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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32916— 2014

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Определение массовой доли витамина D методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 5 декабря 2014 г. № 46)

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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Агентство «Узстандарт»

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2014 г. № 1976-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32916—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2016 г.

5 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

© Стандартинформ, 2015

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 Термины и определения . . . 2
4 Сущность метода . . . 2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы . . . 2
6 Отбор проб . . . 3
7 Подготовка к проведению измерений . . . 3
8 Условия проведения измерений . . . 4
9 Проведение измерений . . . 5
10 Обработка результатов измерений . . . 5
11 Контроль точности результатов измерений . . . 5
12 Оформление результатов измерений . . . 6
13 Требования, обеспечивающие безопасность . . . 6
Приложение А (справочное) Пример хроматограммы определения массовой доли витамина D в молочном продукте . . . 7

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Определение массовой доли витамина D методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Milk and milk products. Determination of vitamin D mass fraction by high performance liquid chromatography method

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочную продукцию и устанавливает определение массовой доли витамина D методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ).

Диапазон измерений — от 0,01 до 1,0 млн$^{-1}$.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6—2003** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9805—84 Спирт изопропиловый. Технические условия

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

Издание официальное

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применен термин с соответствующим определением:

3.1 **содержание витамина D:** Массовая доля холекальциферола (витамина D_3), определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в миллионных долях ($млн^{-1}$).

4 Сущность метода

Сущность метода заключается в омылении пробы продукта водно-спиртовым раствором гидроокиси калия, экстракции витаминов D гексаном. Полученный экстракт исследуют с использованием аналитической обращенно-фазной (далее — ОФ) ВЭЖХ. Витамин D детектируют по поглощению в ультрафиолетовой области спектра, пики идентифицируют по их времени удерживания и спектру.

Количественный анализ проводят с помощью метода абсолютной градуировки.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

Хроматограф жидкостный для проведения ВЭЖХ, включающий следующие элементы:

- колонку для проведения анализа методом аналитической ОФ ВЭЖХ диаметром 0,40—0,46 см, длиной 25—30 см, заполненную октадецилсиликагелем, размером частиц 5 мкм;
- детектор спектрофотометрический или диодно-матричный с длиной волны детектирования 265 и 280 нм с точностью задания длины волны ±1 нм;
- устройство для ввода пробы;
- насос;
- регистрирующее устройство (самописец или интегратор), позволяющее проводить измерения площади (или высоты) пика с погрешностью ±1 %;
- программное обеспечение для статистической обработки полученных результатов измерений.

Вакуумная установка для твердофазной экстракции.

Картридж для твердофазной экстракции С18 500 мг/6 мл;

Спектрофотометр со спектральным диапазоном от 190 до 1100 нм, с основной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 или весы по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт, с пределом допускаемой абсолютной погрешности ±0,001 г.

Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

Термометр лабораторный жидкостный диапазоном измерения температур от 0 °С до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

Баня водяная термостатируемая.

Кюветы кварцевые длиной оптического пути 10 мм.

Фильтры мембранные с размером диаметра пор не более 0,5 мкм.

Микрошприц для ВЭЖХ вместимостью 0,100 $см^3$.

Колбы мерные 2-100-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 1(2,3)-1(2)-1-1(5,10,25) по ГОСТ 29227.

Пробирки мерные с притертыми пробками П-2-5-0,1; П-2-10-0,2; П-2-20-0,2 ХС по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1-25-2 по ГОСТ 1770.

Колбы К-1-100-29/32, К-1-250-29/32, К-1-500-29/32 ТС по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1-100, В-1-250 ТХС по ГОСТ 25336.

Воронки В-56-80 ХС по ГОСТ 25336.

Холодильник ХШ-1-300-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, х. ч., с содержанием основного вещества не менее 99,98 %.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363, х. ч., раствор молярной концентрации 5 моль/$дм^3$.

Кислота аскорбиновая, фармакопейная.

Спирт изопропиловый абсолютированный массовой долей основного вещества не менее 99,5 % по ГОСТ 9805.

Спирт этиловый абсолютированный массовой долей основного вещества не менее 99,9 % по нормативным и техническим документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

Спирт этиловый ректификованный массовой долей основного вещества не менее 96 % по ГОСТ 18300.

Холекальциферол (витамин D_3) массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерения, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов по качеству не хуже вышеуказанных.

6 Отбор проб

6.1 Отбор проб — по ГОСТ 26809.

6.2 В случае, если определение не может быть проведено сразу после отбора проб, то пробы хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С не более суток.

7 Подготовка к проведению измерений

7.1 Приготовление исходного раствора витамина D_3

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают (100 ± 1) мг витамина D_3, растворяют в небольшом количестве этилового ректификованного спирта. Объем раствора доводят этиловым ректификованным спиртом до метки.

Раствор хранят не более 1 мес при температуре (4 ± 2) °С в бутыли из темного стекла.

7.2 Приготовление рабочих растворов витамина D_3

7.2.1 1 $см^3$ исходного раствора витамина D_3, приготовленного по 7.1, переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в небольшом количестве этилового ректификованного спирта. Объем раствора доводят этиловым ректификованным спиртом до метки.

Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа. Массовая концентрация рабочего раствора составляет 10 мкг/$см^3$.

Измерение оптической плотности стандартного раствора витамина D_3 проводят в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм при 265 нм, используя в качестве раствора сравнения этиловый ректификованный спирт. Массовую концентрацию раствора витамина D_3 (C_{D_3}, мкг/$см^3$) рассчитывают, используя уравнение

$$C_{D_3} = A_{265} \cdot 10^6/100 \cdot 485, \quad (1)$$

где A_{265} — оптическая плотность рабочего раствора витамина D_3 при 265 нм;

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

100 — коэффициент пересчета на 1 $см^3$;

485 — оптическая плотность спиртового раствора витамина D_3 массовой концентрации 1 г в 100 $см^3$ (10 мг/мл) этилового спирта при 265 нм и толщине поглощающего слоя 10 мм.

7.2.2 Для построения градуировочного графика готовят не менее четырех рабочих растворов витамина D_3 в диапазоне концентраций 0,1—10,0 мкг/см^3.

Для этого 1,0 и 10,0 см^3 рабочего раствора витамина D_3 (7.2.1) помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и растворы доводят до метки этиловым абсолютированным спиртом. Массовая концентрация полученных растворов витамина D_3 составляет соответственно 0,1 и 1,0 мкг/см^3.

Также 0,5 и 1,0 см^3 исходного раствора витамина D_3 (7.1) помещают в мерные колбы вместимостью 100 см^3 и растворы доводят до метки этиловым абсолютированным спиртом. Массовая концентрация полученных растворов витамина D_3 составляет 5,0 и 10,0 мкг/см^3.

7.3 Подготовка проб

7.3.1 Для омыления анализируемой пробы, содержащей менее 30 % жира, 20 г исследуемого продукта, взвешенного с отсчетом показаний до 0,001 г, помещают в круглодонную колбу вместимостью 100—250 см^3, добавляют 25 см^3 раствора гидроокиси калия молярной концентрации 5 моль/дм^3, 1 г аскорбиновой кислоты (или другого антиокислителя) и 25 см^3 изопропилового спирта. Колбу соединяют с обратным холодильником и проводят омыление при температуре 70 °С—80 °С в течение 30 мин. По окончании указанного времени колбу охлаждают до комнатной температуры и отделяют верхний изопропиловый слой. Измеряют его объем (V), отбирают от него 10 см^3 (V_2) и разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:1 (V/V).

В отобранном объеме раствора концентрируют витамин D, используя картридж для твердофазной экстракции (ТФЭ) и вакуумную установку для проведения ТФЭ. Картридж устанавливают в вакуумную камеру для ТФЭ и проводят предварительную его промывку раствором изопропилового спирта массовой долей 50 %. Затем через картридж пропускают полученный разбавленный раствор. После чего картридж осушают в потоке воздуха и проводят элюирование витамина D изопропиловым спиртом объемом 2 см^3. Измеряют объем полученного элюата (V_1) и используют его для дальнейшего анализа методом ОФ ВЭЖХ.

7.3.2 Для омыления анализируемой пробы, содержащей более 30 % жира, 10—15 г исследуемого образца, взвешенного с отсчетом показаний до 0,001 г, помещают в круглодонную колбу вместимостью 250—500 см^3 и далее, как описано в 7.3.1.

7.4 Подготовка хроматографа

7.4.1 Установку, включение и подготовку хроматографа к работе выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации прибора. Перед началом работы колонки промывают ацетонитрилом.

Хроматографические условия оптимизируют для оптимального разделения пика витамина D от пиков токоферолов и других соединений.

Раствор витамина D_3 массовой концентрацией 1 мкг/см^3 (7.2.2) несколько раз вводят в хроматограф для аналитической ОФ ВЭЖХ и проверяют повторяемость полного выделения пика витамина D_3.

7.4.2 Условия хроматографирования:

- температура колонки — (23 ± 2) °С;
- скорость подачи подвижной фазы — 0,7—1,0 см^3/мин;
- объем вводимой пробы для аналитической ОФ ВЭЖХ — 20 мкл;
- подвижная фаза для аналитической ОФ ВЭЖХ — ацетонитрил.

7.5 Построение градуировочной зависимости

Процедуры построения градуировочной зависимости выполняются в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования и руководством по программному обеспечению.

Проводят хроматографический анализ не менее четырех рабочих растворов витамина D_3, приготовленных по 7.2.2.

Градуировку проводят не реже одного раза в месяц, а также при изменении условий хроматографического анализа, при смене колонки, при замене реактивов, при несоответствии результатов метрологическим требованиям.

8 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории следует соблюдать следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . (20 ± 5) °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . (65 ± 15) %;
- атмосферное давление . . . . . (96 ± 10) кПа;
- частота переменного тока . . . . . (50 ± 5) Гц;
- напряжение в сети . . . . . (220 ± 10) В.

9 Проведение измерений

Проводят три последовательных измерения. В колонку хроматографа для проведения аналитической ВЭЖХ последовательно вводят равные объемы испытуемого раствора по 7.3 и одного из градуировочных растворов по 7.2.2. Условия хроматографирования указаны в 7.4.2.

Идентификацию пиков проводят, сопоставляя время удерживания, спектры в УФ-диапазоне длин волн или соотношения интенсивности сигнала детектора при различных длинах волн для соответствующих пиков стандартов и определяемых соединений.

10 Обработка результатов измерений

10.1 Среднеарифметическое значение массовой концентрации витамина D_3 C, мкг/см^3, рассчитывают по формуле

$$C = \frac{C_1}{C_2}, \quad (2)$$

где C_1, C_2 — результаты двух последовательных измерений массовой концентрации витамина D_3.

10.2 Массовую долю витамина D_3 в анализируемом образце X, млн$^{-1}$, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_1}{m \cdot V_2 \cdot K}, \quad (3)$$

где V — объем гидролизата, полученный после омыления анализируемой пробы, см^3;

V_1 — конечный объем полученного элюата, см^3;

m — масса продукта, взятая для анализа, г;

V_2 — объем гидролизата до разведения, равный 10 см^3;

K — коэффициент экстинкции, равный 0,8.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, округленное до второго десятичного знака, если выполняется условие приемлемости по разделу 11.

11 Контроль точности результатов измерений

11.1 Метрологические характеристики метода определения массовой доли витамина D

Приписанные характеристики погрешности и ее составляющих метода определения массовой доли витамина D при P = 0,95 приведены в таблице 1.

Таблица 1

Диапазон измерений массовой доли витамина D, млн$^{-1}$	Предел повторяемости $r_{отн}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	Границы относительной погрешности ± δ, %
От 0,01 до 0,5 включ.	25	35	25
Св. 0,5 до 1,0 включ.	20	28	20

11.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов определения массовой доли витамина D в исследуемых продуктах, полученных в условиях повторяемости (два параллельных определения, n = 2), проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6.

Результаты измерений считаются приемлемыми при условии

$$|X_1 - X_2| \le r_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср},$$

где X_1, X_2 — значения двух параллельных определений массовой доли витамина D в исследуемых продуктах, полученные в условиях повторяемости, млн$^{-1}$;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение двух параллельных измерений массовой доли витамина D, млн$^{-1}$;

$r_{отн}$ — предел повторяемости (сходимости), значение которого приведено в таблице 1, %.

Если данное условие не выполняется, то проводят повторные измерения и проверку приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6.

11.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений массовой доли витамина D, полученных в условиях воспроизводимости (в двух лабораториях, $m = 2$), проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6.

Результаты измерений, выполненные в условиях воспроизводимости, считаются приемлемыми при условии

$$|X'_1 - X'_2| \le R_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср},$$

где X'_1, X'_2 — результаты измерений массовой доли витамина D, полученные в двух лабораториях в условиях воспроизводимости, млн$^{-1}$;

$R_{отн}$ — пределы воспроизводимости, значения которых приведены в таблице 1, %;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений массовой доли витамина D, выполненных в условиях воспроизводимости, млн$^{-1}$.

Если данное условие не выполняется, то процедуры повторяют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

12 Оформление результатов измерений

Результат определения массовой доли витамина D в исследуемых продуктах представляют в документах, предусматривающих его использование, в виде:

$A = X_{ср} \pm \delta \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср}$, млн$^{-1}$, при $P = 0{,}95$,

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, млн$^{-1}$;

δ — границы относительной погрешности измерений, % (таблица 1).

13 Требования, обеспечивающие безопасность

13.1 При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005;
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с ГОСТ 12.4.009.

13.2 Требования к оператору

Выполнение измерений может проводить специалист, имеющий специальное образование, освоивший метод и уложившийся в норматив контроля точности при выполнении процедур контроля точности.

Приложение А
(справочное)

Пример хроматограммы определения массовой доли витамина D в молочном продукте

А.1 Пример хроматограммы определения массовой доли витамина D в молочном продукте приведен на рисунке А.1.

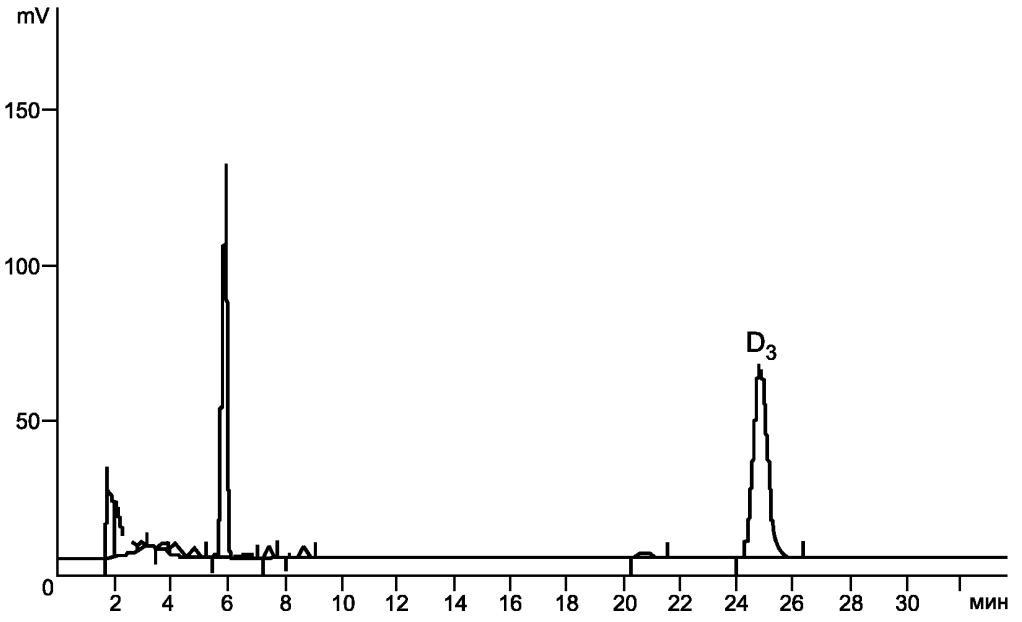


Рисунок А.1

УДК 637.146.001.4:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: массовая доля витамина D, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, проведение измерений, обработка результатов измерений, требования безопасности

Редактор *Н.А. Аргунова*
Технический редактор *Е.В. Беспрозванная*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 18.03.2015. Подписано в печать 01.04.2015. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,90. Тираж 50 экз. Зак. 1506.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru