МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 14148— 2015

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение витамина K_1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 14148:2003, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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 Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол от 27 февраля 2015 г. № 75-П)

За принятие 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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 мая 2016 г. № 312-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14148—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 14148:2003 «Продукция пищевая. Определение витамина К1 с помощью ВЭЖХ» («Foodstuffs. Determination of vitamin K1 by HPLC», IDT)

Европейский стандарт EN 14148:2003 разработан техническим комитетом CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

Официальный экземпляр европейского стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и европейского стандарта, на который дана ссылка, имеются в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им нормативные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Сущность метода . . . 1
4 Реактивы . . . 1
5 Оборудование . . . 3
6 Методика проведения испытания . . . 4
7 Обработка результатов измерений . . . 5
8 Прецизионность . . . 5
9 Протокол испытаний . . . 6
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм . . . 8
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности . . . 10
Приложение С (справочное) Альтернативные системы ВЭЖХ . . . 11
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам . . . 12
Библиография . . . 13

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

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение витамина K_1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs.
Determination of vitamin K_1 by high performance liquid chromatographic method

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина K_1 в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение витамина K_1 проводится путем измерения восстановленного филлохинона. Метод прошел валидацию для молока и детских смесей, однако известен опыт лабораторий, который показал, что метод также применим к другой пищевой продукции [10].

2 Нормативные ссылки

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

EN ISO 3696 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Витамин K_1 отделяют в растворе пробы от сопутствующих веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и определяют флуориметрическим методом после восстановления в послеколоночном реакторе. Количественно определяют сумму изомеров витамина K_1, которые на колонках с фазой C_{18} выходят в виде единого неразрешенного пика [1]–[4].

4 Реактивы

4.1 Общие положения

Для проведения анализа, если не указано иное, используют только реактивы признанной аналитической чистоты и воду не ниже первой степени чистоты по EN ISO 3696 или дистиллированную воду.

4.2 Химические вещества и растворы

4.2.1 Метанол, массовая доля $w(CH_3OH) \geq 99{,}8$ %.

4.2.2 Этанол, объемная доля $\varphi(C_2H_5OH) \geq 99{,}8$ %.

4.2.3 Смесь этанола и метанола, объемная доля $\varphi(C_2H_5OH) = 95$ %

Смешивают 950 $см^3$ этанола (4.2.2) с 50 $см^3$ метанола (4.2.1).

4.2.4 Дихлорметан, массовая доля $w(CH_2Cl_2) \geq 99,5$ %.

4.2.5 Н-гексан, массовая доля $w(C_6H_{14}) \geq 97$ %.

4.2.6 Петролейный эфир, с диапазоном температуры кипения 35–60 °С, ч. д. а.

4.2.7 Гидроксид калия, массовая доля $w(KOH) \geq 85$ %.

4.2.8 Раствор гидроксида калия молярной концентрации $c(KOH) = 10$ моль/дм^3.

4.2.9 Калий фосфорнокислый однозамещенный, массовая доля $w(KH_2PO_4) \geq 99,5$ %.

4.2.10 Карбонат калия, массовая доля $w(K_2CO_3) \geq 99,9$ %.

4.2.11 Ацетат натрия, безводный, массовая доля $w(CH_3COONa) \geq 99,5$ %.

4.2.12 Уксусная кислота, массовая доля $w(CH_3COOH) \geq 99,8$ %.

4.2.13 Хлорид цинка, массовая доля $w(ZnCl_2) \geq 98$ %.

4.2.14 Цинк, порошок, размер частиц < 63 мкм, массовая доля $w(Zn) \geq 97$ %.

4.2.15 Фосфатный буфер с pH 7,9–8,0

Растворяют 54,0 г калия фосфорнокислого однозамещенного (4.2.9) примерно в 350 см^3 воды, регулируют pH до 7,9–8,0 раствором гидроксида калия (4.2.8) и разбавляют до 500 см^3 водой.

4.2.16 Раствор хлорида-ацетата цинка

Взвешивают 13,7 г хлорида цинка (4.2.13), 4,1 г безводного натрия ацетата (4.2.11) и 3,0 г уксусной кислоты (4.2.12) и переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3, растворяют в метаноле (4.2.1) и объем содержимого колбы доводят до метки метанолом.

4.2.17 Липаза типа VII

Липаза из *Candida rugosa* с каталитической активностью 1000 Ед/мг или другой подходящий вариант[1)]. Могут использоваться другие источники фермента из видов *Pseudomonas* и *Rhizopus* с учетом разницы в показателях активности.

4.2.18 Подвижная фаза для ВЭЖХ.

Смешивают 100 см^3 дихлорметана (4.2.4), 900 см^3 метанола (4.2.1) и 5 см^3 раствора хлорида-ацетата цинка (4.2.16). Фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

4.3 Витамин K_1, образец сравнения (филлохинон, 3-фитилменадион), массовая доля $w(C_{31}H_{46}O_2) \geq 99$ %

Витамин K_1 можно приобрести у различных поставщиков. Степень чистоты филлохинона может отличаться. Поэтому необходимо определить массовую концентрацию градуировочного раствора спектрофотометрическим методом в ультрафиолетовой области (см. 4.4.4).

4.4 Исходные растворы

4.4.1 Меры предосторожности

Витамин K_1 очень чувствителен к свету. Следует принять меры по защите образца сравнения и соответствующих растворов в процессе выполнения методики с использованием лабораторной посуды из коричневого стекла.

4.4.2 Исходный раствор I витамина K_1, массовой концентрацией $\rho(C_{31}H_{46}O_2) = 1,0$ мг/см^3

Взвешивают около 100 мг (точная навеска) образца сравнения витамина K_1 (4.3), переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в метаноле (4.2.1) и объем содержимого колбы доводят до метки метанолом. Раствор можно хранить в среде азота в течение 3 мес при температуре минус 20 °С в темном месте.

Примечание — При растворении указанных количеств витамина K_1 могут возникнуть затруднения.

4.4.3 Исходный раствор II витамина K_1, массовой концентрацией $\rho(C_{31}H_{46}O_2) = 50,0$ мкг/см^3

Переносят пипеткой 5,0 см^3 исходного раствора I витамина K_1 (4.4.2) в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и объем содержимого колбы доводят до метки метанолом (4.2.1). Раствор может храниться в среде азота в течение 1 мес при температуре минус 20 °С в темном месте.

4.4.4 Определение массовой концентрации

Выпаривают 5,0 см^3 исходного раствора II витамина K_1 (4.4.3) с помощью ротационного испарителя в условиях частичного вакуума или под воздействием потока азота. Повторно растворяют осадок в 25,0 см^3 н-гексана (4.2.5) или петролейного эфира (4.2.6).

[1)] Например, L-1754; Sigma Chemical Co, P.O. 14508, Saint Louis MO 63178, USA (США). Указанный продукт использовался в межлабораторном испытании. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанного продукта со стороны CEN. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если было установлено, что они дают аналогичные результаты.

Измеряют на спектрофотометре (5.1) оптическую плотность раствора в кювете с оптической длиной пути 1 см относительно н-гексана или петролейного эфира в качестве образца сравнения в максимуме поглощения при длине волны около 248 нм. Рассчитывают массовую концентрацию витамина K_1 в исходном растворе II витамина K_1 (4.4.3) ρ, мкг/см^3, по формуле

$$\rho = \frac{A_{248} \cdot 10^4 \cdot 5}{416}, \quad (1)$$

где A_{248} — величина оптической плотности раствора в максимуме поглощения при длине волны около 248 нм;

10^4 — коэффициент для перевода $A^{1\%}_{1\,см}$ в микрограмм на миллилитр;

5 — коэффициент разбавления при замене растворителя метанола на н-гексан;

419 — величина $A^{1\%}_{1\,см}$ витамина K_1 в н-гексане (4.2.5) или петролейном эфире (4.2.6) при 248 нм ([5]);

4.5 Стандартные растворы

4.5.1 Промежуточный стандартный раствор витамина K_1, массовая концентрация $\rho(C_{31}H_{46}O_2)$ = 2,5 мкг/см^3

Пипеткой переносят 5,0 см^3 исходного раствора II витамина K_1 (4.4.3) в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и объем содержимого колбы доводят до метки метанолом (4.2.1).

4.5.2 Стандартный аналитический раствор витамина K_1 для ВЭЖХ, массовая концентрация $\rho(C_{31}H_{46}O_2)$ = 25,0 нг/см^3

Пипеткой переносят 1 см^3 промежуточного стандартного раствора витамина K_1 (4.5.1) в мерную колбу из коричневого стекла вместимостью 100 см^3 и объем содержимого колбы доводят до метки метанолом (4.2.1). Данный раствор должен быть свежеприготовленным.

5 Оборудование

Используют стандартное лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

5.1 Ультрафиолетовый спектрофотометр

УФ-спектрофотометр, способный измерять оптическую плотность при установленной длине волны, в кюветах с оптической длиной пути 1 см.

5.2 Система для ВЭЖХ

Система для ВЭЖХ, состоящая из насоса, устройства для инжекции проб, флуориметрического детектора, позволяющего выполнять измерения при заданных длинах волн (например, при длине волны возбуждения 243 нм и длине регистрации 430 нм), и системы для сбора и обработки данных (например, интегратора).

5.3 Колонка для ВЭЖХ

Аналитическая колонка с обращенной фазой, диаметром 3,0–4,6 мм, длиной 100–250 мм, заполненная частицами размером 3–10 мкм.

Допускается использовать колонки других размеров или с частицами другого размера. В этом случае параметры разделения должны быть адаптированы к таким материалам, чтобы обеспечить аналогичные результаты.

Могут использоваться и другие системы (см. приложение С), которые обеспечивают надлежащее разделение филлохинона от других совместно экстрагируемых компонентов пробы.

5.4 Система послеколоночной дериватизации

Колонка из нержавеющей стали или стекла, помещенная между аналитической колонкой и флуориметрическим детектором, диаметром 2,0–6,0 мм, длиной 10–150 мм, заполненная цинковым порошком (4.2.14).

5.5 Устройство для фильтрации

Подходит мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Примечание — Фильтрация подвижной фазы, так же как и раствора пробы, через мембранный фильтр до использования или инжектирования может увеличить срок службы колонок.

6 Методика проведения испытания

6.1 Меры предосторожности

Витамин K_1 очень чувствителен к свету. Во время проведения испытаний следует принимать меры для защиты пробы и соответствующих растворов с использованием лабораторной посуды из коричневого стекла.

6.2 Подготовка аналитической пробы

Гомогенизируют аналитическую пробу. Измельчают грубый материал при помощи соответствующего измельчителя и снова перемешивают, предварительно охлаждая, чтобы не допустить воздействия высокой температуры в течение длительного периода.

6.3 Приготовление раствора пробы

6.3.1 Экстракция из пробы

Взвешивают 1 г порошкообразной или 10 г жидкой пробы с точностью до 0,001 г в закрывающуюся аналитическую пробирку или коническую колбу. В порошкообразную пробу добавляют 15 $см^3$ воды с температурой 40 °С и перемешивают на вортексе, в жидкую пробу добавляют 5 $см^3$ воды с температурой 40 °С. Проводят холостой опыт, используя только реактивы без пробы (см. 6.5).

6.3.2 Обработка ферментом

Добавляют 5 $см^3$ фосфатного буфера с pH 7,9–8,0 (4.2.15) и перемешивают. Добавляют 1,0 г липазы (4.2.17), перемешивают на вортексе, закрывают пробкой и встряхивают в течение примерно 2–3 мин. Выдерживают смесь при температуре (37 ± 2) °С в течение 2 ч. Через равные промежутки времени, например 20 мин, энергично встряхивают смесь вручную.

6.3.3 Экстракция

Смесь охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 $см^3$ смеси этанола и метанола (4.2.3) и 1,0 г карбоната калия (4.2.10) и хорошо перемешивают. Добавляют установленный объем V_E (30 $см^3$) н-гексана (4.2.5) и энергично встряхивают. Затем оставляют в темном месте до разделения фаз или центрифугируют при 2000*g* в течение 10 мин. Н-гексановый экстракт можно хранить в течение ночи при температуре 4 °С в среде азота в темном месте.

6.3.4 Перенос и разбавление фазы

Переносят в виалу пипеткой аликвотный объем V_a фазы н-гексана (6.3.3): 0,5 $см^3$ для обогащенной пробы и 5,0 $см^3$ для необогащенной пробы. Удаляют растворитель в токе азота и снова растворяют осадок в установленном объеме *V* метанола (4.2.1) — 1,0 $см^3$, получая раствор анализируемой пробы для анализа методом ВЭЖХ.

6.4 Идентификация

Идентифицируют витамин K_1, сравнивая время удержания пика на хроматограммах, полученных при анализе раствора анализируемой пробы (6.3.4) и стандартного аналитического раствора (4.5.2). Идентификацию пика также можно выполнить, если добавлять соответствующие стандартные растворы в небольшом количестве в раствор анализируемой пробы.

Было доказано, что разделение и количественный анализ являются удовлетворительными при соблюдении указанных ниже экспериментальных условий (см. также рисунки А.1 — А.3). Альтернативные условия ВЭЖХ приведены в таблице С.1.

Неподвижная фаза и размеры колонки:	Resolve C18, 5 мкм, 150 × 3,9 мм.
Подвижная фаза:	Смешивают 100 $см^3$ дихлорметана (4.2.4), 900 $см^3$ метанола (4.2.1) и 5 $см^3$ раствора хлорида-ацетата цинка (4.2.16).

Скорость потока:	1,0 см^3/мин.
Инжектируемый объем:	20 мм^3.
Колонка для дериватизации:	Колонка из нержавеющей стали размером 20 × 4 мм, заполненная цинковым порошком (4.2.14).
Детектирование:	Флуориметрическое, длина волны возбуждения — 243 нм; длина волны регистрации — 430 нм.

Примечания

1 На неподвижных фазах С18 изомеры витамина K_1 (цис- и транс-) элюируются единым неразрешенным пиком ([6], [7]). Современные исследования показали, что разделение изомеров в пробах пищевой продукции может быть осуществлено на колонках с фазой С30 ([10]). В стандартных растворах и концентратах проб изомеры могут быть определены в условиях нормальнофазовой хроматографии с применением ультрафиолетового детектирования ([8], [9]).

2 В ходе экспериментальных исследований было установлено, что колонку для дериватизации можно нагреть до 40 °С во время проведения анализов методом ВЭЖХ, для ускорения дериватизации.

6.5 Определение

Инжектируют 20 мм^3 стандартного раствора анализируемой пробы (4.5.2) и аналитического раствора пробы (6.3.4) в хроматографическую систему.

При использовании метода внешнего стандарта находят интегрированием значения площадей пиков или определяют высоты пиков и сравнивают результаты с соответствующими значениями для образца сравнения.

Обычно концентрация витамина K_1 в растворе пробы очень мала. Поэтому, чтобы избежать загрязнений, все работы необходимо проводить с использованием чистой лабораторной посуды. Чтобы убедиться в отсутствии загрязнений, проводят холостую пробу с использованием тех же количеств реактивов, но без анализируемой пробы.

7 Обработка результатов измерений

Результат измерений рассчитывают при помощи градуировочной характеристики, либо используют соответствующие программы интегратора, либо применяют следующий упрощенный способ.

Рассчитывают массовую долю витамина K_1 w, мкг/100 г пробы, по формуле

$$w = \frac{A_S \cdot \rho \cdot V \cdot V_E \cdot 100}{A_{ST} \cdot m \cdot V_A \cdot 1000}, \quad (2)$$

где A_S — площадь пика или высота пика витамина K_1, полученная при использовании раствора анализируемой пробы (6.3.4), в единицах площади или высоты;

ρ — массовая концентрация витамина K_1 в стандартном аналитическом растворе (4.5.2), нг/см^3;

V — конечный объем аналитического раствора пробы (6.3.4), см^3;

V_E — объем экстракта н-гексана (6.3.3), см^3;

100 — коэффициент для перевода массовой доли на 100 г пробы;

A_{ST} — площадь пика или высота пика витамина K_1, полученная при использовании стандартного аналитического раствора (4.5.2), в единицах площади или высоты;

m — масса пробы, г;

V_A — объем аликвоты экстракта, использованной для переноса фазы, см^3;

1000 — коэффициент для перевода нанограммов в микрограммы.

Результат измерений для витамина K_1 регистрируют в протоколе в микрограммах на 100 г пробы.

8 Прецизионность

8.1 Общие положения

Данные по прецизионности определения витамина K_1 были получены в 1998 году при межлабораторном испытании, проводимом в соответствии с Международным руководством AOAC на различных обогащенных и необогащенных пробах молочных продуктов [4]. Эти данные представлены в приложении В. Результаты, полученные в ходе совместного исследования, не обязательно могут быть

применены к содержанию исследуемого вещества и матрицам пробы, отличным от представленных в приложении В.

8.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между двумя отдельными результатами испытаний, которые были получены при применении одного и того же метода на идентичном испытательном материале одним и тем же оператором на одном и том же оборудовании в течение короткого промежутка времени, не должно превышать предел повторяемости *r* более чем в 5 % случаев.

Значения для витамина K_1:

ультрапастеризованное цельное жидкое необогащенное молоко (1)	$\bar{x}$ = 0,49 мкг/100 г	*r* = 0,12 мкг/100 г
сухое молоко из цельного козьего молока (2)	$\bar{x}$ = 6,63 мкг/100 г	*r* = 0,60 мкг/100 г
детские смеси на основе молока с пониженной жирностью обогащенные (3)	$\bar{x}$ = 118,07 мкг/100 г	*r* = 14,01 мкг/100 г
детские смеси на основе сыворотки с пониженной жирностью обогащенные (4)	$\bar{x}$ = 32,24 мкг/100 г	*r* = 4,31 мкг/100 г
детские смеси на основе сои с повышенной жирностью, обогащенные (5)	$\bar{x}$ = 78,69 мкг/100 г	*r* = 5,71 мкг/100 г
детские смеси на основе сыворотки с повышенной жирностью, обогащенные (6)	$\bar{x}$ = 49,64 мкг/100 г	*r* = 7,11 мкг/100 г
детские смеси на основе сыворотки с пониженной жирностью обогащенные (7)	$\bar{x}$ = 90,94 мкг/100 г	*r* = 11,32 мкг/100 г
NIST SRM 1846[1)] сухая детская смесь (8)	$\bar{x}$ = 94,62 мкг/100 г	*r* = 15,05 мкг/100 г

Число в скобках — номер пробы в таблице В.1 (см. приложение В).

8.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между двумя отдельными результатами испытаний, полученными при применении одного и того же метода на идентичном испытательном материале двумя лабораториями, не должно превышать предел воспроизводимости *R* более чем в 5 % случаев.

Значения для витамина K_1:

ультрапастеризованное, цельное, жидкое, необогащенное молоко (1)	$\bar{x}$ = 0,49 мкг/100 г	*R* = 0,15 мкг/100 г
сухое молоко из цельного козьего молока (2)	$\bar{x}$ = 6,63 мкг/100 г	*R* = 1,08 мкг/100 г
детские смеси на основе молока с пониженной жирностью обогащенные (3)	$\bar{x}$ = 118,07 мкг/100 г	*R* = 18,19 мкг/100 г
детские смеси на основе сыворотки с пониженной жирностью обогащенные (4)	$\bar{x}$ = 32,24 мкг/100 г	*R* = 5,98 мкг/100 г
детские смеси на основе сои, с повышенной жирностью, обогащенные (5)	$\bar{x}$ = 78,69 мкг/100 г	*R* = 9,53 мкг/100 г
детские смеси на основе сыворотки, с повышенной жирностью, обогащенные (6)	$\bar{x}$ = 49,64 мкг/100 г	*R* = 10,65 мкг/100 г
детские смеси на основе сыворотки, с пониженной жирностью, обогащенные (7)	$\bar{x}$ = 90,94 мкг/100 г	*R* = 11,60 мкг/100 г
NIST SRM 1846[2)], сухая детская смесь (8)	$\bar{x}$ = 94,62 мкг/100 г	*R* = 17,95 мкг/100 г

Число в скобках — номер пробы в таблице В.1 (см. приложение В).

9 Протокол испытаний

Протокол испытания должен содержать следующие сведения:

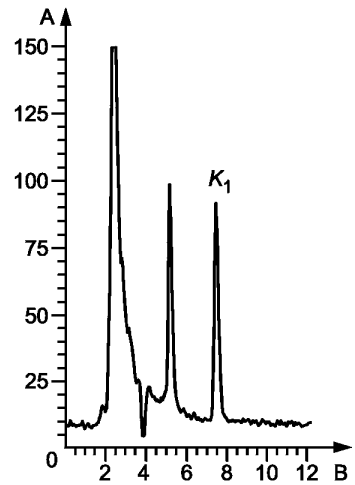
[1)] Принято опорное значение при испытаниях (94 ± 10) мкг/100 г.

[2)] Принято опорное значение при испытаниях (94 ± 10) мкг/100 г.

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
b) ссылку на настоящий стандарт или примененный метод;
c) дату и тип методики отбора пробы (если они известны);
d) дату поступления пробы в лабораторию;
e) дату проведения испытания;
f) результаты испытания с указанием единиц выражения результатов;
g) все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытания;
h) все операции, не оговоренные в методике или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результаты испытания.

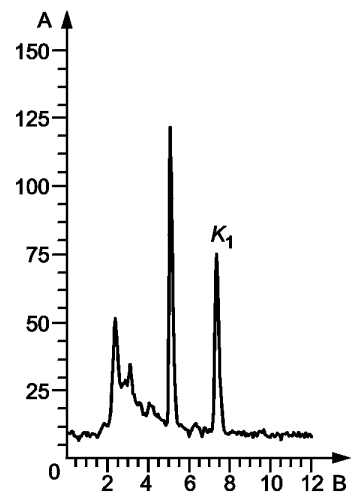
Приложение А
(справочное)

Примеры хроматограмм



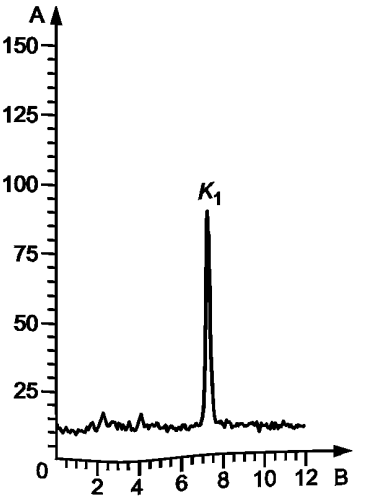
A — интенсивность, мВ;
B — время, мин.

Рисунок А.1 — Пример разделения витамина K_1 из пробы 1 (ультрапастеризованное цельное жидкое необогащенное молоко) методом ВЭЖХ



A — интенсивность, мВ;
B — время, мин.

Рисунок А.2 — Пример разделения витамина K_1 из пробы 2 (сухое молоко из цельного козьего молока) методом ВЭЖХ



A — интенсивность, мВ;
B — время, мин.

Рисунок А.3 — Пример разделения витамина K_1 из пробы 5
(обогащенные детские смеси на основе сои с повышенной жирностью) методом ВЭЖХ

Неподвижная фаза и размеры колонки:	Resolve C18, 5 мкм, 150 × 3,9 мм
Подвижная фаза:	Смешивают 100 $см^3$ дихлорметана (4.2.4), 900 $см^3$ метанола (4.2.1) и 5 $см^3$ раствора хлорида-ацетата цинка (4.2.16).
Скорость потока:	1,0 $см^3$/мин
Инжектируемый объем:	20 $мм^3$
Колонка для дериватизации:	Колонка из нержавеющей стали размером 20 × 4 мм, заполненная цинковым порошком (4.2.14).
Детектирование:	Флуориметрическое, длина волны возбуждения — 243 нм; длина волны регистрации — 430 нм.

Приложение В
(справочное)

Данные по прецизионности

Следующие данные по прецизионности были установлены при межлабораторном совместном испытании [4].

Таблица В.1

Номер пробы	1	2	3	4	5	6	7	8
Исследуемое вещество	Витамин K_1	Витамин K_1	Витамин K_1	Витамин K_1	Витамин K_1	Витамин K_1	Витамин K_1	Витамин K_1
Год межлабораторного испытания	1998	1998	1998	1998	1998	1998	1998	1998
Количество лабораторий	33	34	34	34	34	34	34	34
Количество проб	2	2	2	2	2	2	2	2
Количество лабораторий, оставшихся после вычитания выбросов	32	29	34	34	34	34	33	34
Количество выбросов	1	5	0	0	0	0	1	0
Количество комплектов данных	62	56	66	66	66	66	64	66
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/100 г	0,49	6,63	118,07	32,24	78,69	49,64	90,94	94,62
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/100 г	0,04	0,21	5,00	1,54	2,04	2,54	4,04	5,38
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	9,03	3,23	4,24	4,77	2,59	5,11	4,44	5,68
Предел повторяемости r [$r = 2,8 \cdot s_r$], мкг/100 г	0,12	0,60	14,01	4,31	5,71	7,11	11,32	15,05
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	0,05	0,39	6,50	2,14	3,40	3,80	4,14	6,41
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	10,94	5,81	5,50	6,63	4,33	7,66	4,56	6,78
Предел воспроизводимости R [$R = 2,8 \cdot s_R$], мкг/100 г	0,15	1,08	18,19	5,98	9,53	10,65	11,60	17,95

Пробы:
1 — ультрапастеризованное цельное жидкое необогащенное молоко;
2 — сухое молоко из цельного козьего молока;
3 — обогащенная детская смесь на основе молока с пониженной жирностью;
4 — обогащенная детская смесь на основе сыворотки с пониженной жирностью;
5 — обогащенная детская смесь на основе сои с повышенной жирностью;
6 — обогащенная детская смесь на основе сыворотки с повышенной жирностью;
7 — обогащенная детская смесь на основе сыворотки с пониженной жирностью;
8 — NIST SRM 1846, сухая детская смесь с принятым значением (94 ± 10) мкг/100 г.

Приложение С
(справочное)

Альтернативные системы ВЭЖХ

Разделение и количественное определение витамина K_1 было признано удовлетворительным при применении следующих хроматографических условий [4].

Таблица С.1

Неподвижная фаза	Размеры колонки, (мм × мм)[a]	Колонка для дериватизации, (мм × мм)[a]	Скорость потока, ($см^3$/мин)[c]
Alltima® C18, 5 мкм	150 × 4,6	20 × 4	1,5
Novapak® C18, 5 мкм	100 × 8,0	20 × 4	1,5
Lichrospher® 100 RP18, 5 мкм	250 × 4,0	125 × 3[b]	1,5
Resolve® C18, 5 мкм	150 × 3,9	20 × 4	1,0
L-Column® ODS, 5 мкм	250 × 4,6	20 × 4	0,8
L-Column® ODS, 5 мкм	150 × 4,6	10 × 6	0,8
Capcell Pak® C18, 5 мкм	250 × 4,6	20 × 2	1,0
Econosphere® C18, 5 мкм	250 × 4,6	30 × 4,6	1,0
Vydac® C18, 5 мкм	250 × 4,6	20 × 4	1,0
Nucleosil® 120 C18, 5 мкм	250 × 4,0	30 × 4	1,3
Spherisorb® ODS2, 5 мкм	250 × 4,6	20 × 4	1,5
Varian® C18, 5 мкм	250 × 4,6	20 × 4,6	1,2
Pickering® C18, 5 мкм	150 × 4,6	20 × 4	1,0
Hypersil® BDS C18, 3 мкм	150 × 3,0	40 × 2	0,5
ChromSpher® C18, 5 мкм	100 × 3,0	40 × 3	0,6
Hypersil® ODS, 5 мкм	250 × 4,6	20 × 4	1,0
Vydac® 201 TP54 C18, 5 мкм	250 × 4,6	50 × 2,1	0,8
Partisil® ODS3, 5 мкм	250 × 4,6	20 × 4	1,0
Supelco® C18, 5 мкм	250 × 4,0	30 × 4	1,5
YMC Pack® ODS-AM, 5 мкм	250 × 4,6	150 × 4,6	1,3
Zorba® R× C18, 5 мкм	150 × 4,6	20 × 4	1,0
Zorba® ODS, 5 мкм	250 × 4,6	20 × 4	1,5
µ Bondapak® C18, 10 мкм	300 × 3,9	20 × 4	1,0
Prodigy® ODS3, 5 мкм	150 × 4,6	20 × 4	1,5
YMC® C30, 5 мкм [d]	250 × 4,6	20 × 4	1,5

[a] Нержавеющая сталь.
[b] Стекло.
[c] Состав подвижной фазы, который указан в настоящем стандарте.
[d] Данная колонка отделяет изомеры витамина K_1 (цис- и транс-). Результаты, полученные на этой колонке, не включены в статистические данные.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
EN ISO 3696	—	*
* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык европейского стандарта EN ISO 3696. Официальный перевод данного европейского стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов Российской Федерации.		

Библиография

[1] Indyk, H. E., and Woollard, D. C.: Vitamin K in Milk and Infant Formulas: Determination of Phylloquinone and Menaquinone-4. Analyst 122, 1997, 465–469 (Витамин К в молоке и детских смесях. Определение содержания филлохинона и менахинона-4)

[2] Indyk, H.E., Littlejohn, V.C., Lawrence, J.L., and Woollard, D.C.: Liquid Chromatographic Determination of Vitamin K_1 in Infant Formulas and Milk. J. AOAC intern. 78, 1995, 719–723. AOAC Official Methods of Analysis, 17th Ed, 2000, Method 999.15 — Determination of Vitamin K_1 by HPLC (Определение содержания витамина K_1 в детских смесях и молоке при помощи жидкостной хроматографии. Официальные методы анализа. Определение содержания витамина K_1 методом ВЭЖХ)

[3] Haroon, Y., Bacon, D.S., and Sadowski, J.A.: Chemical reduction system for the detection of phylloquinone (vitamin K_1) and menaquinones (vitamin K_2). J. Chromatogr. 384, 1987, 382–389 (Системы химической дериватизации для обнаружения филлохинона (витамина K_1) и менахинонов (витамина K_2))

[4] Indyk, H.E., and Woollard, D.C.: Vitamin K in Milk and Infant Formulas by Liquid Chromatography: Collaborative study. J. AOAC Intern. 83, 2000, 121–130 (Определение содержания витамина К в молоке и детских смесях методом жидкостной хроматографии: Совместное исследование)

[5] The Merck Index: Vitamin K_1. 12th Ed.: 7536, p. 1269 (1996) (Каталог Мерк. Витамин K_1)

[6] Ball, G. F. M, in G. F. M. Ball (Hrsg.): Fat-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis: A Comprehensive Review. Elsevier Applied Science, London, 1988, 258–273 (Образцы жирорастворимых витаминов в анализе пищевых продуктов. Комплексный анализ)

[7] Eitenmiller, R.R. and Landen, W.O.: Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 1999, 149–184 (Анализ витаминов для наук о здоровье и пище)

[8] European Pharmacopoeia 1997: 1997: 1036; Phytomenadione. 1332–1334 (Европейская фармакопея 1997. Фитоменадион)

[9] European Pharmacopoeia — Supplement 2000: 1999: 1036; Phytomenadione. 1060–1062 (Европейская фармакопея. Дополнение 2000. Фитоменадион)

[10] Woolard, D.C., Indyk, H. E., Bertram, Y.F., and Cook, K.K.: Determination of Vitamin K_1 Isomers in Food by liquid Chromatography with C 30 Bonded-Phase Column, J. AOAC Intern. 85, 2002, 682–691 (Определение изомеров витамина K_1 в пищевых продукта методом жидкостной хроматографии на колонке с С 30 химически связанной фазой)

УДК 641.1:577.161.5:543.544.5.068.7:006.35 МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: продукция пищевая, определение, витамин K_1, высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ

Редактор *К.В. Дудко*
Корректор *Г.В. Яковлева*
Компьютерная верстка *Ю.В. Поповой*

Сдано в набор 16.05.2016. Подписано в печать 22.08.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,10.

Набрано в ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Издано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995, Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru