ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54637— 2011

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Метод определения витамина D_3

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом № 184-ФЗ «О техническом регулировании» от 27 декабря 2002 г., а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Учреждением Российской академии медицинских наук Научно-исследовательским институтом питания РАМН

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 36 «Функциональные пищевые продукты»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 декабря 2011 г. № 786-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом 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, 2013

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 Требования безопасности 3
6 Условия выполнения испытания 3
7 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 4
8 Подготовка к выполнению измерений 5
9 Выполнение измерений 8
10 Обработка и оформление результатов 8
11 Метрологические характеристики метода 9
Библиография 11

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Метод определения витамина D_3

Functional food products.
Method of vitamin D_3 determination

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на функциональные пищевые продукты и устанавливает метод определения массовой доли витамина D_3 (холекальциферола) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ).

Диапазон измерений массовой доли витамина D_3 составляет от 0,1 до 1,0 млн$^{-1}$.

Примечание — Настоящий стандарт допускается распространять на пищевые продукты при условии соблюдения диапазона измерений.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 8.563—2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 52062—2003 Масла растительные. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 52179—2003 Маргарины, жиры для кулинарии, кондитерской, хлебопекарной и молочной промышленности. Правила приемки и методы контроля

ГОСТ Р 52349—2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

Издание официальное

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 4517—87 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8981—78 Эфиры этиловый и нормальный бутиловый уксусной кислоты технические. Технические условия

ГОСТ 9293—74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0—80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19627—74 Гидрохинон (парадиоксибензол). Технические условия

ГОСТ 24363—80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

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 27025—86 Реактивы. Общие указания по проведению испытаний

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 ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. 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 применены термины по ГОСТ Р 52349, а также следующий термин с соответствующим определением:

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

4 Сущность метода

Витамин D_3 экстрагируют после омыления анализируемой пробы с использованием раствора гидроксида калия. Полученный экстракт используют для выделения методом полупрепаративной нормально-фазной (далее — НФ) ВЭЖХ фракции, содержащей витамин D_3, и затем проводят анализ с использованием аналитической обращенно-фазной (далее — ОФ) ВЭЖХ. Витамин D_3 детектируют по поглощению в ультрафиолетовой области спектра, пики идентифицируют по их времени удерживания и спектру.

Количественный анализ проводят с помощью метода внутреннего стандарта, используя площадь или высоту пиков. В качестве внутреннего стандарта для определения витамина D_3 используется витамин D_2.

5 Требования безопасности

5.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении испытаний необходимо соблюдать требования пожарной безопасности, установленные ГОСТ 12.1.004, электробезопасности — ГОСТ Р 12.1.019, техники безопасности при работе с реактивами — ГОСТ 12.1.007, а также требования, изложенные в технической документации на спектрофотометр, хроматограф, другие приборы и оборудование.

Помещение, в котором проводят испытания, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией. Контроль за содержанием вредных веществ в воздухе рабочей зоны проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005.

При работе с газовыми баллонами необходимо руководствоваться [1].

5.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению испытаний и обработке результатов допускаются лица с высшим или средним специальным образованием по профессиям химик, инженер-химик, техник, лаборант, имеющие опыт работы в химической лаборатории. Первое применение метода в лаборатории следует проводить под наблюдением квалифицированного специалиста в области ВЭЖХ.

6 Условия выполнения испытания

6.1 Общие условия

Испытания проводят в нормальных лабораторных условиях: температура окружающей среды — (25 ± 5) °С; относительная влажность — (65 ± 15) %; частота переменного тока — (50 ± 5) Гц; напряжение в сети — (220 ± 10) В.

Хранение стандартных веществ проводят в защищенном от света месте и при температуре не выше 4 °С.

При приготовлении и хранении растворов следует выполнять требования ГОСТ 27025, ГОСТ 4517.

Для предотвращения разрушения витамина D_3 анализ испытуемой пробы и стандартов проводят в присутствии антиоксиданта (L-аскорбиновой кислоты, гидрохинона, пирогаллола), предохраняя пробы от попадания на них прямого солнечного света.

6.2 Условия хроматографического анализа

Температура колонки: 25 °С или температура окружающей среды.

Объемная скорость подачи подвижной фазы для НФ и ОФ ВЭЖХ: 0,7—1,0 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы для проведения полупрепаративной НФ ВЭЖХ: 0,20—0,25 $см^3$.

Объем вводимой пробы для проведения аналитической ОФ ВЭЖХ: 0,1 $см^3$.

Подвижная фаза для проведения полупрепаративной НФ ВЭЖХ (в объемном соотношении): н-гексан : 2-пропанол (98:2) или н-гексан : 2-пропанол : тетрагидрофуран (98:1:1).

Подвижная фаза для проведения аналитической ОФ ВЭЖХ (в объемном соотношении) : ацетонитрил : метиловый спирт (80:20) или ацетонитрил : метиловый спирт : метилен хлористый (50:45:5).

Проверку оптимальности условий хроматографического разделения в условиях полупрепаративной НФ ВЭЖХ осуществляют путем хроматографического анализа раствора анализируемой пробы по 8.2.5. Эффективность хроматографического разделения признается удовлетворительной, если коэффициент разделения пика витамина D от пиков токоферолов матрицы составляет не менее 1,3. В противном случае для достижения требуемой эффективности разделения экспериментальным путем подбирают скорость потока подвижной фазы или проводят испытания других подвижных фаз и колонок.

Проверку оптимальности условий хроматографического разделения в условиях аналитической ОФ ВЭЖХ осуществляют путем хроматографического анализа смешанного раствора витаминов D_2 и D_3 с массовой концентрацией каждого вещества не менее 0,5 $мкг/см^3$. Данный раствор готовят из основных растворов по аналогии с методикой приготовления рабочих растворов по 8.1.2.1 и 8.1.2.2. Эффективность хроматографического разделения признается удовлетворительной, если коэффициент разделения соседних пиков витаминов D_2 и D_3 составляет не менее 1,3. В противном случае для достижения требуемой эффективности разделения экспериментальным путем подбирают скорость потока подвижной фазы или проводят испытания других подвижных фаз и колонок.

7 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

7.1 Для определения массовой доли витамина D_3 применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование и материалы:

- весы по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности ± 0,1 мг;
- спектрофотометр со спектральным рабочим диапазоном от 190 до 1100 нм, основной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %;
- кюветы кварцевые с длиной оптического пути 1 см;
- хроматограф для проведения анализа методом полупрепаративной ВЭЖХ, включающий следующие элементы: насос; устройство для ввода пробы; колонку для проведения анализа методом полупрепаративной НФ ВЭЖХ диаметром 0,4—0,46 см, длиной 25—30 см, заполненную силикагелем или силикагелем, модифицированным CN- или NH_2-группами с размером частиц 5 мкм; спектрофотометрический (длина волны детектирования 265 нм) или диодно-матричный детектор с погрешностью измерений не более 10 % отн., устройство для сбора фракций, регистрирующее устройство (самописец или интегратор), позволяющее проводить измерение площади (или высоты) пика с погрешностью не более 1 %; программное обеспечение для обработки полученных результатов измерений;
- хроматограф для проведения анализа методом аналитической ВЭЖХ, включающий следующие элементы: насос; устройство для ввода проб; колонку для проведения анализа методом аналитической ОФ ВЭЖХ диаметром 0,40—0,46 см, длиной 25—30 см, заполненную октадецилсиликагелем, с размером частиц 5 мкм; спектрофотометрический (длина волны детектирования 265 нм) или диодно-матричный детектор с погрешностью измерений не более 10 % отн., регистрирующее устройство (самописец или интегратор), позволяющее проводить измерение площади (или высоты) пика с погрешностью не более 1 %; программное обеспечение для обработки полученных результатов измерений;
- фильтры для фильтрования подвижной фазы и анализируемых растворов (например, с размером пор 0,45 мкм);
- микрошприцы типа «Гамильтон» вместимостью 0,2 $см^3$ и 0,5 $см^3$ для ввода проб в жидкостный хроматограф;
- пипетки градуированные 1(2,3)-1(2)-1-0,5(1,2,5,10,25) по ГОСТ 29227 или дозаторы автоматические с аналогичными или изменяемыми объемами доз с относительной погрешностью дозирования не более ± 1 %;
- цилиндры 1-50(100,250)-1(2) по ГОСТ 1770;
- колбы мерные 2-50(100,250,500,1000)-2 по ГОСТ 1770;
- пробирки мерные с притертыми пробками П-2-5(10,15,20,25)-0,1(0,2)ХС по ГОСТ 1770;
- стаканы В(Н)-1-50(100,150,250)ТХС по ГОСТ 25336;
- колбы круглодонные К-1-100(250,500)-29/32ТС по ГОСТ 25336;
- воронки В-36(56)-80ХС, В-75-110(140)ХС, В-100-150ХС по ГОСТ 25336;
- линейка металлическая с ценой деления 1 мм по ГОСТ 427;
- встряхиватель для колб и пробирок с диапазоном частот колебаний платформ 100—150 колебаний в минуту;
- центрифуга, обеспечивающая 4—6 тыс. об/мин;
- баня водяная с регулятором нагрева, поддерживающая температуру от 30 °С до 100 °С;
- баня ультразвуковая лабораторная рабочим объемом не менее 2 $дм^3$;
- испаритель ротационный с диапазоном рабочего давления от 7 мм рт. ст. до 760 мм рт. ст. (от $9 \cdot 10^2$ Па до $10 \cdot 10^4$ Па) или насос водоструйный по ГОСТ 25336;
- холодильники стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336;
- термометр лабораторный жидкостный с диапазоном температур от 0 до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498;
- баллон с газообразным азотом по ГОСТ 9293, ос. ч. и [1];
- бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;
- плитка электрическая закрытого типа по ГОСТ 14919;
- мельница лабораторная электрическая;
- холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

7.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы и материалы:

- абсолютный этиловый спирт (C_2H_5OH) массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- ректификованный этиловый спирт (C_2H_5OH) массовой долей основного вещества не менее 96 % или по ГОСТ Р 51652, ГОСТ 18300;

- метиловый спирт (CH_3OH), массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- ацетонитрил (CH_3CN), массовой долей основного вещества не менее 99,8 %;
- метилен хлористый (CH_2Cl_2), массовой долей основного вещества не менее 99,8 %;
- н-гексан (C_6H_{14}), массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;
- этилацетат ($C_4H_8O_2$), массовой долей основного вещества не менее 99 % или по ГОСТ 8981;
- 2-пропанол (C_3H_8O), массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;
- тетрагидрофуран (C_4H_8O), массовой долей основного вещества не менее 99,5 %;
- петролейный эфир, перегнанный при температуре (50 ± 10) °С, очищенный от перекисей;
- диэтиловый эфир, очищенный от перекисей, содержащий 0,1 % пирогаллола по [2];
- калия гидроокись (КОН) по ГОСТ 24363, х. ч. или ч. д. а., раствор КОН массовой долей 50 %;
- натрий сернокислый (Na_2SO_4) безводный, массовой долей основного вещества не менее 99,5 % или по ГОСТ 4166, х. ч.;
- дистиллированную воду по ГОСТ 6709;
- кислоту аскорбиновую ($C_6H_8O_6$) по [3] или [4], х. ч.;
- гидрохинон ($C_6H_6O_2$), массовой долей основного вещества не менее 99 % или по ГОСТ 19627;
- пирогаллол ($C_6H_6O_3$), массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- бутилгидрокситолуол — БГТ ($C_{15}H_{24}O$), массовой долей основного вещества не менее 99 %, раствор БГТ в н-гексане массовой концентрацией 2 мг/см^3;
- эргокальциферол (витамин D_2), М ($C_{28}H_{44}O$) = 396,7 г/моль, массовой долей основного вещества не менее 98 %;
- холекальциферол (витамин D_3), М ($C_{27}H_{44}O$) = 384,6 г/моль, массовой долей основного вещества не менее 98 %.

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

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Приготовление растворов

8.1.1 Исходные растворы стандартов

8.1.1.1 Для приготовления исходного раствора витамина D_2 в мерную колбу объемом 100 см^3 помещают около 100 мг витамина D_2, растворяют в этиловом ректификованном спирте и доводят до метки спиртом. Этот раствор содержит около 1 мг/см^3 витамина D_2. Массовую концентрацию исходного раствора витамина D_2 уточняют по 8.1.2.1.

8.1.1.2 Для приготовления исходного раствора витамина D_3 в мерную колбу объемом 100 см^3 помещают около 100 мг витамина D_3, растворяют в этиловом ректификованном спирте и доводят до метки спиртом. Этот раствор содержит около 1 мг/см^3 витамина D_3. Массовую концентрацию исходного раствора витамина D_2 уточняют по 8.1.2.2.

Приготовленные растворы хранят в темноте при температуре не выше 4 °С.

8.1.2 Рабочие растворы стандартов

8.1.2.1 1 см^3 исходного раствора витамина D_2, приготовленного по 8.1.1.1, с помощью пипетки переносят в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят до метки этиловым ректификованным спиртом. Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа. Массовая концентрация рабочего раствора витамина D_2 составляет 10 мкг/см^3.

Измерение оптической плотности стандартного раствора витамина D_2 проводят в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при 265 нм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый ректификованный. Для расчета массовой концентрации раствора витамина D_2 (C_{D_2}, мкг/см^3) используют уравнение:

$$C_{D_2} = \frac{A_{265} \cdot 10^6}{100 \cdot 475}, \quad (1)$$

где A_{265} — значение оптической плотности рабочего раствора витамина D_2 при 265 нм;

475 — значение оптической плотности раствора витамина D_2 массовой концентрации 1 г в 100 см^3 при 265 нм в спирте этиловом при толщине поглощающего слоя 1 см ($E^{1\%}_{1\text{см}}$);

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

100 — коэффициент пересчета на 1 см^3.

8.1.2.2 1 см^3 исходного раствора витамина D_3, приготовленного по 8.1.1.2, с помощью пипетки переносят в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят до метки спиртом этиловым ректификованным. Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа. Массовая концентрация рабочего раствора витамина D_3 составляет 10 мкг/см^3.

Измерение оптической плотности стандартного раствора витамина D_3 проводят в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при 265 нм, используя в качестве раствора сравнения спирт этиловый ректификованный. Для расчета массовой концентрации раствора витамина D_3 (C_{D_3}, мкг/см^3) используют уравнение:

$$C_{D_3} = \frac{A_{265} \cdot 10^6}{100 \cdot 485}, \quad (2)$$

где A_{265} — значение оптической плотности рабочего раствора витамина D_3 при 265 нм;

485 — значение оптической плотности раствора витамина D_3 массовой концентрации 1 г в 100 см^3 при 265 нм в спирте этиловом при толщине поглощающего слоя 1 см ($E^{1\%}_{1\,см}$);

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

100 — коэффициент пересчета на 1 см^3.

8.1.2.3 Для приготовления рабочего раствора внутреннего стандарта витамина D_2 10 см^3 стандартного раствора витамина D_2 по 8.1.1.1 с помощью пипетки помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят до метки спиртом этиловым ректификованным. Раствор готовят непосредственно перед использованием. Массовая концентрация рабочего раствора витамина D_2 составляет 1 мкг/см^3.

8.1.2.4 Для приготовления рабочего раствора смеси витаминов D_2 и D_3, необходимого для проведения полупрепаративной НФ ВЭЖХ, помещают 5 см^3 рабочего раствора витамина D_2 по 8.1.2.1 и 5 см^3 рабочего раствора витамина D_3 по 8.1.2.2 в колбу роторного испарителя. Растворитель тщательно упаривают на водяной бане при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток перерастворяют в 50 см^3 н-гексана или подвижной фазы, используемой для проведения полупрепаративной НФ ВЭЖХ. Массовая концентрация витамина D_2 (D_3) в растворе составляет 1 мкг/см^3.

8.1.2.5 Из исходных растворов готовят не менее четырех рабочих растворов витамина D_3 в диапазоне концентраций 0,1—10,0 мкг/см^3, используемых для построения градуировочного графика по 8.4. Для этого 1,0 см^3 и 10,0 см^3 рабочего раствора витамина D_3 по 8.1.2.2 с помощью пипетки помещают в мерную колбу на 100 см^3 и растворы доводят до метки спиртом этиловым абсолютным (массовая концентрация полученных растворов витамина D_3 составляет 0,1 мкг/см^3 и 1,0 мкг/см^3), а также 0,5 см^3 и 1,0 см^3 исходного раствора витамина D_3 по 8.1.1.2 помещают в мерную колбу на 100 см^3 и растворы доводят до метки спиртом этиловым абсолютным (массовая концентрация полученных растворов витамина D_3 составляет 5,0 мкг/см^3 и 10,0 мкг/см^3).

8.2 Отбор и подготовка проб

8.2.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 26809, ГОСТ Р 52062, ГОСТ Р 52179.

8.2.2 Крупные частицы средней пробы, выделенной методом квартования из лабораторной пробы, измельчают с использованием подходящего оборудования (например, лабораторной мельницы) до такого состояния, чтобы весь продукт проходил через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Размолотую пробу тщательно перемешивают.

Анализируемые пробы гомогенизируют, избегая воздействия повышенной температуры.

8.2.3 Для омыления испытуемой пробы, содержащей менее 30 % жира, 5—20 г исследуемого материала помещают в плоскодонную колбу вместимостью 100—500 см^3, добавляют 90—100 см^3 этилового ректификованного спирта, 1 г аскорбиновой кислоты (или 1 г пирогаллола), 50 см^3 50 %-ного раствора гидроокиси калия. Перед омылением в колбу вносят соответствующее количество раствора внутреннего стандарта. Количество витамина D_2 должно быть близким к ожидаемому количеству витамина D_3 в анализируемом образце. Омыление проводят в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником (желательно в токе азота) при температуре 70 °С—80 °С.

При проведении щелочного гидролиза при комнатной температуре в течение не менее 16 ч используют вышеуказанные соотношения материала и реактивов.

8.2.4 Для омыления испытуемой пробы, содержащей более 30 % жира, в колбу для омыления вносят 5—20 г исследуемого материала, добавляют 90—100 см^3 спирта этилового, примерно 1 г аскорбиновой кислоты (или 1 г пирогаллола), 50 см^3 50 %-ного раствора гидроокиси калия. Перед омылением в колбу вносят соответствующее количество раствора внутреннего стандарта витамина D_2, количество которого должно быть близким к ожидаемому количеству витамина D_3 в анализируемом образце. Омыление проводят на водяной бане в течение 30—45 мин (желательно в токе азота) при температуре 95 °С—100 °С.

Рекомендуемое добавляемое количество внутреннего стандарта приведено в таблице 1.

Таблица 1 — Количество добавляемого внутреннего стандарта витамина D_2

Заявленное содержание витамина D_3, $млн^{-1}$	Навеска пробы, г	Количество вносимого раствора внутреннего стандарта, $см^3$
От 0,1 до 0,3 включ.	20	3
Св. 0,3 до 0,6 включ.	10	3
Св. 0,6 до 1,0 включ.	5	2

Если после омыления и охлаждения жир или масло остаются на поверхности омыляемой смеси, то вновь приливают 50 $см^3$ 50 %-ного раствора КОН и омыление повторяют.

После окончания гидролиза, проведенного по 8.2.3 (8.2.4), содержимое колбы быстро охлаждают до (20 ± 5) °С и количественно переносят в делительную воронку. Витамин D экстрагируют 100 $см^3$ н-гексана (этилацетата, петролейного или диэтилового эфира).

Для удаления воды экстракт фильтруют через фильтр с 2—5 г безводного сульфата натрия. Фильтр промывают 20 $см^3$ н-гексана, затем добавляют в фильтрат 1 $см^3$ раствора (2 $мг/см^3$) БГТ в н-гексане. Экстракт промывают 3—5 раз порциями воды по 50—100 $см^3$ до исчезновения щелочной реакции промывных вод (по универсальной индикаторной бумаге) и затем упаривают с помощью роторного испарителя при пониженном давлении и при температуре не выше 40 °С.

8.2.5 Для приготовления раствора исследуемого образца для анализа с помощью полупрепаративной НФ ВЭЖХ к сухому остатку после упаривания экстракта приливают 2 $см^3$ н-гексана (или другого растворителя или смеси растворителей, которые используются в качестве подвижной фазы в системе полупрепаративной ВЭЖХ).

8.2.6 Для выделения фракции, содержащей витамин D, 0,2—0,5 $см^3$ раствора по 8.2.5 элюируют в условиях полупрепаративной ВЭЖХ и собирают элюат, содержащий смесь витаминов D_2 и D_3 (в условиях НФ ВЭЖХ эти соединения элюируются одновременно), предварительно определив время удерживания этих соединений по 8.3. Время удерживания витамина D зависит от используемых подвижных и неподвижных фаз и обычно составляет 10—15 мин. Общее время хроматографического разделения составляет 25—30 мин.

8.2.7 Фракцию элюата, полученную по 8.2.6, упаривают на роторном испарителе при пониженном давлении и температуре не более 40 °С, и сухой остаток перерастворяют в 0,5 $см^3$ подвижной фазы для аналитической ОФ ВЭЖХ.

8.3 Подготовка жидкостных хроматографов

Подготовку жидкостных хроматографов к работе осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации оборудования. Перед началом работы колонки промывают элюентом.

Раствор смеси витаминов D_2 и D_3 по 8.1.2.4 несколько раз вводят в хроматограф для полупрепаративного анализа и проверяют повторяемость времени удерживания витамина D (в варианте НФ ВЭЖХ витамины D_2 и D_3 элюируются одновременно). Хроматографические условия оптимизируют для оптимального разделения пика витамина D от пиков токоферолов и других соединений матрицы.

Раствор смеси витаминов D_2 и D_3 по 8.1.2.6 несколько раз вводят в хроматограф для варианта аналитической ОФ ВЭЖХ и проверяют повторяемость полного разделения пиков витаминов D_2 и D_3 (степень разделения пиков должна быть не менее 1,0). Условия хроматографирования также должны обеспечивать оптимальное отделение пиков витаминов D_2 и D_3 от пиков других соединений матрицы.

8.4 Построение градуировочной зависимости

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

Градуировочный график строят в координатах «аналитический сигнал, mAU · с (AU · с) или мм» — «массовая концентрация витамина в градуировочном растворе, $мкг/см^3$». Для каждого анализируемого градуировочного раствора проводят два параллельных измерения и находят среднеарифметическое значение. Различие между измеренными значениями аналитических сигналов и времени удерживания не должно превышать 5 % средних значений. Линейные участки градуировочного графика должны соот-

ветствовать всему диапазону определяемых концентраций витамина D_3. Коэффициент градуировочного графика $k_{гр}$ определяют как среднеарифметическое значение коэффициентов k_i, вычисляемых по формуле

$$k_i = \frac{C_i}{S_i}, \quad (3)$$

где C_i — массовая концентрация микронутриентов в i-м градуировочном растворе, мкг/см^3;

S_i — площадь пика i-го градуировочного раствора, mAU · с (AU · с) или высота, мм.

Проводят хроматографический анализ не менее четырех рабочих стандартных растворов витамина D_3, приготовленных по 8.1.2.5.

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется значением достоверной аппроксимации $R^2 \geq 0{,}997$.

Градуировка проводится в следующих случаях: на этапе освоения метода, при изменении условий хроматографического анализа или при выявлении несоответствия метрологическим требованиям результатов оперативного контроля или внутреннего аудита.

9 Выполнение измерений

В колонку хроматографа для проведения аналитической ОФ ВЭЖХ последовательно вводят равные объемы испытуемого раствора по 8.2.7 и одного из градуировочных растворов по 8.1.2.5.

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 и оформление результатов

Поправочный коэффициент k рассчитывают с помощью метода внутреннего стандарта по формуле

$$k = \frac{S_{вн.ст} \cdot C_x}{S_x \cdot C_{вн.ст}}, \quad (4)$$

где $S_{вн.ст}$ — площадь (mAU · с или AU · с) или высота (мм) пика внутреннего стандарта витамина D_2;

S_x — площадь (mAU · с или AU · с) или высота (мм) пика определяемого витамина D_3;

$C_{вн.ст}$ — массовая концентрация внутреннего стандарта витамина D_2 по 8.1.2.3, мкг/см^3;

C_x — массовая концентрация определяемого витамина D_3, мкг/см^3.

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

$$X = k \cdot \frac{m_{вн.ст} \cdot S_x}{m_{пр} \cdot C_{вн.ст}}, \quad (5)$$

где $m_{вн.ст}$ — масса внутреннего стандарта (витамина D_2), добавленного к навеске пробы анализируемого образца, мг;

$m_{пр}$ — масса пробы, взятой для омыления, кг;

$S_{вн.ст}$ — площадь (mAU · с или AU · с) или высота (мм) пика внутреннего стандарта витамина D_2;

S_x — площадь (mAU · с или AU · с) или высота (мм) пика определяемого витамина D_3;

k — поправочный коэффициент, рассчитанный по формуле 4.

Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

Каждую пробу анализируют дважды, начиная со взятия навески испытуемой пробы. Расхождение между результатами двух параллельных измерений X_1, X_2 (в процентах от среднего значения $X_{ср}$), выполненными одним оператором с использованием идентичных реактивов и оборудования и в минимально возможный промежуток времени, не должно превышать норматива контроля сходимости r с доверительной вероятностью 95 %.

При соблюдении этого условия за окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение $X_{ср}$.

Границы относительной погрешности определения массовой доли витамина $D_3 \pm \delta$, в процентах от результата испытания, и при доверительной вероятности 95 % не должны превышать значений, указанных в таблице 2.

Результат определения витамина D_3 представляют в следующем виде:

$$X_{ср} \pm \Delta, \text{ млн}^{-1} \text{ при } P = 95\ \%, \quad (6)$$

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

Δ — значение границы абсолютной погрешности определений, млн$^{-1}$, рассчитанное по формуле

$$\Delta = \frac{\delta \cdot X_{ср}}{100}, \quad (7)$$

где δ — значение границы относительной погрешности измерений, % (таблица 2).

11 Метрологические характеристики метода

11.1 Повторяемость

Каждую пробу анализируют дважды, начиная со взятия навески испытуемой пробы. Расхождение между результатами двух параллельных измерений (X_1, X_2), выполненными одним оператором с использованием идентичных реактивов и оборудования и в минимально возможный промежуток времени считают удовлетворительным, если $|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r \cdot X_{ср}$, где $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение. Значение r (предел повторямости) приведено в таблице 2.

При превышении r испытание повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

11.2 Воспроизводимость

Пробу делят на две равные части. Расхождение между результатами двух определений (X_1, X_2), выполненными разными операторами в разное время с использованием различных реактивов и оборудования, считают удовлетворительным, если $|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot R \cdot X$, где X — среднеарифметическое значение. Значение R (предел воспроизводимости) приведено в таблице 2.

Таблица 2 — Основные метрологические характеристики метода

Метрологическая характеристика (P = 0,95)	Диапазон измерений, млн$^{-1}$	
	от 0,1 до 0,5 включ.	св. 0,5 до 1,0 включ.
Стандартное отклонение повторяемости s_r, %	8,8	7,1
Предел повторяемости r, %	25	20
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, %	10,6	8,8
Предел воспроизводимости R, %	30	25
Границы относительной погрешности ($\pm\ \delta$), %	25	20
Предел обнаружения, млн$^{-1}$	0,03	

При превышении R испытание повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

11.3 Контроль погрешности результатов испытаний

Контроль погрешности (точности) результатов испытаний проводят методом добавок. Пробу делят на две равные части. В одну из них добавляют стандарт витамина D_3 в количестве, составляющем 50 %—150 % от исходного содержания компонента в пробе, и проводят испытания в соответствии с настоящим стандартом.

Результаты испытаний признают удовлетворительными, если погрешность определения массовой доли витамина D_3 в добавке не превышает норматива оперативного контроля погрешности $K_{доб}$, млн$^{-1}$:

$$|X_{доб} - X_{ср} - c_{доб}| \le K_{доб}, \quad (8)$$

где $X_{доб}$ — среднеарифметическое значение результатов двух испытаний пробы с добавкой, млн$^{-1}$;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух испытаний пробы без внесения добавки, млн$^{-1}$;

$c_{доб}$ — массовая доля добавки, млн$^{-1}$.

При проведении внутрилабораторного контроля значение $K_{доб}$ рассчитывают (при доверительной вероятности 90 %) по формуле

$$K_{доб} = 0{,}84 \cdot \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + X_{ср}^2}, \quad (9)$$

где δ — значение границы относительной погрешности определения массовой доли витамина D_3, указанное в таблице 2.

При проведении межлабораторного контроля значение $K_{доб}$ рассчитывают (при доверительной вероятности 95 %) по формуле

$$K_{доб} = \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + X_{ср}^2}. \quad (10)$$

11.4 Контроль стабильности результатов при реализации методики в лаборатории

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6, используя метод контроля стабильности стандартного отклонения промежуточной прецизионности по ГОСТ Р ИСО 5725-6 (пункт 6.2.3) с применением контрольных карт Шухарта. Периодичность контроля и процедуры контроля стабильности результатов измерений должны быть предусмотрены в руководстве по качеству лаборатории в соответствии с ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025 (подраздел 4.2) и ГОСТ Р 8.563 (пункт 7.1.1).

Библиография

[1] ПВ 10-115—96 Правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением
[2] ГФ СССР X, ст. 34 Эфир медицинский
[3] ГФ СССР X, ст. 6 Кислота аскорбиновая (витамин С)
[4] ФС 42-2668—95 Кислота аскорбиновая (витамин С)

УДК 664.001.4:006.354 ОКС 67.050 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: продукты пищевые функциональные, витамин D_3, холекальциферол, определение содержания, высокоэффективная жидкостная хроматография

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *Ю.М. Прокофьева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 10.12.2012. Подписано в печать 30.01.2013. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,35. Тираж 225 экз. Зак. 96.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru