эффективность не менее 4500 теоретических тарелок по пику витамина Е (1000 - витамина А, 4500 - витамина D). Минимально определяемые концентрации витаминов (при соотношении сигнал/шум равном трем, составляют для витамина А -

[1] При использовании подвижной фазы состава ацетонитрил / изопропанол в соотношении 90:10.

0,02 мкг/см^3, для витамина D – 0,02 мкг/см^3 и для витамина Е – 1 мкг/см^3. Колонку снабжают предколонкой, заполненной аналогичным обращенно-фазовым сорбентом.

Весы лабораторные специального или высокого класса точности с ценой деления не более 0,1 мг, наибольшим пределом взвешивания не более 200 г, например ВЛР-200	ГОСТ 24104-2001
Весы лабораторные среднего класса точности с ценой деления не более 0,01 г, наибольшим пределом взвешивания не более 200 г	ГОСТ 24104-2001
Пипетки градуированные 2-го класса точности, вместимостью 1, 2, 5 см^3	ГОСТ 29227-91
и/или дозаторы пипеточные любой марки с переменным объемом 50-200 мм^3 и 200-1000 мм^3 с пределом допускаемой погрешности измерений не более ± 2%	
Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 500 см^3	ГОСТ 1770-74
Цилиндры лабораторные 2-го класса точности вместимостью 25, 50 и 500 см^3	ГОСТ 1770-74
Система сбора и обработки данных «Мультихром» на основе персонального компьютера или другие аппаратно-программные средства, внесенные в Госреестр СИ	Госреестр СИ РФ № 13473-98
Стандартный образец состава раствора α-токоферолацетата в гексане	
Стандартный образец состава раствора ретинолаацетата в гексане	
Стандартный образец состава раствора холекальциферола в ацетонитриле	

Спектрофотометр типа СФ-26 или СФ-46[1]

Средства измерения должны быть поверены в установленные сроки. Допускается использование других средств измерения и стандартных образцов, имеющих аналогичные или лучшие характеристики.

3.2 Вспомогательные устройства

Пробирки с притертой пробкой вместимостью 5 и 10 см^3	ГОСТ 25336-82
Колбы конические вместимостью 50 см^3	ГОСТ 25336-82
Пробирки полимерные центрифужные вместимостью 1,5 см^3	
Микровстряхиватель типа Вортекс или устройство для перемешивания проб (например, типа ПЭ-6300, 6410, 6500 или аналогичное)	
Лабораторная центрифуга любого типа (не менее 4000 об/мин)	
Холодильник бытовой любого типа	
Таймер	

3.3 Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, ос.ч. (например, предприятия «Криохром» сорт 1-2)	ТУ 6-09-5449-89
Метанол (карбинол), х.ч.	
2-Пропанол (изопропанол), х.ч.	ТУ 6-09-402-87
Бутилокситолуол (имп.)	
Кислота серная, ч.	ГОСТ 4204-77

Допускается использование химических реактивов других производителей, имеющих аналогичные или лучшие характеристики.

[1] Для проверки концентрации растворов витаминов, а также при использовании фармакопейных препаратов для приготовления стандартных растворов витаминов.

3.4 Приготовление растворов

3.4.1 Элюент для хроматографии

Перед употреблением элюенты выдерживают для дегазации не менее 4 часов. Для быстрой дегазации готовой смеси проводят вакуумирование емкости с элюентом, подключая ее к водоструйному насосу, либо поместив на ультразвуковую баню. Срок хранения в условиях, исключающих испарение компонентов смеси, не ограничен[1]. Недопустимо использование резиновых и корковых пробок.

3.4.1.1 Подвижная фаза (элюент; далее - ПФ) для анализа витаминных концентратов: смесь ацетонитрил - изопропанол в объемном соотношении 90:10

В мерный цилиндр вместимостью 500 см^3 помещают 400 см^3 ацетонитрила и добавляют 50 см^3 изопропанола. Доводят объём смеси до 500 см^3 ацетонитрилом и тщательно перемешивают. Раствор переливают в заранее подготовленную стеклянную плотно закрывающуюся емкость.

3.4.1.2 Подвижная фаза (элюент) для анализа премиксов: смесь ацетонитрил – изопропанол - вода в объемном соотношении 96:2:2

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 помещают 400 см^3 ацетонитрила и добавляют 10 см^3 изопропанола и 10 см^3 дистиллированной воды. Доводят объём смеси до 500 см^3 ацетонитрилом и тщательно перемешивают. Раствор переливают в заранее подготовленную стеклянную плотно закрывающуюся емкость.

Примечание. Элюент также пригоден для анализа витаминных концентратов.

3.4.1.3 Подвижная фаза (элюент) для сложных премиксов: смесь ацетонитрил – изопропанол - вода в объемном соотношении 85:9:6

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 50 см^3 ацетонитрила и добавляют 9 см^3 изопропанола и 6 см^3 дистиллирован-

[1] Для хранения целесообразно использовать предварительно высушенные емкости из-под ацетонитрила или гексана производства фирмы «Криохром».

ной воды. Доводят объём смеси до 100 см^3 ацетонитрилом и тщательно перемешивают. Хранят смесь в плотно укупоренной емкости.

3.4.2 Раствор бутилокситолуола (БОТ) в ацетонитриле, массовая доля 0,2%

0,05 г БОТ растворяют в ацетонитриле в мерной колбе вместимостью 25 см^3. Срок хранения в условиях, исключающих испарение растворителя, не ограничен.

3.4.3 Приготовление растворов витаминов А, Е и D

Поскольку витамины, особенно витамин А, легко разрушаются при повышенной температуре, под действием света и кислорода воздуха, а также в присутствии следов кислот, необходимо соблюдать специальные меры предосторожности, защищающие соединения от воздействия этих факторов:

- избегать попадания прямых солнечных лучей;
- использовать посуду, тщательно отмытую от следов кислот;
- хранить растворы и экстракты в холодильнике;
- свести до минимума контакт с кислородом воздуха (перемешивать осторожно, хранить в подходящей по объему посуде).

Возможно приготовление растворов витамина А и витамина Е из масляных фармакопейных препаратов (см. Приложение А).

3.4.3.1 Приготовление исходного раствора витамина А

1 см^3 стандартного образца состава раствора витамина А переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и доводят до метки изопропанолом. Действительное значение массовой концентрации витамина А в приготовленном растворе ($C_{исх}$) рассчитывают по формуле:

$$C_{исх} = \frac{C_{со} \cdot V_{со}}{25}, \qquad (1)$$

где $C_{со}$ - концентрация стандартного образца состава раствора ретинолацетата, указанная в свидетельстве на СО (мг/см^3).

$V_{со}$ - объем стандартного образца состава раствора ретинолацетата, взятый для приготовления раствора (1 см^3)

Номинальное значение массовой концентрации полученного раствора 400 мкг/см^3.

Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 4 - 6 °С.

3.4.3.2 Приготовление исходного раствора витамина Е

5 см^3 стандартного образца состава раствора α-токоферолацетата переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и доводят до метки изопропанолом. Действительное значение массовой концентрации витамина Е в приготовленном растворе рассчитывают по формуле (1), в которую в качестве $C_{со}$, мг/см^3, подставляют концентрацию стандартного образца состава раствора α-токоферолацетата, указанную в свидетельстве на СО (мг/см^3), и $V_{со}$ - 5 см^3. Номинальное значение массовой концентрации полученного раствора 4 мг/см^3.

Срок хранения раствора 6 месяцев при температуре 4 ± 2 °С.

3.4.3.3 Приготовление исходного раствора витамина D

5 см^3 стандартного образца состава раствора холекальциферола переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и доводят до метки ацетонитрилом. Действительное значение массовой концентрации витамина D в приготовленном растворе рассчитывают по формуле (1), в которую в качестве $C_{со}$, мг/см^3, подставляют концентрацию стандартного образца состава раствора холекальциферола, указанную в свидетельстве на СО (мг/см^3). Номинальное значение массовой концентрации полученного раствора 200 мкг/см^3.

Срок хранения раствора 6 месяцев при температуре 4 ± 2 °С.

3.4.4 Приготовление градуировочных растворов смеси витаминов

3.4.4.1 Приготовление градуировочного раствора № 1 (номинальные значения массовых концентраций витамина А - 32 мкг/см^3, витамина D - 4 мкг/см^3, витамина Е - 320 мкг/см^3)

2,0 см^3 витамина А (п.3.4.3.1), 0,5 см^3 витамина D (п.3.4.3.3) и 2,0 см^3 витамина Е (п.3.4.3.2) помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3, доводят до метки ацетонитрилом и тщательно пере-

мешивают. Срок хранения раствора 3 месяца при температуре 4 ± 2 °С.

3.4.4.2 Приготовление градуировочного раствора № 2 (номинальные значения массовых концентраций витамина А - 3,2 мкг/см^3, витамина D - 0,4 мкг/см^3, витамина Е - 32 мкг/см^3)

2,5 см^3 раствора (п.3.4.4.1) помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3, доводят до метки ацетонитрилом и тщательно перемешивают. Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 4 ± 2 °С.

3.4.4.3 Приготовление градуировочного раствора № 3 (номинальные значения массовых концентраций витамина А - 0,32 мкг/см^3, витамина D - 0,04 мкг/см^3, витамина Е - 3,2 мкг/см^3)

2,5 см^3 раствора (п.3.4.4.2) помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3, доводят до метки ацетонитрилом и тщательно перемешивают. Срок хранения раствора 1 неделя при температуре 4 ± 2 °С.

При необходимости градуировочные растворы с иными концентрациями витаминов готовят аналогично.

4 МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Определение внесенных форм витаминов проводится прямой экстракцией без разрушения матрицы.

Сущность метода заключается в экстракции витаминов А , D и Е из пробы метанолом и последующем анализе содержания витаминов с использованием жидкостного хроматографа «ЛЮМАХРОМ» с фотометрическим детектированием.

5 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-79, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф «Люмахром».

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005-88. Организация обучения работников безопасности труда по ГОСТ 12.0.004-90.

6 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное химическое образование или опыт работы в химической лаборатории, прошедшего соответствующий инструктаж, освоившего метод в процессе тренировки и уложившегося в нормативы при выполнении процедур контроля точности.

7 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха 20±5°С;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800мм рт. ст.);
- влажность воздуха не более 80% при 25°С;
- напряжение в сети 220±22 В;
- частота переменного тока 50±1 Гц.

8 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: отбор проб, подготовка стеклянной посуды, приготовление растворов, проверка и градуировка хроматографической системы, подготовка пробы к анализу.

8.1 Отбор проб

Отбор и подготовка лабораторной пробы производится в соответствии с нормативно-технической документацией на данный вид продукта (сырья).

8.2 Подготовка стеклянной посуды

Посуду для приготовления и хранения элюента моют только серной кислотой (без применения других моющих средств), ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Остальную стеклянную посуду моют горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и сушат при температуре 105°С.

8.3 Условия проведения хроматографического анализа

Подготовку жидкостного хроматографа к работе проводят в соответствии с Руководством по эксплуатации хроматографа и его блоков.

Условия проведения хроматографического анализа следующие:

- колонка для ВЭЖХ указанной эффективности внутренним диаметром 2 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом (Кромасил С18, зернением 5 мкм);
- предколонка внутренним диаметром 2 мм, заполненная аналогичным обращенно-фазовым сорбентом;
- подвижная фаза - смесь ацетонитрил - изопропанол (90:10) для витаминных концентратов или

  ацетонитрил - изопропанол – вода (96:2:2) для премиксов или ацетонитрил - изопропанол – вода (85:9:6) для сложных премиксов;
- объем петли крана-дозатора 10 мм^3;
- объемная скорость подвижной фазы – 200 мм^3/мин.

8.4 Краткий алгоритм проведения хроматографических измерений

При подготовке и проведении измерений необходимо:

- проверить правильность сборки хроматографической системы в соответствии с руководством по эксплуатации;

- подготовить к работе фотометрический детектор и насос в соответствии с руководствами по эксплуатации;
- установить требуемую объемную скорость подвижной фазы (ПФ) 200 мм^3/мин;
- запустить насос и дождаться прекращения роста давления в хроматографической системе;
- настроить ПО «МультиХром» на прием хроматографических данных;
- перевести детектор в режим «Измерение» и дождаться стабилизации базовой линии, после чего перевести детектор в режим «Ожидание»;
- промыть шприц и петлю крана-дозатора ПФ или ацетонитрилом;
- заполнить петлю крана-дозатора анализируемым раствором (избегая попадания в нее пузырьков воздуха), вводя приблизительно 50 мм^3, при этом кран-дозатор должен находиться в положении «ПЕТЛЯ» (перед вводом в кран-дозатор при наличии капли на конце иглы шприца ее следует удалить фильтровальной бумагой);
- ввести пробу, для чего, не вынимая шприц, переключить кран-дозатор в положение «КОЛОНКА». Одновременно перевести детектор в режим «Измерение»;
- по окончании анализа детектор перевести в режим «Ожидание», переключить кран-дозатор в положение «ПЕТЛЯ» и вынуть шприц, после чего промыть шприц и петлю крана-дозатора ПФ или ацетонитрилом.

Запрещается переключать кран-дозатор в положение «ПЕТЛЯ» во время записи хроматограммы.

Для перехода с одной ПФ на ПФ другого состава (п.3.4.1) следует удалить из камеры насоса остатки предыдущей ПФ; промыть камеру 2-3 см^3 новой ПФ; заполнить камеру новой ПФ и кондиционировать колонку в течение 10-15 мин.

Рекомендуется в конце рабочего дня и/или перед началом работы дополнительно промывать колонку изопропанолом. Для этого следует 2-3 раза подряд произвести дозирование изопропанола в хроматограф, после чего дождаться стабилизации базовой линии.

8.5 Градуировка хроматографической системы

В качестве образцов для градуировки анализатора используют растворы витаминов, приготовленные по п.3.4.4.

Регистрируют не менее двух хроматограмм каждого раствора и по окончании регистрации проверяют стабильность времен удерживания витаминов, используя неравенство:

$$|t_1 - t_2| \leq 0{,}05 \cdot \bar{t}, \qquad (2)$$

где t_1 и t_2 - время удерживания витамина на первой и второй хроматограммах соответственно, мин;

$\bar{t}$ – среднее арифметическое значений t_1 и t_2, мин.

При удовлетворительной стабильности времен удерживания выполняют процедуру градуировки согласно Кратким практическим указаниям по использованию ПО «МультиХром» для проведения анализа проб в режиме ВЭЖХ и определяют параметры градуировочной зависимости и коэффициент корреляции. Градуировку следует считать приемлемой, если величина коэффициента корреляции превышает 0,99, а СКО не более 5%.

Если хотя бы одно из указанных условий (стабильность времен удерживания, значение коэффициента корреляции и СКО) не выполняется, заново регистрируют хроматограммы растворов.

8.6 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной зависимости проводят не реже одного раза в неделю.

Концентрацию раствора для проведения контроля выбирают исходя из предполагаемого содержания витаминов в анализируемых пробах; рекомендуется использовать градуировочный раствор № 2, приготовленный по п.3.4.4.2.

Регистрируют не менее двух хроматограмм раствора и проверяют сходимость времен удерживания и значений концентраций в растворе по формулам (2) и (5) соответственно.

Вычисляют концентрацию в образце для контроля как среднее арифметическое значение для двух вводов ($\bar{X}_к$, мкг/см^3). Градуировочная зависимость признается стабильной, если для каждого витамина выполняется условие:

$$|\bar{X}_к - C| \le 0{,}10 \cdot C, \qquad (3)$$

где C - действительное значение массовой концентрации витамина в растворе, используемом для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3.

Если условие (3) не выполняется, то процедуру контроля повторяют и при получении неудовлетворительного результата контроля градуировку системы проводят заново. Перед тем, как принять решение о переградуировке, следует убедиться, что результат контроля не был случайным (неудачный ввод, разрушение витамина в растворе[1] и т.д.) и может быть воспроизведен.

9 ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

9.1 Подготовка пробы к анализу

Важно: *Анализ экстрактов проб необходимо провести в течение 1 часа, поэтому навески проб премиксов анализируют последовательно.*

9.1.1 Подготовка пробы с использованием перемешивающего устройства

Навеску пробы соответствующей массы (табл.3), измеренную с точностью 0,0005 г, помещают в коническую колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 50 см^3. Добавляют необходимый объем метанола (табл.3) и плотно укупоривают. Смесь тщательно перемешивают, не оставляя частиц пробы на стенках колбы, и вы-

[1] Рекомендуется уточнять концентрации витаминов по индивидуальным растворам с использованием спектрофотометра (Приложение Б).

держивают 1 час в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Затем суспензию перемешивают в течение 1 ч на устройстве для перемешивания проб, отбирают 1-1,5 $см^3$ экстракта в пробирку для центрифугирования и центрифугируют экстракт 3-5 мин со скоростью 4 – 5 тыс. об/мин. Аликвотную порцию экстракта после центрифугирования разбавляют ацетонитрилом (табл.3) и используют для хроматографического анализа. Для проб с низким содержанием витаминов (менее 1 г/кг витамина Е) для разбавления используют раствор БОТ в ацетонитриле по п.3.4.2.

Таблица 3

Содержание витамина А, млн МЕ/кг	Навеска, г	Объем метанола, $см^3$	Коэффициент разбавления экстракта ацетонитрилом
Премиксы			
0,1-1	5	25	3-5 (ацетонитрил с 0,2% БОТ)
1-5	5 - 2,5	25	10
5-10	1	25	10
10-50	0,75-1	25	20
Витаминные концентраты			
40-50	0,25	25	10

Коэффициент разбавления экстракта (Q) вычисляют по формуле:

$$Q = \frac{V_{экст}}{V_{ал}}, \qquad (4)$$

где $V_{экст}$ - объем разбавленного ацетонитрилом экстракта пробы, $см^3$;

$V_{ал}$ - объем аликвотной порции метанольного экстракта пробы, взятый для разбавления, $см^3$.

9.1.2 Подготовка пробы с использованием микровстряхивателя Вортекс

Навеску пробы соответствующей массы (табл.4), измеренную с точностью 0,0005 г, помещают в пробирку с пришлифованной пробкой вместимостью 5 или 10 $см^3$. Добавляют необходимый объем метанола (табл.4) и плотно укупоривают. Смесь тщательно перемешивают, не оставляя частиц пробы на стенках пробирки, и выдерживают 2 ч в защищенном от света месте при комнатной температуре. Затем суспензию перемешивают и встряхивают в течение 1 мин на микровстряхивателе (Вортекс). Отбирают 1-1,5 $см^3$ экстракта в пробирку для центрифугирования и центрифугируют экстракт 3-5 мин со скоростью 4-5 тыс. об/мин.

Аликвотную порцию экстракта после центрифугирования разбавляют ацетонитрилом (табл.4) и используют для хроматографического анализа. Для проб с низким содержанием витаминов (менее 1 г/кг витамина Е) для разбавления используют раствор БОТ в ацетонитриле по п.3.4.2.

Таблица 4

Содержание витамина А, млн МЕ/кг	Навеска, г	Объем метанола, $см^3$	Коэффициент разбавления экстракта ацетонитрилом
Премиксы			
0,1-1	1	5	3-5 (ацетонитрил с 0,2% БОТ)
1-5	1-0,5	5	10
5-10	0,5	10	10
10-50	0,3-0,4	10	20
Витаминные концентраты			
40-50	0,05	5	10

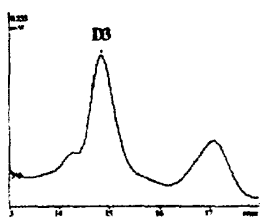
9.2 Проведение хроматографических измерений

Регистрируют хроматограммы экстрактов витаминов (каждого не менее двух раз) в тех же условиях, при которых была проведена

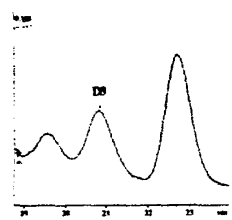
градуировка системы. Идентификацию витаминов в пробе проводят средствами программного обеспечения «МультиХром для Windows» по совпадению времени удерживания витаминов в реальной пробе с их временем удерживания в градуировочном растворе.

Хроматографический анализ витаминных концентратов производят с использованием ПФ состава ацетонитрил - изопропанол 90:10 по п.3.4.1.1 или ацетонитрил - изопропанол - вода 96:2:2 по п.3.4.1.2.

Хроматографический анализ премиксов производят с использованием ПФ ацетонитрил - изопропанол - вода 96:2:2 по п.3.4.1.2. Если на хроматограмме пробы не наблюдается надлежащего разделения в области пика витамина D_3, анализ повторяют с использованием ПФ иного состава: ацетонитрил - изопропанол - вода 85:9:6 по п.3.4.1.3.



ПФ ацетонитрил - изопропанол - вода 96:2:2



ПФ ацетонитрил - изопропанол - вода 85:9:6

Определяют концентрацию витаминов по каждой зарегистрированной хроматограмме и проверяют расхождение полученных значений между собой, используя неравенство

$$| X_{к,1} - X_{к,2} | \leq 0,07 \cdot \bar{X}_к, \qquad (5)$$

где $X_{к,1}$ и $X_{к,2}$ - концентрации витаминов, полученные по первой и второй хроматограммам соответственно, мкг/см^3;

$\bar{X}_к$ – среднее арифметическое значений $X_{к,1}$ и $X_{к,2}$, мкг/см^3.

Если условие (5) выполняется, то в качестве значения концентрации витаминов в экстракте пробы принимают среднее арифме-

тическое полученных значений. Если условие не выполняется, ввод экстракта пробы повторяют.

При необходимости для подтверждения правильности идентификации рекомендуется выполнить добавку раствора витамина к экстракту. О достоверности идентификации можно судить по увеличению высоты (площади) пика витамина. Величина добавки должна составлять 50 - 150 % от найденной концентрации витамина в экстракте пробы, кроме того, необходимо учитывать разбавление экстракта при введении добавки и для его снижения использовать в качестве добавки более концентрированные растворы.

10 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

При использовании программного обеспечения «МультиХром для Windows» массовую долю каждого витамина в пробе (X, г/кг) вычисляют по формуле:

$$X = 10^{-3} \cdot \frac{C_x \cdot V \cdot Q}{m}, \qquad (6)$$

где C_x - концентрация соответствующего витамина в разбавленном экстракте, рассчитанная по градуировочной зависимости, заложенной в ПО «МультиХром», мкг/см^3;

V - объем метанольного экстракта пробы, см^3;

m - масса навески пробы, г;

Q - коэффициент разбавления экстракта пробы ацетонитрилом;

10^{-3} - коэффициент согласования размерности единиц массы.

При необходимости результаты переводят в млн МЕ/кг, используя таблицу 5, по формуле:

$$X_{ME} = \frac{X}{ME}, \qquad (7)$$

где X_{ME} - массовая доля витамина в пробе, выраженная в млн МЕ/кг;

X - массовая доля витамина в пробе, выраженная в г/кг;

ME - значение МЕ витамина, мкг.

Таблица 5 - Значения МЕ для витаминов А, D и Е

Витамин	МЕ, мкг
А (ретинолацетат)	0,344
Е (α-токоферолацетат)	1000
D_3 (холекальциферол)	0,025

11 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Результат измерения в документах, предусматривающих его использование, может быть представлен в виде: $X \pm \Delta$, г/кг, $P = 0,95$, где Δ - показатель точности методики:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot X}{100}, \qquad (8)$$

Значение δ для каждого витамина приведено в таблице 2.

Допускается результат измерения в документах, выдаваемых лабораторией, представлять в виде $X \pm \Delta_л$, г/кг, $P = 0,95$, при условии $\Delta_л < \Delta$, где $\pm \Delta_л$ - значение характеристики погрешности результатов измерений, установленное при реализации методики в лаборатории и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений.

12 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДИКИ В ЛАБОРАТОРИИ

12.1 Общие положения

Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- оперативный контроль процедуры измерений на основе оценки погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры;
- контроль стабильности результатов измерений на основе контроля стабильности среднего квадратического отклоне-

ния (СКО) повторяемости, СКО промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности и погрешности.

Периодичность контроля исполнителем процедуры выполнения измерений на основе оценки погрешности измерений при реализации отдельной контрольной процедуры, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируются в Руководстве по качеству лаборатории.

12.2 Контроль исполнителем процедуры выполнения измерений

Контроль исполнителем процедуры выполнения измерений проводится с использованием образцов для контроля. В качестве таких образцов применяют (в порядке понижения приоритетности) стандартные образцы состава анализируемой продукции; образцы, для которых содержание анализируемых компонентов установлено на основании межлабораторного сличительного эксперимента; образцы, для которых содержание компонентов установлено в данной лаборатории стандартизованными методами; образцы, многократно проанализированные в лаборатории данным методом.

Сравнивают результат контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля K. Результат контрольной процедуры вычисляют по формуле

$$K_к = |X - C|, \qquad (9)$$

где C - опорное (аттестованное) значение, г/кг;

X - результат измерения содержания витамина в образце для контроля, г/кг.

В качестве норматива контроля $K_к$ принимают значение характеристики погрешности измерений, установленное в лаборатории при реализации методики ($\Delta_л$, г/кг); если эти значения еще не установлены (например, при освоении методики), то вместо $\Delta_л$ используют значение 0,84·Δ, где Δ - границы абсолютной погрешности измерений для доверительной вероятности P = 0,95, вычисляемые по формуле (8).

Качество контрольной процедуры признают удовлетворительным, если $K_к \leq K$. При невыполнении неравенства (9) процедуру контроля повторяют. При повторном неудовлетворительном результате находят и устраняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

13 ОЦЕНКА ПРИЕМЛЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ В УСЛОВИЯХ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ

Расхождение между результатами, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости (табл.8), т.е. должно выполняться неравенство

$$|X_2 - X_1| \leq 0{,}01 \cdot \bar{X} \cdot R, \qquad (10)$$

где X_1 и X_2 - результаты измерений, полученные в условиях воспроизводимости (в разных лабораториях), г/кг;

$\bar{X}$ - среднее арифметическое значений X_1 и X_2, г/кг;

R - значение предела воспроизводимости (табл.6), %.

Таблица 6 - Пределы воспроизводимости

Диапазон измерений	Предел воспроизводимости R (для двух результатов измерений, P = 0,95), %
Витамин А, млн МЕ/кг	
От 0,1 до 2,5 вкл.	45
Свыше 2,5 до 50 вкл.	28
Витамин D, млн МЕ/кг	
От 0,04 до 0,5 вкл.	45
Свыше 0,5 до 20,0 вкл.	25
Витамин Е, млн МЕ/кг	
От 0,00005 до 0,005 вкл.	39
Свыше 0,005 до 0,2 вкл.	22

При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного может быть использовано их среднее значение.

При превышении предела воспроизводимости могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно разделу 5 ГОСТ Р ИСО 5725.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)
Приготовление исходных растворов витамина А и витамина Е из фармакопейных препаратов

Для приготовления раствора витамина А могут быть использованы следующие фармакопейные препараты:

- ретинолацетат, 3,44 %-ный раствор в масле (могут быть использованы растворы других концентраций: 6,88% или 8,6%). В 1 г 3,44 %-ного раствора содержится 100000 МЕ ретинолаацетата; 1 МЕ соответствует 0,344 мкг ретинолацетата или 0,300 мкг ретинола;
- желатиновые капсулы с маркировкой 33000 МЕ, содержат 3,44 %-ный раствор ретинолацетата в масле.

Для приготовления раствора витамина Е могут быть использованы следующие фармакопейные препараты:

- α-токоферолацетат, 50%-ный раствор в масле (может быть использован и 30%-ный раствор);
- желатиновые капсулы, содержащие 0,2 г 50%-ного масляного препарата α-токоферолацетата.

А.1 Приготовление растворов витамина А из фармакопейных препаратов ретинолацетата в масле

А.1.1 Приготовление исходного раствора витамина А

0,3 г масляного препарата витамина А концентрации 3,44% растворяют в мерной колбе вместимостью 25 $см^3$, доводят до метки изопропанолом. Хорошо перемешивают, не взбалтывая. Ориентировочное значение массовой концентрации полученного раствора – 400 $мкг/см^3$.

Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 4 ± 2 °С.

А.1.2 Приготовление проверочного раствора ретинолацетата

2,0 $см^3$ исходного раствора (п.А.1.1) переносят в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ и доводят до метки **этанолом**. Ориентировоч-

ное значение массовой концентрации раствора 32 мкг/см^3.

Далее 2,0 см^3 раствора витамина А с концентрацией 32 мкг/см^3 переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и доводят до метки этанолом. Ориентировочное значение массовой концентрации полученного *проверочного* раствора 2,5 мкг/см^3.

Действительное значение массовой концентрации проверочного раствора ретинолацетата определяют спектрофотометрическим методом, измеряя оптическую плотность раствора при 325 - 326 нм. Образец сравнения – этанол, использованный при приготовлении раствора.

Массовую концентрацию ретинолацетата в проверочном растворе $C_{пр}$, мкг/см^3, рассчитывают по формуле:

$$C_{пр} = 10000 \cdot \frac{D}{\varepsilon \times l}, \qquad (А.1)$$

где D - оптическая плотность;

l - толщина поглощающего слоя кюветы, см;

ε - коэффициент экстинкции (таблица Б.1);

10000 - коэффициент согласования размерности единиц массы и объема при вычислении концентрации раствора.

Концентрацию ретинолацетата в исходном растворе, $C_{исх}$, мкг/см^3, вычисляют по формуле:

$$C_{исх} = C_{пр} \cdot \rho, \qquad (А.2)$$

где ρ - соотношение объемов мерной колбы, использованной для приготовления проверочного раствора, и аликвотной порции исходного раствора (в соответствии с приведенными рекомендациями ρ = 156,25).

Проверочный раствор ретинолацетата в этаноле рекомендуется использовать в течение 1 час.

Примечание. Для исходных масляных препаратов другой концентрации (например, 6,88 или 8,6 %) следует изменить разбавление этанолом проверочного раствора таким образом, чтобы оптическая плотность полученного раствора была бы более 0,2, но менее чем 0,8. Для того чтобы значения оптической плотности анализируемого раствора не выходили за указанные

пределы при l=1 см, концентрация раствора ретинолацетата должна находиться в диапазоне от 1,3 до 5,2 мкг/см^3.

А.2 Приготовление растворов витамина Е из фармакопейных препаратов α-токоферолацетата в масле

А.2.1 Приготовление исходного раствора витамина Е

Навеску масляного препарата α-токоферолацетата, рассчитанную исходя из имеющегося препарата так, чтобы масса α-токоферолацетата в навеске составляла приблизительно 100 мг[1], растворяют в **изопропаноле** в мерной колбе вместимостью 25 см^3 и доводят до метки **изопропанолом**. Хорошо перемешивают, не взбалтывая. Массовая концентрация α-токоферолацетата в полученном *исходном* растворе *ориентировочно* соответствует 4 мг/см^3.

Срок хранения исходного раствора 6 месяца при температуре 4 - 6 °С.

А.2.2 Приготовление проверочного раствора витамина Е

0,5 см^3 *исходного* раствора витамина Е переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и доводят до метки **этанолом**. Концентрация витамина Е в полученном *проверочном* растворе ориентировочно соответствует 80 мкг/см^3. Действительное значение концентрации витамина Е определяют спектрофотометрическим методом, измеряя оптическую плотность проверочного раствора при 285 нм. Образец сравнения – этанол, использованный при приготовлении раствора.

Концентрацию витамина Е в проверочном растворе $C_{пр}$, мкг/см^3, рассчитывают по формуле, аналогичной формуле (А.1). Концентрацию исходного раствора витамина Е вычисляют по формуле, аналогичной формуле (А.2) (в соответствии с приведенными рекомендациями ρ = 50).

Срок хранения проверочного раствора 1 неделя при температуре 4 - 6 °С.

Примечание. Если полученное значение оптической плотности выше

[1] Для 50% масляного раствора величина навески составляет 200 мг.

0,8, то раствор разбавляют этиловым спиртом таким образом, чтобы оптическая плотность полученного раствора была бы более 0,2, но менее, чем 0,8. Для того, чтобы значения оптической плотности анализируемого раствора не выходили за указанные пределы, концентрация α-токоферолацетата в растворе должна находиться в диапазоне от 47 до 188 мкг/см^3.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(обязательное)
Проверка концентрации исходных растворов витаминов A, D, E

Проверка концентрации исходных растворов витаминов А и Е производится в соответствии с п.п.А.1.2 и А.2.2 соответственно.

Б.1 Проверка концентрации исходного раствора витамина D3

1 $см^3$ исходного раствора витамина D_3 переносят в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ и доводят до метки **этанолом.** Концентрация витамина D_3 в полученном *проверочном* растворе ориентировочно соответствует 8 $мкг/см^3$. Действительное значение концентрации витамина D_3 определяют спектрофотометрическим методом, измеряя оптическую плотность проверочного раствора при 264 нм. Образец сравнения – этанол, использованный при приготовлении раствора.

Концентрацию витамина D_3 в проверочном растворе $C_{пр}$, $мкг/см^3$, рассчитывают по формуле (А.1). Концентрацию исходного раствора витамина D_3 вычисляют по формуле (А.2) с учетом $\rho = 25$.

Срок хранения проверочного раствора 1 неделя при температуре 4 - 6 °С.

Таблица Б.1 - Значения коэффициентов экстинкции (ε) для 1% растворов ($l = 1$ см)

Витамин	λ, нм	ε
А (ретинолацетат)	326	1550
Е (α-токоферолацетат)	284	42,5
D_3 (холекальциферол)	264	473

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

Государственный научный метрологический центр

ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии»

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики выполнения измерений

№ 223.1.16.07.441/2006

Методика выполнения измерений массовых долей витаминов А, Е и D в премиксах и витаминных концентратах методом обращено-фазовой ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа «ЛЮМАХРОМ».

(наименование измеряемой величины: объекта и метода измерений)

разработанная ООО «ЛЮМЭКС» (г. Санкт-Петербург),

(наименование организации (предприятия), разработавшей МВИ)

аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов по разработке методики выполнения измерений

(вид работ: метрологическая экспертиза материалов по разработке МВИ, теоретическое или экспериментальное исследование МВИ, другие виды работ)

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками, приведенными в приложении.

(диапазон измерений, характеристики погрешности измерений (неопределенность измерений) и (или) характеристики составляющих погрешности (при необходимости – нормативы контроля))

Приложение: метрологические характеристики МВИ на 1 листе

Зам.директора по научной работе С.В. Медведевских

Зав.лабораторией

Дата выдачи: 15.12.2006 г.

Срок действия: 15.12.2011 г.

Россия, 620000, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, 4
тел. (343) 350-26-18, факс (343) 350-39-39, E-mail: uniim@uniim.ru

Приложение к свидетельству № 223.1.16.07.441/2006
об аттестации методики выполнения измерений
массовых долей витаминов А (в форме ретинолацетата), Е (в форме α-токоферолацетата) и D (в форме холекальциферола) в премиксах и витаминных концентратах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа «ЛЮМАХРОМ»

1. Наименование определяемых витаминов, диапазоны измерений

Наименование витамина	Диапазоны измерений, млн МЕ/кг	Диапазоны измерений, г/кг
А (в форме ретинолацетата)	0,1 – 50	0,344 – 17,2
Е (форме α-токоферолацетата)	0,0005 – 0,2	0,5 – 200
D (холекальциферола)	0,04 –20	0,001-0,4
Примечание - МЕ - международные единицы		

2. Наименование витаминов, значения показателей точности, повторяемости, воспроизводимости

Наименование витамина	Диапазон измерений, Млн МЕ/кг	Показатель повторяемости (относительное значение среднего квадратического отклонения повторяемости), σ_r,%	Показатель воспроизводимости (относительное значение среднего квадратического отклонения воспроизводимости), σ_R,%	Показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности P=0,95), ± δ,%
А	От 0,1 до 2,5 вкл.	10	16	32
	Св. 2,5 до 50 вкл.	5	10	20
D	От 0,04 до 0,5 вкл.	10	16	32
	Св. 0,5 до 20,0 вкл.	5	9	18
Е	От 0,0005до 0,005 вкл.	9	14	28
	Св. 0,005 до 0,2 вкл.	5	8	16

3. Диапазон измерений, значения предела воспроизводимости при вероятности P=0,95

Наименование витамина	Диапазон измерений, млн МЕ/кг	Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях), R, %
А	От 0,1 до 2,5 вкл.	45
	Св. 2,5 до 50 вкл.	28
D	От 0,04 до 0,5 вкл.	45
	Св. 0,5 до 20,0 вкл.	25
Е	От 0,0005 до 0,005 вкл.	39
	Св. 0,005 до 0,2 вкл.	22

4. При реализации методики в лаборатории обеспечивают:
- оперативный контроль процедуры измерений (на основе оценки погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, среднеквадратического отклонения внутрилабораторной прецизионности, погрешности).
Алгоритм оперативного контроля процедуры измерений приведен в документе на методику выполнения измерений.
Процедуры контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Старший научный сотрудник лаборатории 223 ФГУП «УНИИМ» О.В.Кочергина

gost.e-ecolog.ru