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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32043 — 2012

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов A, D, E

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (ОАО «ВНИИКП»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 004)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 54–П от 3 декабря 2012 г.)

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
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 306–ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32043–2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2014 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменений к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и правок 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, уведомления и тексты размещаются в информационной системе общего пользования — на информационном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет.

© Стандартинформ, 2014

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

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов A, D, E

Premixes.
Methods for determination of vitamin A, D, E

Дата введение — 2014–07–01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на премиксы с различными наполнителями и устанавливает хроматографические методы определения содержания витаминов А (ретинола ацетата), D (D_2 эргокальциферола и D_3 холикальциферола), Е (токоферола ацетата).

Метод с использованием обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии применим при содержании в премиксах витамина А в диапазоне от 40 до 6000 млн. МЕ/т, витамина Е – от 50 до 1000 г/т.

Метод с использованием нормально-фазной высокоэффективной хроматографии – при содержании в премиксе витамина А в диапазоне от 10 до 10000 млн. МЕ/т, витамина D_2 – от 40 до 10000 млн. МЕ/т, витамина Е – от 10 до 10000 г/т.

Примечание – МЕ - международная единица измерения количества вещества, основанная на биологической активности витаминов.

1 МЕ витамина А соответствует 0,344 мкг ретинола-ацетата, витамина D - 0,025 мкг холе- или эргокальциферола.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.2.007.0–75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80) Посуда мерная лаборатор-ная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4166–76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8677–76 Реактивы. Кальция оксид. Технические условия

ГОСТ 9412–93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 9805–84 Спирт изопропиловый. Технические условия

ГОСТ 13496.0–80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19627–74 Гидрохинон (парадиоксибензол). Технические условия

ГОСТ 24104–2001 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 24363–80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 29169–91 (ИСО 648–77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

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

Издание официальное

ГОСТ 31218–2003 (ИСО 6498:1998) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Подготовка испытуемых проб

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 «Национальный 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, применяют в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Отбор проб

Отбор проб – по ГОСТ 13496.0.

4 Подготовка проб для испытаний

Подготовка проб – по ГОСТ 31218.

5 Определение витаминов А (ретинола ацетата), Е (токоферола ацетата) методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии

5.1 Сущность метода заключается в экстракции витаминов А (ретинола ацетата), Е (токоферола ацетата) из премикса изопропиловым спиртом и последующем определении содержания витаминов обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией.

5.2 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

Хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром», укомплектованный спектрофотометрическим детектором, пригодным для измерения оптической плотности при длине волны от 190 до 360 нм, самописцем или интегратором, позволяющим измерять высоту и площадь пиков, и компьютером с установленным программным обеспечением для обработки результатов измерений.

Спектрофотометр со спектральным диапазоном работы от 186 до 1100 нм.

Колонка хроматографическая одного из указанных размеров: 2 × 64, 2 × 80, 2 × 120 мм, с числом теоретических тарелок не менее 4000, заполненная одним из следующих сорбентов: Силасорб С-18, Силасорб РНС-18, Сепарон С-18.

Насос водоструйный по ГОСТ 25336.

Баня водяная с терморегулятором.

Колбы конические со шлифом Кн-2-25(50)-14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-1-(1, 2)-1 по ГОСТ 29169.

Пипетки 1-1-1(2)-1(10) по ГОСТ 29227.

Цилиндры 1(2, 3, 4)-100(500) по ГОСТ 1770.

Колбы мерные 2-25(50)-1(2) по ГОСТ 1770.

Колба К-1-500-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Воронка с фильтром ВФО-40-ПОР 16 ХС по ГОСТ 25336.

Холодильники ХПТ-1-100-18 ХС, ХШ-1-400-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Окись кальция по ГОСТ 8677.

Стандартный образец витамина А (ретинола ацетата), содержащий не менее 1 млн. МЕ витамина А в 1 г.

Стандартный образец витамина Е (токоферола ацетата) с массовой долей не менее 99,0 %.

Спирт изопропиловый (пропанол-2) по ГОСТ 9805.

Спирт этиловый ректификованный технический объемной долей 96 % по ГОСТ 18300.

Спирт пропиловый (пропанол – 1).

Ацетонитрил.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

3 Допускается использование других материалов с характеристиками не ниже указанных.

5.3 Подготовка к проведению испытания

5.3.1 Приготовление элюента для хроматографии

Трехкомпонентный элюент готовят смешиванием ацетонитрила, пропилового спирта и дистиллированной воды в объемном соотношении 42 : 50 : 8. Для этого в склянку вместимостью 1000 см^3 вносят цилиндром 500 см^3 пропилового спирта, 420 см^3 ацетонитрила и 80 см^3 дистиллированной воды.

Приготовленную смесь растворителей фильтруют через стеклянный фильтр и помещают в стеклянную емкость с притертой пробкой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – не более 1 мес.

5.3.2 Подготовка хроматографической колонки

При использовании новой колонки или колонки после длительного перерыва в работе из нее следует удалить воздух и тщательно промыть элюентом до получения стабильной нулевой линии. Для этого через колонку пропускают элюент в количестве 20–30 свободных объемов колонки, т.е. два полных шприца насоса хроматографа при расходе элюента сначала 50 мм^3/мин, а затем 100 мм^3/мин. Промывку колонки заканчивают при получении стабильной нулевой линии.

После промывки колонки проводят ее насыщение витаминами А, Е. Для насыщения колонки в начале работы проводят 7–10 загрузок наиболее концентрированного градуировочного (рабочего) раствора (см. 5.3.6 или 5.3.7) и отмечают высоты пиков. Насыщение колонки проводят до достижения постоянной высоты пиков (отношение разности между двумя последовательными определениями концентрации витамина к среднему арифметическому значению этих операций не более 3 % отн.).

5.3.3 Приготовление растворителя для экстракции витаминов А, Е

Двухкомпонентный экстрагент готовят смешиванием изопропилового спирта и дистиллированной воды в объемном соотношении 97 : 3. Для этого в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят пипеткой 30 см^3 дистиллированной воды, объем доводят до метки изопропиловым спиртом.

Срок хранения экстрагента в стеклянной емкости с притертой пробкой не ограничен.

5.3.4 Получение абсолютного спирта

В колбу вместимостью 500 см^3 вносят (30 ± 1) г окиси кальция, добавляют 250 см^3 этанола и кипятят с холодильником типа ХШ в течение 6–8 ч. Затем этанол перегоняют при температуре 64,7 °С.

5.3.5 Определение массовой концентрации витамина А в стандартном образце

Взвешивают (0,100 ± 0,002) г стандартного образца витамина А, затем растворяют в абсолютном спирте в мерной колбе вместимостью 50 см^3.

Доводят этим же спиртом объем раствора в колбе до метки и перемешивают. Отбирают 1–2 см^3 полученного раствора в мерную колбу вместимостью 50 см^3, доводят объем до метки абсолютным спиртом и измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 326 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве контрольного раствора применяют абсолютный спирт.

Массовую концентрацию витамина А, X, г/см^3, определяют по формуле

$$X = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot \rho}{m \cdot V \cdot 100 \cdot 1550}, \qquad (1)$$

где D – оптическая плотность раствора витамина *А, е.о.п.*;

V_1 – первоначальный объем разведения раствора стандартного образца витамина А, см^3;

V_2 – окончательный объем разведения раствора стандартного образца витамина А, см^3;

ρ – плотность стандартного образца витамина А, г/см^3;

m – масса стандартного образца витамина А, г;

V – объем раствора витамина А, используемый для второго разведения, см^3;

100 – коэффициент пересчета;

1550 – удельный показатель поглощения $E_{1см}^{1\%}$ при длине волны 326 нм для 100 %-ного раствора витамина А в абсолютном спирте.

Содержание витамина А в 1 см^3 соответственно должно быть

0,0310–0,0378 г (90000–110000 МЕ); 0,0619-0,0757 г (180000–220000 МЕ);
0,0774–0,0946 г (225000–275000 МЕ).

Полученные результаты используют для расчета содержания витамина А в стандартном растворе.

5.3.6 Построение градуировочного графика для витамина А

Для приготовления основного стандартного раствора взвешивают стандартный образец витамина А массой, необходимой для получения раствора с содержанием этого витамина 600 МЕ/см^3, помещают его в мерную колбу вместимостью 50 см^3, растворяют в изопропиловом спирте, перемешивают и доводят этим спиртом до метки.

Срок хранения основного стандартного раствора в емкости с притертой пробкой в холодильнике при температуре 4 °С – 10 °С – не более одной недели.

Из этого раствора готовят градуировочные (рабочие) растворы, содержащие 120, 300, 600, 1200, 3000, 6000, 12000 МЕ витамина А в 25 см^3 раствора. Для этого берут соответственно 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 и 20,0 см^3 основного стандартного раствора, помещают в мерные колбы вместимостью 25 см^3 и доводят объемы до метки изопропиловым спиртом.

Срок хранения градуировочных (рабочих) растворов в емкостях с притертыми пробками, в холодильнике при температуре 4 °С – 10 °С – не более 1 мес.

Полученные рабочие растворы анализируют на жидкостном хроматографе при следующих условиях:

- колонка хроматографическая 2 × 64 (2 × 80, 2 × 120) мм с сорбентом;
- элюент трехкомпонентный по 5.3.1;
- объем пробы – 6 мм^3;
- длина волны – 328 нм;
- постоянная времени – 0,2 с;
- скорость подачи элюента – 150 мм^3/мин.

Удерживаемый объем пика витамина А составляет 300–360 мм^3 (может меняться в зависимости от длины колонки).

Каждый раствор хроматографируют два раза. После выхода пика колонку промывают, прокачивая через нее 100–200 мм^3 элюента до выхода на нулевую линию.

Средние значения высот хроматографических пиков, выраженные в единицах оптической плотности или в миллиметрах, откладывают по оси ординат градуировочного графика, а по оси абсцисс – значения содержания витамина А, МЕ, в 25 см^3 раствора.

Построение градуировочных графиков можно заменить расчетом коэффициента наклона, K, МЕ/е.о.п. или МЕ/мм, по формуле

$$K = \frac{\sum_{i=1}^{n} K_i}{n}, \qquad (2)$$

где n – количество точек, по которым строят градуировочный график;

K_i – коэффициент наклона градуировочного графика для i-го градуировочного раствора, МЕ/е.о.п. или МЕ/мм.

Значение коэффициента наклона градуировочного графика для i-го градуировочного раствора, K_i, МЕ/е.о.п. или МЕ/мм, вычисляют по формуле

$$K_i = \frac{C_i}{h_i}, \qquad (3)$$

где C_i – содержание витамина А в соответствующем i-ом градуировочном растворе, МЕ;

h_i – высота i-го хроматографического пика, е.о.п. или мм.

5.3.7 Построение градуировочного графика для витамина Е

Взвешивают на весах (0,020 ± 0,001) г стандартного образца витамина Е, затем растворяют в изопропиловом спирте в мерной колбе вместимостью 50 см^3, объем доводят спиртом до метки и перемешивают. Получают основной стандартный раствор витамина Е с массовой концентрацией 0,4 мг/см^3.

Из полученного основного стандартного раствора готовят градуировочные (рабочие) растворы, содержащие 7,0; 5,0; 3,0; 1,0; 0,5; 0,1 и 0,05 мг витамина Е в 25 см^3 раствора. Для этого соответственно 17,5; 12,5; 7,5; 2,5; 2,25; 1,25; 0,25; 0,125 см^3 основного стандартного раствора помещают в мерные колбы вместимостью 25 см^3 и объемы доводят до метки изопропиловым спиртом.

Рабочие растворы анализируют на жидкостном хроматографе при следующих условиях:
- колонка хроматографическая 2 × 64 (2 × 80, 2 × 120) мм с сорбентом;
- элюент трехкомпонентный по 5.3.1;
- объем пробы – 6 мм^3;
- длина волны – 286 нм;
- постоянная времени – 0,2 с;
- скорость подачи элюента –100 мм^3/мин.

Удерживаемый объем пика витамина Е составляет 540–660 мм^3 (может меняться в зависимости от длины колонки).

Каждый раствор хроматографируют два раза. После выхода пика колонку промывают, прокачивая через нее 200–250 мм^3 элюента до выхода на нулевую линию.

Средние значения высот хроматографических пиков (в единицах оптической плотности или миллиметрах) откладывают по оси ординат градуировочного графика, а по оси абсцисс – значения содержания витамина Е в микрограммах в 25 см^3 раствора.

Построение градуировочных графиков можно заменить расчетом коэффициента наклона, *К,* мг/е.о.п. или мг/мм, по формуле

$$K = \frac{\sum_{i=1}^{n} K_i}{n}, \qquad (4)$$

где n – количество точек, по которым строится градуировочный график;

K_i – коэффициент наклона градуировочного графика для i-го градуировочного раствора, мг/е.о.п. или мг/мм.

Значение коэффициента наклона градуировочного графика для i-го градуировочного раствора, K_i, мг/е.о.п. или мг/мм, вычисляют по формуле

$$K_i = \frac{C_i}{h_i}, \qquad (5)$$

где C_i – содержание витамина Е в соответствующем i-ом градуировочном растворе, мг;

h_i – высота i-го хроматографического пика, е.о.п. или мм.

5.3.8 Проверка градуировочных графиков

Градуировочные графики контролируют не реже одного раза в неделю. Для этого 1–2 стандартных рабочих растворов витаминов А, Е следует хроматографировать по 5.3.6 и 5.3.7. Отклонение полученных результатов (высота пика, выраженная в единицах оптической плотности или миллиметрах) от измеренных в момент построения градуировочного графика, *а*, %, определяют по формуле

$$a = \frac{h_1 - h_2}{h_1} \cdot 100, \qquad (6)$$

где h_1, h_2 – высоты хроматографических пиков, определенные при построении градуировочного графика и в момент проверки соответственно, е.о.п. или мм;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

При отклонении полученных результатов более чем на 5 % строят новый градуировочный график по свежеприготовленным стандартным растворам препаратов витамина А и витамина Е.

5.4 Проведение испытания

5.4.1 Экстракция витаминов А, Е из премиксов

В соответствии с таблицей 1 взвешивают анализируемую пробу премикса с погрешностью ± 0,001 г, затем помещают ее в коническую колбу со шлифом вместимостью 25 см^3 или 50 см^3 и приливают соответствующий объем экстрагента (см. 5.3.3).

Таблица 1

Содержание витамина А в премиксе, млн. МЕ/т	Содержание витамина Е в премиксе, г/т	Масса анализируемой пробы премикса, г	Объем экстрагента, $см^3$
40–100	50–100	10	20
100–2000	100–500	5	15
2000–6000	500–1000	2	10

Колбу соединяют с холодильником типа ХПТ и нагревают на водяной бане при температуре (75 ± 1) °С в течение 10 мин. Затем колбу с экстрактом премикса отсоединяют от холодильника, закрывают притертой пробкой, охлаждают под струей воды до комнатной температуры и фильтруют через воронку с фильтром ПОР-16 с использованием водоструйного вакуумного насоса. Фильтрат собирают в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$. Коническую колбу и осадок на фильтре тщательно промывают 2–3 раза небольшими порциями по 2–3 $см^3$ изопропилового спирта. Объем в мерной колбе доводят до метки изопропиловым спиртом, тщательно перемешивают и хроматографируют.

5.4.2 Хроматографирование

Полученные экстракты хроматографируют по 5.3.6 и 5.3.7. Примеры хроматограмм экстрактов витаминов А, Е из премиксов представлены в приложении А, рисунок А.1.

При возникновении сомнений в правильности выбора пика (по объему или времени удержания), соответствующего витамину А или Е необходимо в анализируемый экстракт внести небольшое количество одного из градуировочных (рабочих) растворов витамина А или Е. Объемное соотношение экстракта и раствора витамина А или Е равно 10 : 2 или 10 : 5. Увеличение высоты соответствующего пика по сравнению с высотой предыдущего пика на хроматограмме, полученной до введения градуировочного (рабочего) раствора в анализируемый экстракт, свидетельствует о правильности выбора пика, соответствующего витамину А или Е.

5.5 Обработка результатов

Для определения содержания витаминов А, Е в премиксе проводят две экстракции и каждый экстракт хроматографируют два раза. Находят средне- арифметическое значение высоты пиков, выраженное в единицах оптической плотности или миллиметрах, и по градуировочному графику определяют содержание витамина А в международных единицах на грамм, витамина Е в миллиграммах на грамм.

Содержание в премиксе витамина А, X_A, млн. МЕ/т, вычисляют по формуле

$$X_{\text{A}} = \frac{m_1 \cdot 10^{-6}}{m \cdot 10^{-6}}, \qquad (7)$$

где m_1 – содержание витамина А, найденное по градуировочному графику, МЕ;

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

10^{-6} – коэффициенты пересчета МЕ в млн. МЕ и граммов в тонну.

Содержание в премиксе витамина Е, X_E, г/т, вычисляют по формуле

$$X_{\text{E}} = \frac{m_2 \cdot 10^{-3}}{m \cdot 10^{-6}}, \qquad (8)$$

где m_2 – содержание витамина Е, найденное по градуировочному графику, мг;

10^{-3} – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы;

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

10^{-6} – коэффициент пересчета граммов в тонну.

Содержание в премиксе витамина А, X_A, млн. МЕ/т, при использовании коэффициента наклона K вычисляют по формуле

$$X_{\text{A}} = K\frac{h_{\text{A}} \cdot 10^{-6}}{m \cdot 10^{-6}}, \qquad (9)$$

где K – коэффициент наклона градуировочного графика для витамина А, рассчитанный по формуле (2), МЕ/е.о.п. или МЕ/мм;

h_A – высота хроматографического пика витамина А, е.о.п. или мм;

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

10^{-6} – коэффициенты пересчета МЕ в млн. МЕ и граммов в тонну.

Содержание в премиксе витамина Е, X_E, г/т, при использовании коэффициента наклона К вычисляют по формуле

$$X_{\text{E}} = K\frac{h_{\text{E}} \cdot 10^{-3}}{m \cdot 10^{-6}}, \qquad (10)$$

где K – коэффициент наклона градуировочного графика для витамина Е, рассчитанный по формуле (3), мг/е.о.п. или мг/мм;

h_{E} – высота хроматографического пика витамина Е, е.о.п. или мм;

10^{-3} – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы;

m – масса анализируемой пробы премикса, г;

10^{-6} – коэффициент пересчета граммов в тонну.

Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости (см. 7.1).

6 Определение содержания витаминов А (ретинола ацетата), D (D_2 эргокальциферола и D_3 холекальциферола), Е (токоферола ацетата) методом нормально-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии

6.1 Сущность метода заключается в омылении анализируемой пробы премикса водно-спиртовым раствором гидроокиси калия, экстракции витаминов А (ретинола ацетата), D_2 (эргокальциферола), Е (токоферола ацетата) гексаном с последующим определением содержания витаминов нормально-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией, пересчетом содержания витамина D_2 (эргокальциферола) на содержание витамина D_3 (холекальциферола).

6.2 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный, укомплектованный спектрофотометрическим детектором, пригодным для измерения оптической плотности при длине волны от 190 до 360 нм, самописцем или интегратором, позволяющим измерять высоту и площадь пиков, и компьютером с установленным программным обеспечением для обработки результатов измерений.

Колонка для хроматографии стеклянная или металлическая высотой 150 мм и диаметром 3 мм, заполненная сепароном S6X с зернением 7 мкм.

Спектрофотометр со спектральным диапазоном работы от 186 до 1100 нм.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,001 г.

Испаритель ротационный.

Баня водяная.

Холодильники стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336.

Колбы конические со шлифом Кн-2-250-29/32 ТХС по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-1-1(2) -1 по ГОСТ 29169.

Пипетки 1-1-1(2) -1(5) по ГОСТ 29227.

Микрошприцы МШ-10М, МШ-50М.

Колбы мерные 2-25(50, 100)-1(2) по ГОСТ 1770.

Воронки делительные ВД 1(2)-200(500) ХС по ГОСТ 25336.

Цилиндры 1(2, 3, 4)-50(100, 250, 1000) по ГОСТ 1770.

Пробирки с притертой пробкой 2-5(10)-0,1(0,2) по ГОСТ 1770.

Воронки стеклянные В-36(56)-50(80) ХС по ГОСТ 25336.

Склянки с притертой пробкой.

Палочки стеклянные.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363.

Колонки стеклянные диаметром 2–4 см и высотой 80 см.

Гексан.

Спирт этиловый ректификованный технический объемной долей 96 % по ГОСТ 18300.

Спирт изопропиловый (пропанол-2) по ГОСТ 9805.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166.

Стандартный образец витамина А (ретинола ацетата), содержащий не менее 1 млн. МЕ витамина А в 1 г.

Стандартный образец витамина Е (токоферола ацетата) с массовой долей не менее 99,0 %.

Стандартный образец витамина D_2 (эргокальциферола) с массовой долей не менее 99,0 %.

Алюминия окись для хроматографии, нейтральная.

Гидрохинон по ГОСТ 19627.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Бумага индикаторная.

Фильтры обеззоленные (красная лента).

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений и оборудования с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

2 Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

3 Допускается использование других материалов с характеристиками не ниже указанных.

6.3 Подготовка к измерению

6.3.1 Определение содержания витамина А в стандартном образце по 5.3.5.

6.3.2 Получение абсолютного спирта по 5.3.4.

6.3.3 Приготовление стандартного раствора витамина А

Стандартный образец витамина А массой, необходимой для приготовления раствора с содержанием витамина 10000 МЕ/см^3, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и растворяют в изопропиловом спирте. Раствор перемешивают и доводят объем до метки спиртом. Хранят в холодильнике в склянке с притертой пробкой и используют в течение одной недели.

6.3.4 Приготовление стандартного раствора витамина D_2 (эргокальциферола)

Ампулу (капсулу), содержащую 0,1 г витамина D_2, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Доводят содержимое колбы до метки изопропиловым спиртом и перемешивают. Полученный раствор 1 содержит 40000 МЕ/см^3 витамина D_2. Из него берут 1 см^3 раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, доводят до метки этим же спиртом и перемешивают. Полученный раствор 2 содержит 800 МЕ/см^3 витамина D_2.

Срок хранения раствора в стеклянной емкости с притертой пробкой в холодильнике – не более одной недели.

6.3.5 Приготовление стандартного раствора витамина Е

0,05 г стандартного образца витамина Е переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3, растворяют в изопропиловом спирте, доводят им объем до метки и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в стеклянной емкости с притертой пробкой в холодильнике – не более одной недели.

6.3.6 Подготовка растворителей

Очистку растворителей, применяемых в хроматографии, проводят посредством перегонки, отбрасывая первую и последнюю фракции в количестве 1/10 от первоначального объема, или пропусканием через колонку, заполненную активированной окисью алюминия.

Окись алюминия активируют при нагревании в течение 1 ч при температуре 400 °С – 450 °С. Колонку высотой 60–80 см и диаметром 2 см заполняют 80 г активированной окиси алюминия и пропускают через нее 700 см^3 растворителя. Для проверки чистоты в колонку жидкостного хроматографа загружают 50 мм^3 растворителя. В случае его загрязнения на хроматограмме появляются пики, соответствующие времени удерживания витаминов А, D, Е.

6.3.7 Приготовление водно-спиртового раствора гидроокиси калия с массовой долей 10 %

Растворяют 20 г гидроокиси калия в смеси из 20 см^3 воды и 180 см^3 этилового спирта. Раствор готовят непосредственно перед контролем.

6.4 Проведение испытания

6.4.1 Омыление и подготовка к контролю стандартных растворов витаминов А, D, Е

В конические колбы вместимостью 250 см^3, снабженные холодильником, помещают 0,25 см^3 раствора витамина А по 6.3.3, 1 см^3 раствора витамина D_2 по 6.3.4 (раствор 2), 0,2 см^3 раствора витамина Е по 6.3.5. В каждую колбу добавляют 0,1 г гидрохинона, 30 см^3 10 %–ного водно-спиртового раствора гидроокиси калия и подвергают омылению в течение 30 мин на водяной бане при температуре 85 °С. Колбы охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и добавляют по 30 см^3 дистиллированной воды и по 30 см^3 гексана. Полученные смеси тщательно перемешивают и переносят в делительные воронки вместимостью 200 см^3.

После расслаивания нижние слои (водно-спиртовые) сливают в конические колбы, а гексановые слои оставляют в делительной воронке. Экстракцию гексаном водно-спиртовых слоев в конической колбе проводят еще дважды, каждый раз сливая в делительную воронку гексановый слой.

Гексановые вытяжки объединяют и промывают в делительной воронке дистиллированной водой порциями по 30 $см^3$ до нейтральной реакции среды (проверяют по индикаторной бумаге). Промытые экстракты переносят в сухие перегонные колбы, пропуская их через бумажные фильтры со слоем безводного сульфата натрия (около 50 г). Делительные воронки и фильтрующие материалы промывают свежими порциями гексана по 20–30 $см^3$.

Все гексановые растворы каждого стандартного раствора витамина объединяют и переносят в колбы роторного испарителя. Температура водяной бани роторного испарителя 70 °С. После отгонки гексана полученные сухие остатки растворяют в 3 $см^3$ гексана и переносят в предварительно откалиброванные мерные пробирки с притертыми пробками. Растворы хранят в темном месте при температуре 4 °С – 8 °С.

6.4.2 Омыление и подготовка образцов премиксов к хроматографиро-ванию

(10,000 ± 0,001) г анализируемой пробы премикса помещают в коническую колбу вместимостью 250 $см^3$, снабженную обратным холодильником. Добавляют антиоксидант (0,1 г гидрохинона), 50 $см^3$ водно-спиртового раствора щелочи и подвергают омылению на водяной бане при температуре 82 °С – 85 °С в течение 30 мин.

По окончании омыления колбу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 50 $см^3$ дистиллированной воды и 50 $см^3$ гексана, смесь тщательно перемешивают и дают отстояться. После расслаивания смеси гексановый слой осторожно сливают в делительную воронку вместимостью 500 $см^3$.

Экстракцию гексаном повторяют дважды порциями по 50 $см^3$, последнюю фракцию переносят в делительную воронку, сливая содержимое колбы через воронку с марлевым слоем. Остаток на марле слегка отжимают стеклянной палочкой и выбрасывают. Воронку обмывают дистиллированной водой (около 50 $см^3$) в делительную воронку, в которой собраны гексановые вытяжки. Содержимое делительной воронки промывают дистиллированной водой порциями по 50 $см^3$ до нейтральной реакции среды (по индикаторной бумаге). Промытый экстракт переносят в сухую перегонную колбу, пропуская его через обеззоленный фильтр, заполненный безводным сульфатом натрия (около 50 г). Делительную воронку и фильтр промывают 40 $см^3$ гексана. Отгоняют гексан на ротационном испарителе при температуре бани 70 °С. Сухой остаток растворяют в 3 $см^3$ гексана, который добавляют порциями, чтобы перенести в предварительно откалиброванную пробирку с притертой пробкой.

Полученный экстракт используют для хроматографического анализа.

6.4.3 Подготовка жидкостного хроматографа к работе

Подготовка хроматографа осуществляется в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Перед началом измерений хроматограф прогревают в течение 15 мин. Сначала проводят заполнение насоса элюентом. В качестве подвижной фазы используют смесь гексана с этанолом в соотношении 99,5 : 0,5 по объему. Устанавливают скорость элюирования, соответствующую эффективности колонки для конкретных премиксов от 0,5 до 2,0 $см^3$/мин. При определении содержания витаминов А, Е устанавливают светофильтр длиной волны 289 нм, для определения содержания витамина D_2 – светофильтр длиной волны 254 нм. Скорость движения диаграммной ленты регистратора устанавливают равной 0,3–0,6 см/мин.

После промывания колонки элюентом регистрирующий прибор должен показывать стабильную нулевую линию. С целью повышения чувствительности и точности измерений для каждого хроматографа подбирают оптимальные условия хроматографирования.

Для насыщения колонки в начале работы проводят по 7–10 загрузок стандартных растворов и отмечают высоты пиков. При достижении постоянной высоты можно приступить к испытаниям.

6.4.4 Проведение хроматографических измерений

Для хроматографических измерений используют метод сравнения со стандартом. Сравнивают высоты хроматографических пиков для анализируемой пробы и пробы стандарта.

В колонку последовательно вводят от 3 до 20 $мм^3$ анализируемого раствора, стандартного раствора витамина А и стандартного раствора витамина Е. Получают соответствующие хроматограммы при длине волны фотометрического детектора 289 нм (приложение А, рисунок А.2). После этого меняют светофильтр, устанавливая рабочую длину волны 254 нм, и при этих условиях снимают хроматограммы для растворов анализируемой пробы и стандартного раствора витамина D_2, (приложение А, рисунок А.3).

Высоты пиков, соответствующие времени удерживания витаминов А, D_2, Е, измеряют как расстояние от вершины пика до линии, проведенной в основании пика. Значения высот пиков в единицах

оптической плотности или миллиметрах используют для вычисления содержания витаминов A, D, E в анализируемом образце.

6.5 Обработка результатов

6.5.1 Содержание витамина А, X_A, млн. МЕ/т, рассчитывают по формуле

$$X_A = \frac{C_A \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot h_x \cdot 10^{-6}}{V_4 \cdot V_5 \cdot h_{ст} \cdot m \cdot 10^{-6}}, \quad (11)$$

где C_A – концентрация витамина А стандартном растворе, МЕ/см^3, по 6.3.3;
V_1 – объем стандартного раствора витамина А, взятый на омыление, см^3, по 6.4.1;
V_2, V_4 – объемы загрузок в колонку стандартного раствора витамина А и раствора пробы, полученных после омыления, соответственно, мм^3, по 6.4.4;
V_3, V_5 – объемы экстрактов пробы и стандартного раствора витамина А после проведения подготовки (омыление и т.д.) соответственно по 6.4.2 и 6.4.1, см^3;
h_x, $h_{ст}$ – высоты пиков на хроматограмме витамина А в пробе и в стандартном растворе витамина А соответственно, е.о.п. или мм;
m – масса анализируемой пробы премикса, г, по 6.4.2;
10^{-6} – коэффициенты пересчета МЕ в млн. МЕ и граммов в тонну.

6.5.2 Содержание витамина D_2 в премиксе, X_D, млн. МЕ/т, вычисляют по формуле

$$X_D = \frac{C_D \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot V_4 \cdot h_x \cdot 10^{-6}}{V_5 \cdot V_6 \cdot V_7 \cdot h_{ст} \cdot m \cdot 10^{-6}}, \quad (12)$$

где C_D – концентрация витамина D_2 в стандартном растворе, МЕ/см^3, по 6.3.4;
V_1 – объем стандартного раствора витамина D_2, взятый для последующего разбавления, см^3, по 6.3.4;
V_2 – объем стандартного раствора витамина D_2, взятый на омыление, см^3, по 6.4.1;
V_3, V_6 – объемы загрузок в колонку стандартного раствора витамина D_2 и раствора пробы, полученных после омыления, соответственно, мм^3, по 6.4.4;
V_4, V_7 – окончательные объемы раствора пробы и стандартного раствора D_2, подготовленного для хроматографии соответственно по 6.4.2 и 6.4.1, см^3;
h_x, $h_{ст}$ – высоты пиков витамина D_2 на хроматограммах пробы и стандартного раствора витамина D_2 соответственно, е.о.п. или мм;
V_5 – объем колбы со стандартным раствором D_2 после первого разведения, см^3, по 6.4.1;
m – масса анализируемой пробы премикса, г, по 6.4.2;
10^{-6} – коэффициенты пересчета МЕ в млн. МЕ и граммов в тонну.

Примечание – При обогащении премиксов витамином D_3 в числитель формулы следует вводить коэффициент 0,97 (отношение коэффициентов экстинкций витамина D_2 к D_3).

6.5.3 Содержание витамина Е, X_E, г/т, вычисляют по формуле

$$X_E = \frac{C_E \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot h_x \cdot 10^{-3}}{V_4 \cdot V_5 \cdot h_{ст} \cdot m \cdot 10^{-6}}, \quad (13)$$

где C_E – массовая концентрация стандартного образца витамина Е, мг/см^3 по 6.3.5;
V_1 – объем стандартного раствора витамина Е, взятый на омыление, см^3, по 6.4.1;
V_2, V_4 – объемы загрузок в колонку стандартного раствора витамина Е и раствора пробы соответственно, см^3, по 6.4.4;
V_3, V_5 – окончательные объемы раствора пробы и стандартного раствора витамина Е, подготовленные для хроматографии, соответственно, см^3, по 6.4.2 и 6.4.1;
h_x, $h_{ст}$ – высоты пиков витамина Е на хроматограммах пробы и стандартного раствора соответственно, е.о.п., мм;
10^{-3} – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы;

m – масса анализируемой пробы премикса, г, по 6.4.2;

10^{-6} – коэффициент пересчета граммов в тонну.

6.5.4 Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа.

За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости (см. 7.1).

7 Контроль точности результатов измерений

7.1 Приемлемость результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости)

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельных независимых испытаний, полученными одним и тем же методом на одной испытуемой пробе в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором на одном и том же экземпляре оборудования в течение короткого промежутка времени при доверительной вероятности P = 0,95, не должно превышать предела повторяемости (сходимости), r, приведенного в таблицах 2, 3.

7.2 Приемлемость результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельных испытаний, полученными одним и тем же методом на одной испытуемой пробе в разных лабораториях разными операторами на различных экземплярах оборудования при доверительной вероятности P = 0,95, не должно превышать предела воспроизводимости, R, приведенного в таблицах 2, 3.

Таблица 2 - Метрологические характеристики определения содержания витаминов A, E методом обращенно-фазной жидкостной хроматографии

Наименование показателя	Предел повторяемости, r	Предел воспроизводимости, R
Витамин А, млн. МЕ/т	$0{,}1\cdot \bar{x}_{A}$	$0{,}15\cdot \bar{X}_{A}$
Витамин Е, г/т	$0{,}15\cdot \bar{x}_{E}$	$0{,}2\cdot \bar{X}_{E}$
Примечание $\bar{x}_{A}$, $\bar{X}_{A}$ – среднеарифметическое значение результатов испытаний содержания витамина А, млн. МЕ/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости; $\bar{x}_{E}$, $\bar{X}_{E}$ – среднеарифметическое значение результатов испытаний содержания витамина Е, г/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости.		

Таблица 3 - Метрологические характеристики определения содержания витаминов A, D, E методом нормально-фазной жидкостной хроматографии

Наименование показателя	Предел повторяемости, r	Предел воспроизводимости, R
Витамин А, млн. МЕ/т	$0{,}1\cdot \bar{x}_{A}$	$0{,}2\cdot \bar{X}_{A}$
Витамин D, млн. МЕ/т	$0{,}1\cdot \bar{x}_{D}$	$0{,}2\cdot \bar{X}_{D}$
Витамин Е, г/т	$0{,}1\cdot \bar{x}_{E}$	$0{,}2\cdot \bar{X}_{E}$
Примечание $\bar{x}_{A}$, $\bar{X}_{A}$ – среднеарифметическое значение результатов испытаний содержания витамина А, млн. МЕ/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости; $\bar{x}_{D}$, $\bar{X}_{D}$ – среднеарифметическое значение результатов испытаний содержания витамина D, млн. МЕ/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости; $\bar{x}_{E}$, $\bar{X}_{E}$ – среднеарифметическое значение результатов испытаний содержания витамина Е, г/т, в условиях повторяемости и воспроизводимости.		

Если расхождение между результатами параллельных определений превышает предел повторяемости, то анализ повторяют, начиная со взвешивания анализируемой пробы.

Если расхождение между результатами параллельных определений вновь превышает предел повторяемости, выясняют и устраняют причины плохой повторяемости результатов анализа.

8 Требования безопасности

8.1 Работы с концентрированными кислотами, щелочами и др. летучими веществами должны проводиться в вытяжном шкафу.

8.2 При проведении испытаний необходимо соблюдать требования электробезопасности по ГОСТ 12.2.007.0.

9 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица, имеющие высшее или среднее специальное химическое образование или опыт работы в химической лаборатории, владеющие техникой проведения анализа и изучившие инструкции по эксплуатации приборов.

Приложение А
(рекомендуемое)

Примеры хроматограмм определения витаминов A, D, E

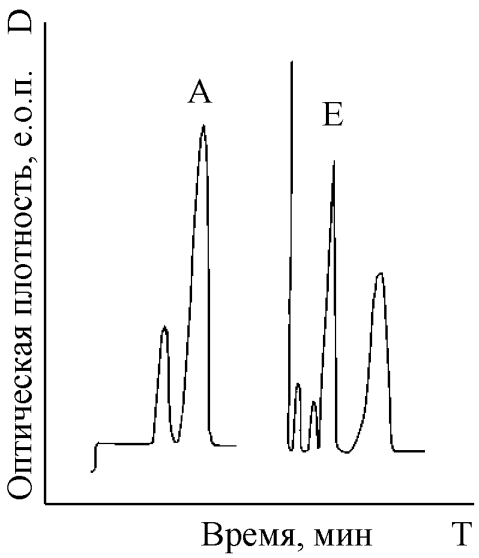


Рисунок А.1 – Хроматограммы экстрактов витаминов A, E
из премикса

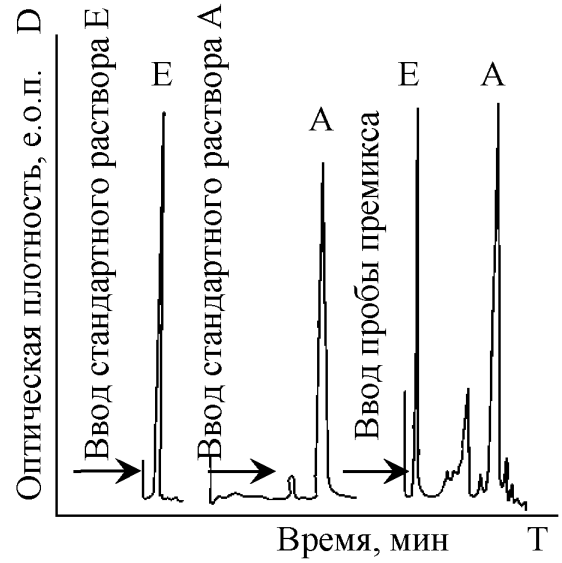


Рисунок А.2 – Хроматограммы экстрактов витаминов A, E из премикса и стандартного раствора при длине волны 289 нм

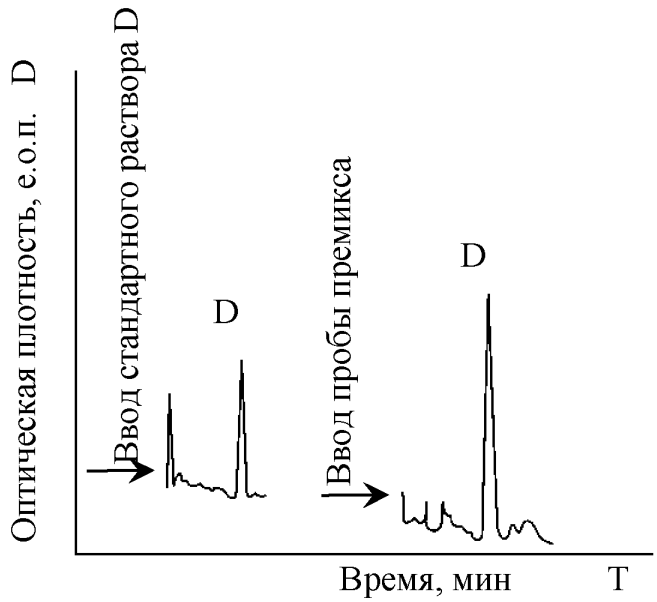


Рисунок А.3 – Хроматограммы экстрактов витаминов D из премикса и стандартного раствора

УДК 636.085.3:006.354 ОКС 65.120 С19

Ключевые слова: премиксы, витамины A, D, E, метод омыления, экстракция, -обращенная фаза, нормальная фаза, высокоэффективная жидкостная хроматография, ацетонитрил, изопропиловый спирт

Подписано в печать 01.04.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1.86 Тираж 31 экз. Зак. 1778.

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