ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 54635— 2011

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Метод определения витамина А

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

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. № 784-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 2
6 Условия выполнения испытания 3
7 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 3
8 Подготовка к выполнению измерений 5
9 Выполнение измерений 7
10 Обработка и оформление результатов 7
11 Метрологические характеристики метода 8
Библиография 10

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Метод определения витамина А

Functional food products.
Method of vitamin A determination

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на функциональные пищевые продукты и устанавливает метод определения массовой доли витамина А в виде ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ).

Диапазон измерений массовой доли витамина А составляет от 0,5 до 10,0 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 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

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 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

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

Издание официальное

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 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 А:** Массовая доля ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола, определенная в соответствии с настоящим стандартом и выраженная в миллионных долях ($млн^{-1}$).

4 Сущность метода

Определение витамина А в экстракте, полученном из анализируемой пробы, проводят разделением методом ВЭЖХ с последующим фотометрическим или флуориметрическим детектированием. При необходимости экстракт получают после щелочного гидролиза анализируемой пробы.

Количественный анализ проводят методом внешнего стандарта с использованием площади или высоты пиков ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола.

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 следует проводить 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, с опытом 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.

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

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

6.2 Условия фотометрических измерений

Условия фотометрических измерений приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Условия фотометрических измерений

Витамин А	Растворитель	Длина волны, нм	Удельный коэффициент поглощения $E^{1\,\%}_{1\,см}$
Ретинол	Этанол	325	1832
Ретинола ацетат	Этанол	328	1550
Ретинола пальмитат	2-пропанол	328	975

6.3 Условия хроматографического анализа

Температура хроматографической колонки: 25 °С или температура окружающей среды.

Скорость потока подвижной фазы: 0,7 $см^3$/мин (ориентировочное значение).

Объем вводимой пробы: $50 \cdot 10^{-3}$ $см^3$.

Подвижная фаза: смесь ацетонитрила, метилового спирта, метилена хлористого в объемном соотношении 50:45:5.

Проверку оптимальности условий хроматографического разделения осуществляют путем хроматографического анализа смешанного раствора ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола с массовой концентрацией каждого вещества не менее 0,4 мкг/$см^3$. Данный смешанный раствор готовят из основных растворов ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола по аналогии с методикой приготовления рабочих растворов по 8.1.2. Эффективность хроматографического разделения признается удовлетворительной, если коэффициент разделения соседних пиков ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола составляет не менее 1,3. В противном случае для достижения требуемой эффективности разделения экспериментальным путем подбирают скорость потока подвижной фазы или проводят испытания других колонок.

7 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

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

- весы по ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность взвешивания с пределами допускаемой абсолютной погрешности ± 0,1 мг;
- спектрофотометр со спектральным диапазоном работы от 190 до 1100 нм, основной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %;
- кюветы кварцевые с длиной оптического пути 1 см;

- хроматограф высокоэффективный жидкостный, включающий следующие элементы: насос; устройство для ввода проб; флуориметрический детектор (длины волн, нм: возбуждения — 325 нм, эмиссии — 470 нм) или спектрофотометрический детектор (длина волны детектирования — 325 нм) с уровнем шумов не более 10^{-4} единиц оптической плотности и относительной погрешностью измерений не более 10 %; колонку аналитическую для ВЭЖХ диаметром 0,30—0,46 см, длиной 10—25 см, заполненную октадецилсиликагелем с размером частиц 5 мкм; регистрирующее устройство — интегратор или самописец, позволяющий 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);

- микрошприц типа «Гамильтон» вместимостью 0,1 $см^3$ 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 40 ° 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 диапазоном температур от 0 °С до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498;

- баллон с газообразным азотом по ГОСТ 9293, ос. ч., и по [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:

- спирт этиловый абсолютный (C_2H_5OH) массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;

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

- спирт метиловый (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 %;

- этилацетан ($C_4H_8O_2$) массовой долей основного вещества не менее 99 % или по ГОСТ 8981;

- пропанол-2 (C_3H_8O) массовой долей основного вещества не менее 99 %;

- эфир петролейный, перегнанный при температуре (50 ± 10) °С, очищенный от перекисей;

- эфир диэтиловый, 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.;

- воду дистиллированную 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 ($C_{15}H_{24}O$) массовой долей основного вещества не менее 99 %;

- ретинол M ($C_{20}H_{30}O$) = 286,5 г/моль, массовой долей основного вещества не менее 90 %;

- ретинола ацетат M ($C_{22}H_{32}O_2$) = 328,5 г/моль, массовой долей основного вещества не менее 90 % или по [5];

- ретинола пальмитат M ($C_{36}H_{60}O_2$) = 524,9 г/моль, массовой долей основного вещества не менее 90 % или по [6].

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

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Приготовление растворов

8.1.1 Основные стандартные растворы

Растворяют около 50 мг ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) в 50 см^3 абсолютного этилового спирта. Массовая концентрация ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) в растворе составляет примерно 1,0 мг/см^3. Далее 2 см^3 раствора ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) с помощью пипетки помещают в мерную колбу объемом 50 см^3 и доводят до метки спиртом этиловым абсолютным. Массовая концентрация соединений в полученных основных стандартных растворах составляет примерно 40 мкг/см^3.

8.1.2 Градуировочные растворы

Из основных стандартных растворов готовят не менее четырех градуировочных растворов ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) в диапазоне массовых концентраций 0,4—4,0 мкг/см^3 путем точного разведения основных стандартных растворов спиртом этиловым абсолютным в мерной колбе вместимостью 50 см^3.

Определение массовой концентрации ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата), c (мкг/см^3) проводят после измерения оптической плотности градуировочных растворов в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см на спектрофотометре при оптимальной длине волны и вычисляют по формуле

$$c = \frac{A \cdot 10^4}{E^{1\%}_{1\,см}} \cdot K, \qquad (1)$$

где A — значение оптической плотности градуировочного раствора;

$E^{1\%}_{1\,см}$ — значение оптической плотности градуировочного раствора в абсолютном этиловом спирте или 2-пропаноле массовой концентрации 1 г в 100 см^3 при толщине поглощающего слоя 1 см, приведенное в таблице 1;

10^4 — коэффициент пересчета;

K — коэффициент, учитывающий поглощение сопутствующих компонентов при измерении A, вычисляемый по формуле

$$K = \frac{S_{ст}}{S_{общ}}, \qquad (2)$$

где $S_{ст}$ — площадь пика стандартного вещества при проведении ВЭЖХ анализа, mAU·с (AU·с);

$S_{общ}$ — сумма площадей пиков сопутствующих компонентов при проведении ВЭЖХ анализа стандартного вещества, mAU·с (AU·с).

Все растворы в ходе приготовления и анализа тщательно защищают от воздействия ультрафиолетового излучения. Растворы ретинола хранят при температуре ниже 4 °С в течение 2 мес. Свежеприготовленные растворы ретинола ацетата или ретинола пальмитата используют для измерений в течение 2—3 ч при комнатной температуре.

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 Пищевые продукты на масложировой основе с массовой долей воды 1 % и менее, обогащенные ацетатом ретинола или пальмитатом ретинола

2—5 г анализируемой пробы переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3, растворяют в 10—15 см^3 н-гексана, используя ультразвуковую баню для ускорения растворения. Раствор доводят до

метки н-гексаном. При необходимости раствор можно использовать для последующего разведения н-гексаном. Затем аликвоту гексанового раствора упаривают в токе азота и сухой остаток перерастворяют в элюенте.

8.2.4 Пищевые продукты на масложировой основе с массовой долей воды не более 20 %, обогащенные ацетатом ретинола или пальмитатом ретинола

2—5 г анализируемой пробы растворяют при интенсивном перемешивании в 10—15 $см^3$ н-гексана, используя ультразвуковую баню для ускорения растворения. Удаляют избыток воды добавлением безводного сульфата натрия. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр для отделения нерастворившегося осадка. Колбу промывают дважды 5 $см^3$ н-гексана. Фильтраты собирают в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$. Раствор доводят до метки н-гексаном. Затем аликвоту гексанового раствора упаривают в токе азота и сухой остаток перерастворяют в элюенте.

8.2.5 Другие пищевые продукты, обогащенные ацетатом ретинола или пальмитатом ретинола

Для проведения щелочного гидролиза 1—30 г анализируемой пробы сухого или жидкого материала помещают в круглодонную колбу вместимостью 100—500 $см^3$. К сухому материалу добавляют 5—20 $см^3$ воды и нагревают на водяной бане при температуре 60 °С—70°С при перемешивании в течение 5 мин. Затем прибавляют 50—150 $см^3$ этилового ректификованного спирта (или метилового спирта), 0,2—1,0 г антиоксиданта (аскорбиновой кислоты, гидрохинона, бутилгидрокситолуола), 4—40 $см^3$ 50 %-ного раствора гидроокиси калия и нагревают в течение 15—45 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре 80 °С—100 °С.

Рекомендуемые соотношения испытуемого материала и реактивов приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Рекомендуемые соотношения испытуемого материала и реактивов

Массовая доля витамина А, $млн^{-1}$	Навеска испытуемого материала, г	Объем этанола, $см^3$	Объем 50 %-ного раствора КОН, $см^3$
От 0,1—1,0 включ.	15—30	100	40
Св. 1,0—5,0 включ.	5—15	60	20
Св. 5,0—10,0 включ.	1—5	30	4

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

Если после охлаждения на поверхности смеси остается слой масла или жира, то объем добавленного раствора КОН и время проведения щелочного гидролиза увеличивают.

После окончания гидролиза содержимое колбы быстро охлаждают до (20 ± 5) °С и количественно переносят в делительную воронку. Колбу ополаскивают водой, объем которой равен объему добавленного этилового спирта (или метилового), и воду сливают в ту же воронку. Витамин А экстрагируют диэтиловым (или петролейным) эфиром, н-гексаном, н-гексаном с добавкой диэтилового (или петролейного) эфира в объемном соотношении 1:1 в течение двух минут. Для учета возможной неполной экстракции витамина А следует использовать метод добавок стандартов.

Экстракцию повторяют три-четыре раза порциями экстрагента 50—100 $см^3$. Объединенный экстракт отмывают от щелочи три-четыре раза порциями воды 50—150 $см^3$ до исчезновения щелочной реакции промывных вод (по универсальной индикаторной бумаге).

Для удаления воды экстракт фильтруют через фильтр с 2—5 г безводного сульфата натрия. Далее экстракт упаривают досуха, используя роторный испаритель при температуре не выше 50 °С и затем перерастворяют в элюенте. При необходимости раствор можно использовать для последующего разведения.

Раствор, полученный по 8.2.3 (8.2.4, 8.2.5), анализируют методом ВЭЖХ. Массу анализируемой пробы и объем растворителя подбирают таким образом, чтобы концентрация определяемых веществ в анализируемом растворе находилась в диапазоне от 0,4 до 4,0 $мкг/см^3$.

8.3 Подготовка жидкостного хроматографа

Подготовку жидкостного хроматографа к работе осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации оборудования. Перед началом работы колонку промывают элюентом.

8.4 Построение градуировочной зависимости

Процедуры построения градуировочной зависимости выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования. Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов, приготовленных по 8.1.2.

Градуировочный график строят в координатах «аналитический сигнал» — «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 значениями времени удерживания не должно превышать 5 % от средних значений. Линейные участки градуировочного графика должны соответствовать всему диапазону определяемых массовых концентраций витамина А.

Коэффициент градуировочного графика $k_{гр}$, мкг/см^3/(mAU · с) или мкг/см^3/(AU · с) определяют как среднеарифметическое значение коэффициентов k_i, вычисляемых по формуле

$$k_i = \frac{C_i}{S_i}, \tag{3}$$

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

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

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 последовательно вводят равные объемы испытуемого и градуировочного растворов. В качестве градуировочного выбирают раствор, высота пика которого наименее отличается от высоты пика испытуемого раствора. Концентрацию витамина А ($C_{гр}$) в растворе, используемом для градуировки, уточняют в день его использования по 8.1.2.

Для идентификации пиков сопоставляют время удерживания ретинола (или ретинола ацетата или ретинола пальмитата) испытуемого раствора и раствора стандарта, а также добавляют к испытуемому раствору раствор стандарта с близким содержанием витамина А.

10 Обработка и оформление результатов

Массовую долю витамина А X, млн$^{-1}$, вычисляют по формулам:

$$X = \frac{k_{гр} \cdot S_{обр} \cdot V}{m}, \tag{4}$$

где $k_{гр}$ — коэффициент градуировочного графика по 8.4;

$S_{обр}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений площади (высоты) пика анализируемого компонента для двух параллельных хроматографических анализов испытуемого раствора, mAU · с (AU · с) или высота пика, мм;

V — объем разведения, см^3;

m — масса анализируемой пробы, г.

С использованием градуировочного раствора

$$X = \frac{C_{гр} \cdot S_{обр} \cdot V}{S_{гр} \cdot m}, \tag{5}$$

где $C_{гр}$ — массовая концентрация градуировочного раствора, мкг/см^3;

V — объем разведения, см^3;

$S_{обр}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений площади (высоты) пика анализируемого компонента для двух параллельных хроматографических анализов испытуемого раствора, mAU · с (AU · с) или высота пика, мм;

m — масса анализируемой пробы, г;

$S_{гр}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений площади (высоты) пика анализируемого компонента для двух параллельных хроматографических анализов градуировочного раствора, mAU · с (AU · с) или высота пика, мм.

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

При анализе каждой пробы выполняют два параллельных определения, 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 r (предел повторяемости приведен в таблице 3) с доверительной вероятностью P = 95 %.

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

Границы относительной погрешности определения массовой доли витамина А ($\pm\ \delta$), в процентах от результата испытания, и при доверительной вероятности 95 % не должны превышать значений, указанных в таблице 3.

Результат определения витамина А 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$^{-1}$, вычисляемое по формуле

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

Результаты испытаний заносят в протокол, в котором указывают:

- ссылку на настоящий стандарт;
- вид, происхождение и название пробы;
- способ и дату отбора пробы;
- дату поступления и испытания пробы;
- результаты исследования;
- причины отклонений в процедуре определения от установленных условий.

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, r — предел повторяемости (расхождение между двумя параллельными определениями, выполненными в условиях повторяемости). Значение r приведено в таблице 3.

При превышении предела повторяемости (сходимости) 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), выполненных разными операторами в разное время с использованием различных реактивов и оборудования, считают удовлетворительным, если $|X_1 - X_2| \le 0{,}01R \cdot X$, где X — среднеарифметическое значение, R — предел воспроизводимости (расхождение между двумя определениями, выполненными в условиях воспроизводимости). Значение R приведено в таблице 3.

Таблица 3 — Метрологические характеристики

Метрологическая характеристика (P = 0,95)	Диапазон измерений массовой доли, млн$^{-1}$	
	От 0,5 до 5,0 включ.	Св. 5,0 до 10,0 включ.
Стандартное отклонение повторяемости s_r, %	5,4	4,3
Предел повторяемости r, %	15	12
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, %	8,9	7,1
Предел воспроизводимости R, %	25	20
Границы относительной погрешности ($\pm$ δ), %	20	15
Предел обнаружения, млн$^{-1}$	0,1	

При превышении предела воспроизводимости 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 А 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 А в добавке не превышает норматива 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 $K_{доб}$ вычисляют (при доверительной вероятности 90 %) по формуле

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

где δ — значение границы относительной погрешности определения массовой доли витамина А, указанное в таблице 3.

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

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

11.4 Контроль стабильности результатов измерений 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)
[5] ГФ СССР X, ст. 578 Ретинола ацетат
[6] ФС 42-2229—84 Ретинола пальмитат

УДК 664.001.4:006.354 ОКС 67.050 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: продукты пищевые функциональные, витамин А, ретинол, ретинола ацетат, ретинола пальмитат, определение содержания, высокоэффективная жидкостная хроматография

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

Сдано в набор 04.12.2012. Подписано в печать 23.01.2013. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,25. Тираж 205 экз. Зак. 74.

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