МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
EN 12821—
2014**

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение содержания холекальциферола (витамина D_3) и эргокальциферола (витамина D_2) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 12821:2009, IDT)

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 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе аутентичного перевода на русский язык европейского регионального стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол 25 июня 2014 г. № 45-2014)

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
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 августа 2014 г. № 963-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 12821—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2016 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту EN 12821:2009 Foodstuffs – Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography – Measurement of cholecalciferol (D_3) or ergocalciferol (D_2) [Продукты пищевые. Определение витамина D высокоэффективной жидкостной хроматографией. Измерение холекальциферола (витамина D_3) или эргокальциферола (витамина D_2)]

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр европейского регионального стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеется в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

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

© 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

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

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение содержания холекальциферола (витамина D_3) и эргокальциферола (витамина D_2) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs. Determination of cholecalciferol (vitamin D_3) and ergocalciferol (vitamin D_2) content by high performance liquid chromatography

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина D_3 (холекальциферол) или D_2 (эргокальциферол) в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Витамин D_3 присутствует, главным образом, в продуктах питания животного происхождения, в то время как витамин D_2 – в дикорастущих грибах. Как витамин D_3, так и витамин D_2 могут присутствовать в витаминизированных пищевых продуктах. Настоящий стандарт не применим к пробам, содержащим одновременно как витамин D_3, так и витамин D_2.

Кроме исходных форм – витамина D_3 и витамина D_2, соответствующие метаболиты – 25-гидроксивитамин D и 1,25-дигидроксивитамин D, также обладают D-витаминной активностью. Настоящий стандарт распространяется на определение витамина D_2 или витамина D_3 по отдельности.

Настоящий стандарт составляет основу аналитических методов, на базе которой аналитик может разработать собственную методику в соответствии со стандартной процедурой.

Метод прошел валидацию при межлабораторных испытаниях с использованием как витаминизированных, так и невитаминизированных проб, таких как маргарин, молоко, жидкое детское питание, детское питание, растительное масло для жарения, рыбий жир в диапазоне от 0,4 до 14 мкг/100 г продукта. Подробная информация о валидации приведена в приложении D.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий стандарт:

EN ISO 3696 Water for analytical laboratory use – Specification and test methods (ISO 3696:1987) (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

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 Сущность метода

Метод основан на выделении витаминов D_3 и D_2 из пробы путем ее омыления и экстракции витаминов подходящим растворителем с последующей очисткой экстракта с помощью полупрепаративной нормально-фазовой высокоэффективной хроматографии (далее – ВЭЖХ) и количественным определением витаминов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

При определении витамина D_3 в качестве внутреннего стандарта используют витамин D_2. Если определению подлежит витамин D_2, то в качестве внутреннего стандарта используют витамин D_3.

Витамин D детектируют спектрофотометрическим методом в ультрафиолетовой области и

Издание официальное

идентифицируют пики по значениям времени удерживания и дополнительно по спектру поглощения в ультрафиолетовой области, если используется диодноматричный детектор. Количественный анализ проводят с применением внутреннего стандарта по результатам измерений значений высот или площадей пиков, см. [1] – [8].

4 Реактивы

4.1 Общие положения

Если не указано иное, то при анализе используют только реактивы гарантированной чистоты и воду, по крайней мере, степени чистоты 1 по EN ISO 3696.

4.2 Метанол.

4.3 Этанол абсолютный, объемная доля $\varphi(C_2H_5OH) = 100$ %.

4.4 Этанол, $\varphi(C_2H_5OH) = 96$ %.

4.5 Сульфат натрия, безводный.

4.6 Растворы гидроксида калия для омыления – водный раствор массовой концентрации ρ (КОН) = 50 г/100 см^3 или 60 г/100 см^3 или водно-этанольный раствор ρ (КОН) = 28 г/100 см^3 при объемном соотношении этанола и воды 9:1.

4.7 Антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота (АК), аскорбат натрия, пирогаллол, сульфид натрия (Na_2S) или бутилокситолуол (ВНТ).

4.8 Растворители и экстрагенты, например диэтиловый эфир (не содержащий перекисей), дихлорметан, петролейный эфир, н-гексан, этилацетат или подходящая их смесь.

4.9 Подвижные фазы для ВЭЖХ

4.9.1 Варианты подвижных фаз, пригодных для нормально-фазовой полупрепаративной ВЭЖХ

Примерами подходящих подвижных фаз (состав в объемных долях) для полупрепаративной ВЭЖХ являются смеси:

- н-гексана и пропанола-2 (98+2), (99+1) или (95+5);
- н-гексана и изоамилового спирта (99+1);
- н-гексана, пропанола-2 и тетрагидрофурана (98+1+1);
- изооктана и изобутанола (99+1);
- н-гептана и пропанола-2 (97+3).

4.9.2 Варианты подвижных фаз, пригодных для обращенно-фазовой аналитической ВЭЖХ

Примерами подходящих подвижных фаз (состав в объемных долях) для обращенно-фазовой аналитической ВЭЖХ являются:

- метанол;
- смеси метанола и воды (95+5) или (93+7);
- смеси ацетонитрила и метанола (80+20), (90+10) или (70+30);
- смесь ацетонитрила, хлороформа и метанола (93+4+3).

4.10 Образцы сравнения

4.10.1 Образец сравнения эргокальциферола (витамин D_2), $M(C_{28}H_{44}O) = 396,7$ г/моль

В качестве образца сравнения витамина D_2 следует использовать препарат максимально доступной степени чистоты с массовой долей основного вещества более 98 %. Образец сравнения хранят в соответствии с инструкциями поставщика (при отсутствии света, обычно при температуре ниже 4°С).

4.10.2 Образец сравнения холикальциферола (витамин D_3), $M(C_{27}H_{44}O) = 384,6$ г/моль

В качестве образца сравнения витамина D_3 следует использовать препарат максимально доступной степени чистоты с массовой долей основного вещества более 98 %. Образец сравнения хранят в соответствии с инструкциями поставщика (при отсутствии света, обычно при температуре ниже 4°С).

4.11 Основные растворы

4.11.1 Основной раствор витамина D_2

Взвешивают около 100 мг витамина D_2 с точностью до 1 мг в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в этаноле (4.4) и доводят до метки этанолом. Массовая концентрация витамина D_2 в приготовленном растворе приблизительно равна 1 мг/см^3. Хранят при температуре ниже 4°С, защищая от света.

Рассчитывают массовую концентрацию основного раствора и массовую долю витамина D_2 в образце сравнения, используя способ, описанный в 4.12.1.

Срок хранения приготовленного раствора – 6 мес при температуре минус 18°С.

4.11.2 Основной раствор витамина D_3

Взвешивают около 100 мг витамина D_3 с точностью до 1 мг в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в этаноле (4.4) и доводят до метки этанолом. Массовая концентрация витамина D_3 в приготовленном растворе приблизительно равна 1 мг/см^3. Хранят при температуре ниже 4 °С, защищая от света.

Рассчитывают массовую концентрацию основного раствора и массовую долю витамина D_3 в образце сравнения, используя способ, описанный в 4.12.2.

Срок хранения приготовленного раствора – 6 мес при температуре минус 18 °С.

4.12 Стандартные растворы

4.12.1 Стандартный раствор витамина D_2

1 см^3 основного раствора витамина D_2 (4.11.1) переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки этанолом (4.4). Массовая концентрация витамина D_2 в приготовленном растворе приблизительно равна 10 мкг/см^3. Раствор готовят в день использования.

Примечание – Допускается использование раствора с иным значением массовой концентрации для соответствия требованиям аналитической процедуры.

Измеряют оптическую плотность стандартного раствора витамина D_2 в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при длине волны 265 нм относительно этанола. Рассчитывают массовую концентрацию витамина D_2 ρ_{D_2}, мкг/см^3, по формуле:

$$\rho_{D_2} = \frac{A_{265} \cdot M_{D_2} \cdot 1000}{\varepsilon \cdot b}, \quad (1)$$

где A_{265} – оптическая плотность стандартного раствора витамина D_2 при 265 нм;

M_{D_2} – молярная масса витамина D_2 (M_{D_2} = 396,7 г/моль);

ε – молярный коэффициент поглощения витамина D_2 (ε = 18843 м^2/моль, вычислено из значения $E^{1\%}_{1\text{ см}}$, см. [9]);

b – длина оптического пути кварцевой кюветы, см.

4.12.2 Стандартный раствор витамина D_3

1 см^3 основного раствора витамина D_3 (4.11.2) переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки этанолом (4.4). Массовая концентрация витамина D_3 в приготовленном растворе приблизительно равна 10 мкг/см^3. Раствор готовят в день использования.

Примечание – Допускается использование раствора с иным значением массовой концентрации для соответствия требованиям аналитической процедуры.

Измеряют оптическую плотность стандартного раствора витамина D_3 в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при длине волны 265 нм относительно этанола. Рассчитывают массовую концентрацию витамина D_3 ρ_{D_3}, мкг/см^3 по формуле:

$$\rho_{D_3} = \frac{A_{265} \cdot M_{D_3} \cdot 1000}{\varepsilon \cdot b}, \quad (2)$$

где A_{265} – оптическая плотность стандартного раствора витамина D_3 при 265 нм;

M_{D_3} – молярная масса витамина D_3 (M_{D_3} = 384,6 г/моль);

ε – молярный коэффициент поглощения витамина D_3 (ε = 18461 м^2/моль, вычислено из значения $E^{1\%}_{1\ см}$, см. [9]);

b – длина оптического пути кварцевой кюветы, см.

4.13 Растворы внутренних стандартов

4.13.1 Раствор внутреннего стандарта витамина D_2

10 см^3 стандартного раствора витамина D_2 (4.12.1) переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки этанолом (4.4). Массовая концентрация витамина D_2 в приготовленном растворе приблизительно равна 10 мкг/см^3. Раствор готовят в день использования.

4.13.2 Раствор внутреннего стандарта витамина D_3

10 см^3 стандартного раствора витамина D_3 (4.12.2) переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки этанолом (4.4). Массовая концентрация витамина D_3 в приготовленном растворе приблизительно равна 10 мкг/см^3. Раствор готовят в день использования.

Примечание – Если определению подлежит витамин D_3, то витамин D_2 используется в качестве внутреннего стандарта. Если определению подлежит витамин D_2, то в качестве внутреннего стандарта используется витамин D_3.

4.14 Стандартный раствор смеси витаминов D_2 и D_3 для полупрепаративной хроматографии

5 см^3 стандартного раствора витамина D_2 (4.12.1) и 5 см^3 стандартного раствора витамина D_3 (4.12.2) переносят пипетками в колбу ротационного испарителя и осторожно удаляют растворитель при температуре не выше 40 °С. Остаток растворяют в 100 см^3 подвижной фазы для полупрепаративной ВЭЖХ (4.9.1).

Допускается использование стандартного раствора с иным значением массовой концентрации для соответствия используемой системе для ВЭЖХ (5.4 или 5.5).

4.15 Стандартный раствор смеси витаминов D_2 и D_3 для аналитической хроматографии

5 см^3 стандартного раствора витамина D_2 (4.12.1) и 5 см^3 стандартного раствора витамина D_3 (4.12.2) переносят пипетками в колбу ротационного испарителя и осторожно удаляют растворитель при температуре не выше 40° С). Остаток растворяют в 100 см^3 подвижной фазы для аналитической ВЭЖХ (4.9.2).

5 Аппаратура

5.1 Общие положения

При проведении испытания используют общеупотребительное лабораторное оборудование, в частности, следующее.

5.2 Спектрофотометр, пригодный для измерений оптической плотности при длине волны 265 нм.

5.3 Ротационный испаритель, в комплекте с водяной баней и устройством для создания вакуума.

Примечание – Для сброса вакуума рекомендуется использовать азот.

5.4 Система для полупрепаративной ВЭЖХ, состоящая из насоса, устройства для ввода проб, УФ-детектора, устройства для сбора заданной фракции элюента и самописца или интегратора.

5.5 Система для аналитической ВЭЖХ, состоящая из насоса, устройства для ввода проб, УФ-детектора, самописца или интегратора, либо аналогичной системы для сбора данных.

5.6 Колонки для ВЭЖХ

5.6.1 Колонка полупрепаративная длиной от 250 до 300 мм, внутренним диаметром от 4,0 до

8,0 мм, заполненная сорбентом для нормально-фазовой хроматографии, например силикагелем или силикагелем с привитыми циано- и аминогруппами с размером частиц 5 мкм. Дополнительная информация приведена в приложении А.

5.6.2 Колонка аналитическая длиной 250 мм, диаметром от 4,0 до 4,6 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, например с привитыми октадецильными (C_{18}) группами, размером частиц 5 мкм. Дополнительная информация приведена в приложении А.

5.6.3 Альтернативные аналитические колонки

Колонки других размеров, заполненных сорбентом с иным размером частиц, могут также быть использованы в соответствии с настоящим стандартом, если установлено, что они обеспечивают удовлетворительное отделение витамина D от мешающих компонентов матрицы.

5.7 Устройство для фильтрования, пригодное для установки фильтров как большого, так и малого размера для фильтрования подвижной фазы и растворов проб, например с диаметром пор 0,45 мкм.

Примечание – Как правило, фильтрование подвижной фазы и растворов проб через мембранный фильтр перед применением или инжектированием продлевает срок службы колонок.

6 Проведение испытаний

6.1 Общие положения

Витамины D_2 и D_3 неустойчивы к воздействию ультрафиолетового излучения и окислителей (например, атмосферного кислорода), поэтому при работе с ними необходимо исключить ультрафиолетовое излучение путем применения посуды из темного стекла, алюминиевой фольги или материалов, поглощающих ультрафиолетовое излучение. Растворы, содержащие экстрагированный витамин, следует продувать азотом и необходимо добавлять в них антиоксиданты. Растворители следует выпаривать при пониженном давлении на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С.

6.2 Подготовка пробы для испытаний

Испытуемую пробу гомогенизируют. Грубые материалы размалывают в подходящей мельнице и тщательно перемешивают. Следует принять меры, такие как предварительное охлаждение пробы, для устранения влияния повышения температуры при этой процедуре. К анализу подготовленной для испытаний пробы приступают без промедления и защищают ее от воздействия света.

6.3 Приготовление раствора пробы

6.3.1 Омыление

Подготовленную для испытаний пробу массой от 10 до 30 г омыляют в колбе с обратным холодильником, предпочтительно в атмосфере азота, добавляя при этом необходимое количество этанола (4.4), воды, антиоксиданта (4.7), такого как аскорбиновая кислота (АК), гидрохинон, пирогаллол или ВНТ, и одного из растворов гидроксида калия (4.6). Можно также добавить сульфид натрия (4.7) для снижения каталитического эффекта следов металлов.

При определении витамина D_3 в колбу для омыления добавляют подходящий объем раствора внутреннего стандарта витамина D_2 (4.13.1). Количество добавляемого витамина D_2 должно соответствовать ожидаемому содержанию витамина D_3 в пробе. Если определению подлежит витамин D_2, то добавляют подходящий объем раствора внутреннего стандарта витамина D_3 (4.13.2).

Проводят также испытание пробы без добавления внутреннего стандарта для проверки отсутствия помех со стороны компонентов матрицы, время удерживания пиков которых близко к времени удерживания пика внутреннего стандарта.

В таблице 1 приведены примеры подходящих количеств реактивов.

Таблица 1 – Примеры количеств добавляемых реагентов

Масса пробы для испытаний, г	Объем этанола, $см^3$	Масса пирогаллола, г	Масса аскорбиновая кислоты (аскорбата натрия), г	Гидроксид калия
От 10 до 30	100	От 0,5 до 1,0	От 1,0 до 2,5	50 $см^3$ раствора концентрации 50 г/100 $см^3$

Обычно время омыления составляет от 20 до 45 мин при температуре от 70 °С до 100 °С. Омы-

ление можно также провести при комнатной температуре в течение ночи (примерно 16 ч) при остальных аналогичных условиях.

Если по окончании омыления на поверхности охлажденной реакционной смеси присутствует жир или масло, то омыление продолжают после добавления дополнительного количества водно-этанольного раствора гидроксида калия.

Примечание – Условия, пригодные для омыления маргарина и сухого молока, приведены в приложении В.

6.3.2 Экстракция

Для предотвращения образования эмульсии при последующей экстракции раствор пробы после омыления разбавляют водой до достижения объемного соотношения этанола и воды 1:1.

Экстрагируют витамины D_2 и D_3 из омыленной охлажденной пробы подходящим растворителем или смесью растворителей (4.8). Процедуру экстракции проводят от двух до четырех раз, используя порции экстрагента объемом от 100 до 200 $см^3$. Объединенные экстракты промывают водой до нейтральной реакции (как правило, пять раз объемами от 50 до 100 $см^3$).

Примечание – В некоторых методах предусмотрена промывка экстракта до нейтральной реакции среды раствором гидроксида калия массовой доли от 3 % до 5 % в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия, буферированном раствором ацетата натрия (pH = 7) молярной концентрации 2,6 моль/$дм^3$ или аналогичными смесями. Условия, пригодные для омыления маргарина и сухого молока, приведены в приложении В.

6.3.3 Концентрирование экстракта

Экстракт упаривают при пониженном давлении и температуре не выше 40 °С в ротационном испарителе (5.3). Рекомендуется добавление антиоксиданта в экстракт пробы перед упариванием, например 2 $см^3$ раствора ВНТ в н-гексане массовой концентрации 1 мг/$см^3$.

Предварительно остающиеся следы воды удаляют путем осушения безводным сульфатом натрия (4.5) или азеотропной перегонкой с абсолютным этанолом (4.3).

На данной стадии анализа для устранения возможных мешающих влияний матрицы пробы допускается использовать дополнительную очистку экстракта. В этом случае должна быть проведена полная валидация аналитической процедуры.

Примечание – В приложении Е дано краткое описание трех различных способов дополнительной очистки. Всегда имеет смысл объединить дополнительную очистку с использованием колоночной хроматографии (Е.2) и твердофазной экстракции (Е.3); она оказывается полезной для продуктов питания, например маргарина и растительного масла. Очистка с применением тонкослойной препаративной хроматографии (Е.1) предпочтительнее в случае кормов и добавок, типа таблеток и капсул. Для добавок ее при необходимости можно объединить с твердофазной экстракцией (Е.3).

6.3.4 Приготовление раствора пробы для полупрепаративной хроматографии

Остаток растворяют в небольшом известном объеме растворителя, совместимого с подвижной фазой для полупрепаративной ВЭЖХ. Для удаления следов воды в полученный раствор добавляют небольшое количество безводного сульфата натрия

6.4 Градуировка хроматографических систем

Градуировку полупропрепаративной (5.6.1) и аналитической (5.6.2) систем и оценку пригодности условий хроматографического разделения и анализа (см. 6.5) проводят с помощью стандартных растворов витаминов D_2 (4.12.1) и D_3 (4.12.2).

6.5 Оценка пригодности условий хроматографического разделения и анализа

Подбор условий элюирования в полупрепаративной ВЭЖХ-системе (5.6.1) проводят путем анализа в этой системе стандартного раствора смеси витаминов D_2 и D_3 для полупрепаративной хроматографии (4.14), добиваясь при этом элюирования витамина D одним пиком со стабильным временем удерживания при повторных вводах. Соблюдение этого условия необходимо для обеспечения возможности точного отбора фракции элюата, содержащей витамин D, при очистке экстракта пробы.

Условия для полупрепаративной ВЭЖХ должны быть подобраны таким образом, чтобы достигалось оптимальное отделение витамина D от токоферолов и других мешающих компонентов матрицы пробы. Примеры хроматограмм см. в приложении С.

Подбор условий хроматографического разделения в аналитической ВЭЖХ-системе проводят путем анализа в этой системе стандартного раствора смеси витаминов D_2 и D_3 для аналитической

хроматографии (4.15), добиваясь при этом 98 %-ного разделения пиков витаминов D_2 и D_3 (т.е. коэффициент разрешения пиков должен быть более 1,0), а также отделение их пиков от всех мешающих компонентов матрицы пробы.

6.6 Анализ пробы

6.6.1 Полупрепаративная ВЭЖХ

Инжектируют аликвотную часть сконцентрированного экстракта пробы в полупрепаративную ВЭЖХ-систему (5.6.1) и собирают фракцию, содержащую витамин D. Временное окно сбора фракции должно быть предварительно установлено с использованием смешанного стандартного раствора смеси витаминов D_2 и D_3 для полупрепаративной хроматографии D (6.5). Окно должно быть достаточно широким для полного сбора витамина D, но в то же время достаточно узким для исключения попадания токоферолов или других мешающих соединений.

Типичная полупрепаративная хроматограмма приведена в приложении С.

6.6.2 Аналитическая ВЭЖХ

Упаривают отобранную методом полупрепаративной хроматографии фракцию досуха и остаток растворяют в растворителе, совместимом с подвижной фазой для аналитической хроматографии.

Инжектируют аликвоту полученного раствора в аналитическую ВЭЖХ-систему и идентифицируют пики витаминов D_2 и D_3 (6.6.3). Необходимо, чтобы было достигнуто отделение пиков витаминов D_2 и D_3 от пиков мешающих матричных компонентов

Типичная аналитическая хроматограмма приведена в приложении С.

6.6.3 Идентификация

Пики витаминов D_2 и D_3 на хроматограмме раствора пробы идентифицируют по совпадению значений времени удерживания со значениями времени удерживания пиков витаминов D_2 и D_3 на хроматограммах стандартных растворов при одинаковых хроматографических условиях (6.5). Использование диодноматричного детектора позволяет детально рассмотреть спектр пика витамина D в ультрафиолетовой области и оценить чистоту пика. Повторная регистрация хроматограммы пробы с использованием различных длин волн детектирования может быть также использована для оценки чистоты пика и подтверждения его идентификации.

6.6.4 Число определений

Следует провести по меньшей мере два независимых определения.

6.7 Расчет градуировочного коэффициента по методу внутреннего стандарта

Рассчитывают градуировочный коэффициент (R_f) для витамина D_3 при применении в качестве внутреннего стандарта витамина D_2 по формуле (3), используя стандартные растворы известной концентрации (4.13):

$$\mathrm{R_f} = \frac{A_{\mathrm{STD_3}} \cdot \rho_{\mathrm{STD_2}}}{A_{\mathrm{STD_2}} \cdot \rho_{\mathrm{STD_3}}} \qquad (3)$$

где A_{STD_3} – площадь или высота пика витамина D_3 в стандартном растворе;

A_{STD_2} – площадь или высота пика витамина D_2 в стандартном растворе;

ρ_{STD_2} – массовая концентрация витамина D_2 в стандартном растворе, мкг/см^3;

ρ_{STD_3} – массовая концентрация витамина D_3 в стандартном растворе, мкг/см^3.

7 Обработка результатов

Массовую долю витамина D_3 w_{D_3}, мкг/100 г пробы, вычисляют по формуле:

$$\mathrm{W_{D_3}} = \frac{A_{\mathrm{SD_3}} \cdot I_s \cdot 100}{A_{\mathrm{SD_2}} \cdot R_f \cdot m}, \qquad (4)$$

где I_S – масса внутреннего стандарта витамина D_2 в испытуемой порции, мкг;

m – масса пробы, отобранной для омыления, г;

R_f – градуировочный коэффициент [см. формулу (3)];

A_{SD_3} – площадь или высота пика витамина D_3 в растворе пробы;

A_{SD_2} – площадь или высота пика витамина D_2 в растворе пробы.

8 Прецизионность

8.1 Общие положения

Данные по прецизионности различных ВЭЖХ методов определения витамина D_3 были установлены в 1994 году в ходе международных межлабораторных сравнительных испытаний, организованных в рамках Программы стандартных измерений и тестирования Европейской комиссии на образцах маргарина (сертифицированный стандартный образец CRM 122) и сухого молока (CRM 421). Испытания привели к получению статистических результатов, представленных в приложении D.

Данные по прецизионности для овсяной крупы и сухого молока были установлены при межлабораторных испытаниях в соответствии с методом, использующим расчеты на основе ИСО 5725:1986 (см. приложение D).

Данные по прецизионности для молока, жидкого детского питания, растительного масла для жарения, маргарина, детского питания и рыбьего жира были установлены в ходе межлабораторных испытаний в соответствии с Руководством АОАС по процедурам совместных исследований, проведенных с целью валидации характеристик метода анализа (см. приложение D).

Результаты, полученные при этих сравнительных испытаниях, могут быть не применимы к другим диапазонам содержаний аналита и иным матрицам по сравнению с приведенными в приложении D.

8.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя единичными результатами испытаний, полученными одним исполнителем на идентичном исследуемом материале на одном и том же оборудовании в течение возможно короткого промежутка времени, может превышать предел повторяемости r не чаще, чем в 5 % случаев. Значения приведены ниже:

маргарин	$\bar{x}$ = 12,3 мкг/100 г,	r = 2,32 мкг/100 г;
сухое молоко	$\bar{x}$ = 14,3 мг/100 г,	r = 2,09 мкг/100 г;
молоко	$\bar{x}$ = 0,418 мкг/100 г,	r = 0,054 мкг/100 г;
жидкое детское питание	$\bar{x}$ = 1,38 мкг/100 г,	r = 0,23 мкг/100 г;
растительное масло для жарения	$\bar{x}$ = 4,61 мкг/100 г,	r = 0,96 мкг/100 г;
маргарин	$\bar{x}$ = 8,39 мкг/100 г,	r = 1,52 мкг/100 г;
детское питание	$\bar{x}$ = 10,1 мкг/100 г,	r = 0,7 мкг/100 г;
рыбий жир	$\bar{x}$ = 11,6 мкг/100 г,	r = 0,7 мкг/100 г.

8.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя единичными результатами, полученными в двух лабораториях на идентичном исследуемом материале, может превышать предел воспроизводимости R не чаще чем в 5 % случаев. Значения приведены ниже:

маргарин	$\bar{x}$ = 12,3 мкг/100 г,	R = 2,66 мкг/100 г;
сухое молоко	$\bar{x}$ = 14,3 мг/100 г,	R = 2,21 мкг/100 г;
молоко	$\bar{x}$ = 0,418 мкг/100 г,	R =0,106 мкг/100 г;
жидкое детское питание	$\bar{x}$ = 1,38 мкг/100 г,	R = 0,47 мкг/100 г;
растительное масло для жарения	$\bar{x}$ = 4,61 мкг/100 г,	R = 3,11 мкг/100 г;
маргарин	$\bar{x}$ = 8,39 мкг/100 г,	R = 1,60 мкг/100 г;
детское питание	$\bar{x}$ = 10,1 мкг/100 г,	R = 2,0 мкг/100 г;
рыбий жир	$\bar{x}$ = 11,6 мкг/100 г,	R = 5,8 мкг/100 г.

9 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать, по меньшей мере, следующие сведения:

a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;

b) ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;

c) результаты испытаний с указанием единиц измерений, в которых выражен результат испытаний;

d) дату и способ отбора проб (если он известен);

e) дату поступления пробы;

f) дату проведения испытаний;

g) все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытаний;

h) любые применявшиеся операции, не оговоренные в методе или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытаний.

Приложение А
(справочное)

Примеры ВЭЖХ-систем и условий хроматографического анализа

Таблица А.1 – Примеры полупрепаративных ВЭЖХ-систем, использованных для очистки раствора пробы участниками сертификационных исследований для витамина D (EU MAT) [8]

Колонка	Размеры, мм	Подвижная фаза, объемное соотношение	Длина волны детектирования, нм
Polygosil® 60, 5 мкм	250 x 8	Изооктан + изобутанол (99 + 1)	265
LiChrospher® Si 60, 5 мкм	250 x 4	н-Гексан + пропанол-2 (99 + 1)	265
LiChrospher® Si 100, 5 мкм	250 x 8	н-Гексан + пропанол-2 (98 + 2)	265
μ-Porasil® silica	300 x 3,9	н-Гексан + тетрагидрофуран + пропанол-2 (98 + 1 + 1)	265
Partisil® PAC, 5 мкм	250 x 4,6	н-Гексан + изоамиловый спирт (99 + 1)	265
LiChrosorb® Si 60	250 x 4	н-Гексан + пропанол-2 + тетрагидрофуран (98 + 1 + 1)	265
LiChrosorb® Si 60	250 x 4	н-Гексан + пропанол-2 (95 + 5)	265
LiChrosorb® Si 60	250 x 4	н-Гексан + пропанол-2 (97 + 3)	265
Примечание – Все торговые названия приведены для удобства пользователя настоящего стандарта и не означают поддержки этих продуктов.			

Таблица А.2 – Примеры аналитических ВЭЖХ-систем, использованных для определения витамина D в растворах испытуемых проб участниками сертификационных исследований [8]

Колонка	Размеры, мм	Подвижная фаза, объемное соотношение	Длина волны детектирования, нм
Hypersil® ODS, 5 мкм	250 x 4,6	Метанол	265
LiChrospher® 100 RP 18, 5 мкм	250 x 4	Метанол + вода (95 + 5)	264
Vydac® 201 TP 54	250 x 4,6	Метанол + вода (93 + 7)	265
Vydac® 201 TP 54	250 x 4,6	Ацетонитрил – метанол (80 + 20)	265
Spherisorb® ODS 2, 5 мкм	250 x 4,6	Ацетонитрил + дихлорметан + метанол (93 + 4 + 3)	Диодная матрица
Nucleosil® C_{18}, 5 мкм	250 x 4	Ацетонитрил – метанол (70 + 30)	265
Zorbax® ODS	250 x 4,6	Ацетонитрил – метанол (95 + 5)	265
Примечание – Все торговые названия приведены для удобства пользователя настоящего стандарта и не означают поддержки этих продуктов.			

Приложение В
(справочное)

Примеры условий экстракции и омыления

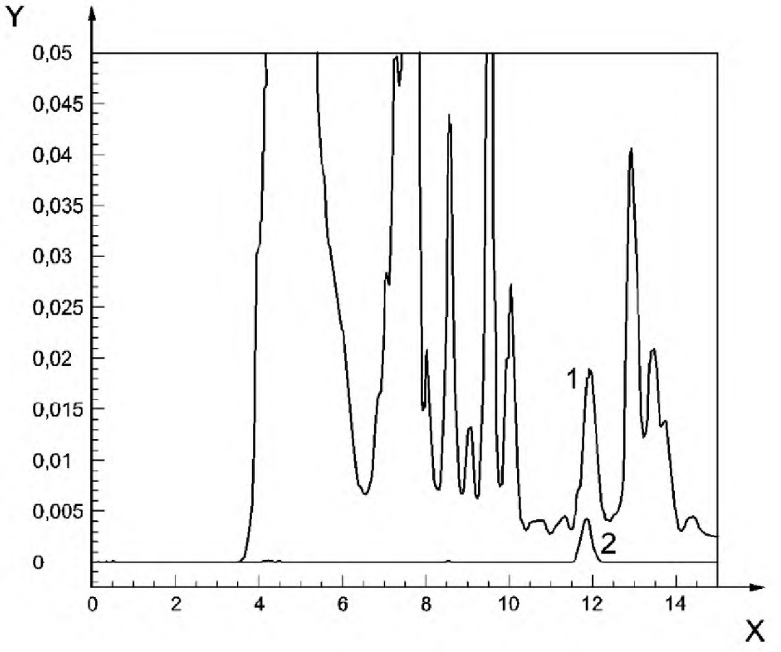
В таблице В.1 приведены примеры условий экстракции и омыления, использованные при определении витамина D участниками сертификационных исследований EU MAT [8]. Масса проб условно представлена как масса жира (содержание жира в маргарине 82 %, в сухом молоке – 27 %).

Таблица В.1

Омыление	Экстракция
16 г жира + 150 см^3 этанола + 1 г пирогаллола + (75 см^3 воды + 30 г КОН[a)]) + продувка азотом; 70 °С, 30 мин	PE [b)] + DEE [c)] (9:1) 2 х 100 см^3; промывание водой 5 х 100 см^3
8 г жира + 100 см^3 этанола + 1 г аскорбата натрия + 0,04 г сульфида натрия + 12 г КОН + 50 см^3 воды + продувка азотом; 80 °С, 30 мин	н-гексан 3 х 100 см^3 и 3 х 50 см^3; промывание водой 4 х 100 см^3
8 г жира + 35 см^3 этанола + 2 г аскорбата натрия + 10 г КОН + 50 см^3 воды; 100 °С, 45 мин	н-гексан 1 х 100 см^3; промывание 5 % КОН 1 х 100 см^3, промывание 30 % этанола в 9 %-ном растворе хлорида натрия 1 х 100 см^3; промывание 0,9 %-ным раствором хлорида натрия 1 х 100 см^3
12 г жира + 30 см^3 этанола + 30 см^3 метанола + 0,1 г аскорбиновой кислоты + 30 см^3 50 % КОН + продувка азотом; 100 °С, 30 мин	DEE 2 х 100 см^3; промывание водой 4 х 50 см^3
6 г жира + 100 см^3 этанола + 1 г аскорбиновой кислоты + 50 см^3 50 % КОН + продувка азотом; 20 °С, 20 ч	PE + DEE (1:1) 2 х 200 см^3; промывание водой 6 х 50 см^3
8 г жира + 1 г пирогаллола + 150 см^3 28 % КОН в смеси этанола и воды (9:1)+ продувка азотом; кипячение с обратным холодильником 100 °С, 30 мин	DEE + PE (1:1) 2 х 500 см^3; промывание водой 5 х 150 см^3
24 г жира + 90 см^3 этанола + 0,5 г аскорбата натрия + 30 см^3 60 % КОН + продувка азотом; 100 °С, 45 мин, обратный холодильник	DEE 1 х 150 см^3, 3 х 75 см^3; промывание водой 5 х 200 см^3
[a)] КОН - гидроксид калия [b)] PE - петролейный эфир [c)] DEE - диэтиловый эфир	

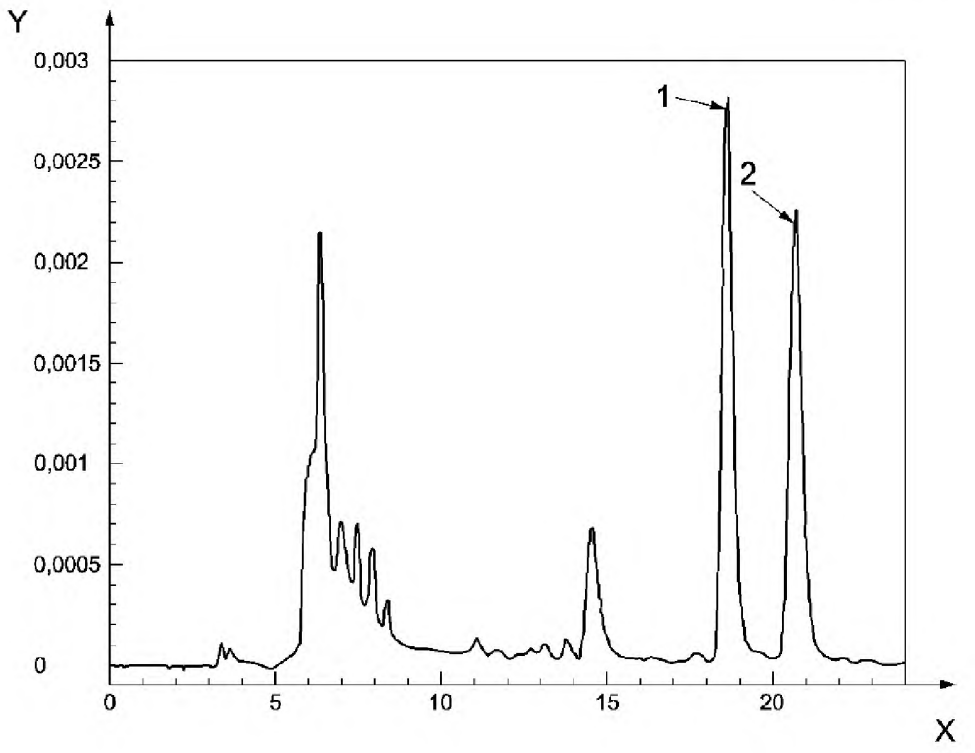
Приложение С
(справочное)

Примеры полупрепаративных и аналитических хроматограмм



X – время;
Y – сигнал (условные единицы);
1 – витамин D в сухом молоке;
2 – витамин D в стандарте

Рисунок С.1 – Типичная хроматограмма для нормально-фазовой полупрепаративной ВЭЖХ омыленного и обработанного методом жидкостно-жидкостной экстракции сухого молока (CRM 421) и стандарта витамина D (витамин D_2 и D_3)



X – время;
Y – сигнал (условные единицы);
1 – витамин D_2;
2 – витамин D_3

Рисунок С.2 – Типичная обращенно-фазовая хроматограмма фракции экстракта сухого молока (CRM 421), выделенная на стадии полупрепаративной хроматографии между 11,5 и 12,5 мин (см. рисунок С.1)

Приложение D
(справочное)

Данные по прецизионности

Значения, приведенные в таблице D.1 для маргарина (CRM 122) и сухого молока (CRM 421), были получены при межлабораторных испытаниях [8] в соответствии с Руководством EU MAT по сертификационным испытаниям. Испытания были организованы в Соединенном Королевстве Великобритании и Северной Ирландии (Laboratory of Government Chemist).

Значения, приведенные в таблице D.2 для молока, жидкого детского питания, растительного масла для жарения, маргарина, детского питания и рыбьего жира, были получены при межлабораторных испытаниях в соответствии с Руководством AOAC по процедурам совместных исследований, проведенных с целью валидации метода анализа [13]. Испытания были организованы Комитетом северных стран по пищевому анализу [11]. Использованный метод включал омыление, экстракцию, концентрирование, препаративную и аналитическую ВЭЖХ.

Таблица D.1 – Данные по прецизионности для маргарина и сухого молока

Проба	1	2
Год проведения испытаний	1994	1994
Число лабораторий	11	11
Число образцов	5	5
Число лабораторий после исключения выбросов	11	11
Число исключенных лабораторий	0	0
Число принятых результатов	48	47
Общее среднее $\bar{x}$, мкг/100 г	12,30	14,30
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/100 г	0,82	0,74
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	6,7	5,2
Предел повторяемости r ($r = 2,8\ s_r$), мкг/100 г	2,32	2,09
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	0,94	0,78
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	7,6	5,5
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8\ s_R$), мкг/100 г	2,66	2,21
Индекс воспроизводимости Горвица R (Horrat R index)	0,3	0,3
1 Маргарин, витаминизированный витамином D_3 (CRM 122). 2 Сухое молоко, сублимированное из цельного молока, витаминизированного витамином D_3 (CRM 421).		

Таблица D.2 – Данные по прецизионности молока, жидкого детского питания, растительного масла для жарения, маргарина, детского питания и рыбьего жира

Образец	1	2	3	4	5	6
Год проведения испытаний	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Число лабораторий	8	8	8	8	8	8
Число образцов	2	2	2	2	2	2
Число лабораторий после исключения выбросов	7	8	8	7	7	8
Число исключенных лабораторий	1	0	0	1	1	0
Число принятых результатов	14	16	16	14	14	16
Общее среднее $\bar{x}$, мкг/100 г	0,418	1,38	4,61	8,39	10,1	11,6
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/100 г	0,019	0,08	0,34	0,54	0,2	0,3
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	4,6	5,9	7,4	6,5	2,4	2,2
Предел повторяемости r ($r = 2,8\ s_r$), мкг/100 г	0,054	0,23	0,96	1,52	0,7	0,7
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	0,038	0,17	1,11	0,57	0,7	2,1
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	9,1	12,1	24,1	6,8	7,1	17,7
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8\ s_R$), мкг/100 г	0,106	0,47	3,11	1,60	2,0	5,8
Полнота обнаружения, %	-	-	102	-	93,9	92,9

Окончание таблицы D.2

Образец	1	2	3	4	5	6
Индекс воспроизводимости Горвица R [a] (Horrat R index)	0,4	0,6	1,1	0,3	0,3	0,8

1 Низколактозное ультрапастеризованное (UHT) молоко, невитаминизированное.
2 Готовое к употреблению жидкое детское питание (кашка), заявленное содержание витамина D_3 (этикетка) 1,3 мкг/100 г.
3 Растительное масло для жарения с добавкой витамина D_3 для сличительных испытаний.
4 Маргарин с добавкой витамина D_3 для сличительных испытаний.
5 Сухое детское питание с добавкой витамина D_3 для сличительных испытаний.
6 Рыбий жир с добавкой витамина D_3 для сличительных испытаний.
[a] Эти значения отличаются от значений, приведенных в [10], поскольку значение индекса Горвица установлено равным 22 % для средних значений, меньших 120 млрд$^{-1}$ согласно [12].

Приложение Е
(справочное)

Стадия дополнительной очистки экстракта при определении витамина D с использованием препаративной тонкослойной хроматографии, колоночной хроматографии и твердофазной экстракции

Е.1 Стадия дополнительной очистки экстракта при определении витамина D с использованием препаративной тонкослойной хроматографии

Е.1.1 Общие сведения

Схематически представленная процедура для тонкослойной хроматографии (далее – ТСХ) широко использовалась для очистки экстрактов витамина D до введения препаративной ВЭЖХ. Она была валидирована для кормов, таких как корм для поросят с содержанием 50 мкг/кг витамина D.

Ее преимущества:

- зона, содержащая витамин D, может быть может быть легко визуализирована ультрафиолетовым излучением. В зависимости от матрицы пробы ширина зоны, содержащей витамины D_2/D_3, снимаемой с пластины может быть различной по выбору аналитика. Тем самым влияние матрицы может быть минимизировано;
- при использовании многократного проявления пластин для ТСХ отделение зоны D_2/D_3 от зоны матричных компонентов может быть улучшено.

Недостатком этого способа является то, что он не может быть автоматизирован. Дополнительная информация дана в [11].

Е.1.2 Сущность процедуры

Аликвоту экстракта, полученного после омыления очищают с помощью препаративной ТСХ. Зону, содержащую витамины D_2/D_3, соскребают с пластины, переносят в небольшую колонку и экстрагируют витамины D_2/D_3. Объем этого экстракта уменьшают упариванием перед применением аналитической ВЭЖХ.

Е.1.3 Реактивы

Е.1.3.1 Пластины для ТСХ, например Silica gel 60 F 254, Merck 5715[1)], 0,25 мм, 20 х 20 см.

Е.1.3.2 Бутилгидрокситолуол (ВНТ).

Е.1.3.3 н-Гексан.

Е.1.3.4 Метанол.

Е.1.3.5 Ацетон.

Е.1.3.6 Диэтиловый эфир.

Е.1.3.7 Растворитель для проявления ТСХ-пластин: смесь 88 $см^3$ н-гексана, 2 $см^3$ метанола, 10 $см^3$ ацетона и 10 мг ВНТ.

Е.1.3.8 Растворитель для элюирования выделенной зоны витаминов D_2/D_3: смесь 60 $см^3$ диэтилового эфира и 40 $см^3$ н-гексана.

Е.1.3.9 Стандартный раствор витамина D_3, 250 мкг/$см^3$ в метаноле.

Е.1.4 Аппаратура

Е.1.4.1 Камера для ТСХ для пластин размером 20 х 20 см.

Е.1.4.2 Шприц вместимостью 1 $см^3$ стеклянный или подходящее устройство для нанесения пятен для ТСХ.

Е.1.4.3 Ультрафиолетовая лампа, 254 нм.

Е.1.4.4 Открытая цилиндрическая стеклянная колонка, диаметром 1 см, длиной приблизительно 15 см с краном из политетрафторэтилена.

Е.1.4.5 Небольшой шпатель с острыми краями.

Е.1.5 Порядок работы

Проявительную камеру для ТСХ заполняют растворителем (Е.1.3.7) и оставляют на 2 ч для насыщения.

Упаривают досуха при пониженном давлении подходящую аликвоту экстракта, полученного после омыления, и немедленно растворяют остаток в 2 $см^3$ н-гексана. 1 $см^3$ этого раствора наносят на пластину для ТСХ (Е.1.3.1) в виде большого числа порций таким образом, чтобы образовалась зона длиной 10 см и шириной не более 1 см. Для локализации и идентификации зоны, содержащей аналит, наносят от 5 до 10 мкл стандартного раствора витамина D_3 (Е.1.3.9) по обеим сторонам зоны.

Пластину проявляют два раза почти до самого верха. Для улучшения разделения может быть полезно многократное проявление пластины. Перед началом нового разделения пластину высушивают в токе азота. Визуализируют зону витаминов D_2/D_3 в ультрафиолетовом свете (Е.1.4.3) и отмечают ее карандашом (от 0,5 до 1,5 см). Соскабливают эту зону при помощи шпателя (Е.1.4.5) на лист бумаги и переносят в открытую цилиндрическую колонку (Е.1.4.4), предварительно заполненную 10 $см^3$ растворителя (Е.1.3.8). Элюируют витамин D_2/D_3 пятью порциями по 10 $см^3$ растворителя (Е.1.3.8). Упаривают объединенные элюаты досуха при пониженном давлении и немедленно растворяют в 1 $см^3$ растворителя для ВЭЖХ (раствор пробы).

Е.2 Стадия дополнительной очистки с использованием колоночной хроматографии

Е.2.1 Сущность процедуры

[1)] Silica gel 60 F 254, Merck 5715 является примером коммерчески доступных продуктов. Эта информация приведена для удобства пользователя настоящего стандарта и не является поддержкой указанных продуктов со стороны CEN.

Очистка проводится на колонке, заполненной целитом с нанесенным на него полиэтиленгликолем в качестве стационарной фазы. Недостатком этого способа является то, что он не может быть автоматизирован.

Е.2.2 Реактивы

Е.2.2.1 Петролейный эфир, кипящий в диапазоне от 40 °С до 60 °С, перегнанный.

Е.2.2.2 Петролейный эфир, кипящий в диапазоне от 60 °С до 70 °С, перегнанный.

Е.2.2.3 Диатомитовая земля, щелочная кальцинированная (CAS 68855-54-9).

Е.2.2.4 Сульфат натрия.

Е.2.2.5 Полиэтиленгликоль 600.

Е.2.3 Аппаратура

Е.2.3.1 Ротационный испаритель, с водяной баней при 40 °С.

Е.2.3.2 Взрывобезопасный высокоскоростной блендер.

Е.2.3.3 Хроматографические колонки, длиной 30 см, внутреннего диаметра 2,5 см, снабженные внизу краном с вставкой из полифторэтилена и длиной 10 см, внутреннего диаметра 1,4 см, сужающаяся книзу и имеющая наверху резервуар вместимостью 100 $см^3$.

Е.2.3.4 Ультрафиолетовая лампа, 254 нм.

Е.2.4 Порядок работы

Е.2.4.1 Подготовка колонки

В блендере создают суспензию 25 г диатомитовой земли (Е.2.2.3) и 200 $см^3$ петролейного эфира (Е.2.2.2). Во время перемешивания быстро добавляют 15 $см^3$ полиэтиленгликоля (Е.2.2.5) и продолжают перемешивание в течение 20 с.

Суспензия может быть создана альтернативным способом, обеспечивающим распределение полиэтленгликоля на поверхности носителя. В хроматографическую колонку (Е.2.3.3) вносят небольшую порцию петролейного эфира (Е.2.2.2), помешают на дно пробку из стекловаты, из которой удален воздух, и покрывают его слоем толщиной 1 см сульфата натрия. Переносят суспензию в колонку и уплотняют содержимое колонки при помощи поршня до получения слоя высотой 15 см. При этом из колонки вытекает избыток петролейного эфира. Сверху помещают слой безводного сульфата натрия толщиной 1 см.

Е.2.4.2 Ввод раствора пробы, элюирование и сбор элюата

Экстракт[1)] переносят из круглодонной колбы и ополаскивают колбу тремя порциями приблизительно по 3 $см^3$ петролейного эфира (Е.2.2.2), которые также переносят на колонку. Элюируют петролейным эфиром (Е.2.2.2). Отбрасывают первые 30 $см^3$ элюата. Собирают последующие 50 $см^3$ элюата или же до того момента, пока зона ретинола не достигнет нижней границы слоя сорбента. Это можно увидеть при помощи длинноволновой ультрафиолетовой лампы (Е.2.3.4). Элюат упаривают досуха в ротационном испарителе (Е.2.3.1) и добавляют от 2 до 3 $см^3$ петролейного эфира (Е.2.2.1 или Е.2.2.2). Затем продолжают очистку методом твердофазной экстракции (см. Е.3).

Е.3 Стадия дополнительной очистки с использованием твердофазной экстракции

Е.3.1 Сущность процедуры

Этот раздел описывает способ очистки с использованием твердофазной экстракции на силикагеле. Недостатком этого способа является то, что он не может быть автоматизирован.

Е.3.2 Реактивы

Е.3.2.1 н-Гептан, х.ч.

Е.3.2.2 Диэтиловый эфир. Перекиси удаляют каждый день перед использованием путем перегонки над твердым гидроксидом калия.

Е.3.2.3 Петролейный эфир, кипящий в диапазоне от 40 °С до 60 °С, перегнанный.

Е.3.3 Аппаратура

Е.3.3.1 Картриджи для твердофазной экстракции, содержащие приблизительно 700 мг силикагеля.

Е.3.3.2 Конические колбы вместимостью 50 $см^3$ с нормальным шлифом 29.

Е.3.4 Порядок работы

Упаривают элюат (см. Е.2.4.2) и растворяют остаток в 10 $см^3$ н-гептана (Е.3.2.1). Активируют картридж, пропуская через него 10 $см^3$ н-гептана. Вводят полученный раствор в картридж и дают ему пройти через него. Промывают картридж 10 $см^3$ 6 %-ного раствора диэтилового эфира (Е.3.2.2) в н-гептане и элюируют 20 $см^3$ 20 %-ного раствора диэтилового эфира (Е.3.2.2) в н-гептане. Собирают элюат в коническую колбу (Е.3.3.2), упаривают и растворяют в 1 - 2 $см^3$ петролейного эфира (Е.3.2.3). Продолжают очистку методом ТСХ или полупрепаративной ВЭЖХ.

[1)] Данная формулировка использована для обеспечения аутентичности перевода текста стандарта EN 12821:2009 на русский язык. При применении межгосударственного стандарта используют экстракт, полученный по 6.3.3.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование ссылочного европейского регионального стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
EN ISO 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний	–	*
* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного европейского регионального стандарта. Перевод данного европейского регионального стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.		

Библиография

[1] H. Johnsson, H. Hessel, K. Thorzell, Internat. J. Vitamin & Nutr. Res., 1987, 57, 357-365

[2] H. Johnsson, B. Halen, H. Hessel, A. Nyman, K. Thorzell, Internat. J. Vitamin & Nutr. Res., 1989, 59, 262-268

[3] S.L. Reynolds, H.J. Judd, The Analyst, 1984, 109, 489-492

[4] A. Bognar, Z. Lebensm. Unters. Forsch, 1992, 194, 469-475

[5] Van Den Berg, J. Agric, Fd. Chem., 1986, 34, 264-268

[6] P. Matilla, V. Piironen, C. Backman, A. Asunmaa, E. Uusi-Rauva, P. Koivistoinen, J. Food Comp. Anal., 1992, 5, 281-290

[7] I.D. Lumley, P.R. Lawrance, J. Micronutrient Anal., 1990, 7, 301-313

[8] P.M. Finglas, H. van den Berg, I. de Froidmont-Gortz, 1997. The certification of the mass fraction of vitamins in three reference materials: margarine (CRM 122), milk powder (CRM 421) and lyophilized Brussels sprouts (CRM 431). EUR-Report 18039, Commission of the European Union, Luxembourg

[9] The Pharmaceutical Codex, Incorporating the British Pharmaceutical Codex, 11th Edition, The Pharmaceutical Press, 1979

[10] A. Staffas, A. Nyman, J. AOAC Int., 2003, 86, 400-406

[11] Methode 13.8.1 (Method 13.8.1): Die Bestimmung von Vitamin D – HPLC Verfahren (The determination of Vitamin D – HPLC Method); in: Methodenbuch 3.4 Erganzungslieferung 1997. VDLUFA Verlag Deutschland

[12] M. Thompson, 2000, 125, 385-386

[13] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development, Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies p. 23-51

[14] ISO 5725:1986 Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: продукты пищевые, определение витамина D, холикальциферол, эргокальциферол, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, спектрофотометрическое детектирование, омыление витаминов, экстракция витаминов, очистка экстракта

Подписано в печать 16.03.2015. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 2,79. Тираж 31 экз. Зак. 526

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

gost.e-ecolog.ru