ГОСТ Р 52147—2003

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БЕЛКОВО-ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫЕ И АМИДО-ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫЕ ДОБАВКИ

Методы определения содержания ретинола-ацетата (витамина А), эргокальциферола (холекальциферола) (витамина D), токоферола-ацетата (витамина Е)

Издание официальное

БЗ 8—2002/157

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Всероссийским научно-исследовательским и технологическим институтом птицеводства (ВНИТИП);

Всероссийским научно-исследовательским институтом кормов им. В.Р. Вильямса (ВНИИК)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 4 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 3 декабря 2003 г. № 342-ст

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 2004

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки. 1
3 Определения 2
4 Диапазоны измерений содержания витаминов и характеристики погрешности измерений . . . 2
5 Требования техники безопасности 2
6 Подготовка проб к испытанию 3
7 Определение содержания ретинола-ацетата (витамина А) и токоферола-ацетата (витамина Е) фотометрическим методом 3
8 Определение содержания ретинола-ацетата (витамина А), эргокальциферола (холекальциферола) (витамина D), токоферола-ацетата (витамина Е) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) 8
9 Контроль точности испытаний 11
Приложение А Хроматограммы экстрактов витаминов А, D, Е 13
Приложение Б Библиография 14

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БЕЛКОВО-ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫЕ И АМИДО-ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫЕ ДОБАВКИ

Методы определения содержания ретинола-ацетата (витамина А), эргокальциферола (холекальциферола) (витамина D), токоферола-ацетата (витамина Е)

Protein-vitamin-mineral and amide-vitamin-mineral additives.
Methods for the determination of retinol-acetate (vitamin A), argocalciferol (holecalciferol) (vitamin D), tokoferol-acetate (vitamin E)

Дата введения 2005—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на белково-витаминно-минеральные и амидо-витаминно-минеральные добавки и устанавливает хроматографические методы определения ретинола-ацетата (витамина А), эргокальциферола (холекальциферола) (витамина D), токоферола-ацетата (витамина Е)

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

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

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

ГОСТ 12.1.018—93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

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

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4147—74 Железо (III) хлорид 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4166—76 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 9147—80 Посуда и оборудование фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9736—91 Приборы электрические прямого преобразования для измерения неэлектрических величин. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0—80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

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

ГОСТ 19627—74 Гидрохинон (парадиоксибензол). Технические условия

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 24363—80 Калия гидроокись. Технические условия

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

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

Издание официальное

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

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

3 Определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями.

3.1 **Содержание витамина А:** Содержание ретинола-ацетата, определенное в соответствии с настоящим стандартом и выраженное в международных единицах в 1 кг испытуемой пробы (МЕ/кг). 1 МЕ витамина А соответствует 0,344 мкг ретинола-ацетата.

3.2 **Содержание витамина Е:** Содержание токоферола-ацетата, определенное в соответствии с настоящим стандартом и выраженное в миллиграммах в 1 кг (мг/кг) испытуемой пробы.

3.3 **Содержание витамина D:** Содержание эргокальциферола (витамина D_2) или холекальциферола (витамина D_3), определенное в соответствии с настоящим стандартом и выраженное в международных единицах в 1 кг испытуемой пробы (МЕ/кг). 1 МЕ витамина D соответствует 0,025 мкг эргокальциферола (холекальциферола).

4 Диапазоны измерений содержания витаминов и характеристики погрешности измерений

Диапазоны измерений содержания витаминов и характеристики погрешности измерений приведены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование витамина и его единица измерения	Вид хроматографии	Диапазон измерений содержания витамина	Границы относительной погрешности, %, (δ) $P = 0,95$
Витамин А, тыс. МЕ/кг	Колоночная	От 5,0 до 50 включ. Св. 50 » 100 » » 100 » 300 »	± 25 ± 20 ± 15
	ВЭЖ	От 5,0 до 100 включ. Св. 100 » 300 »	± 20 ± 15
Витамин Е, мк/кг	Колоночная	От 10 до 500 включ. Св. 500 » 1000 »	± 20 ± 15
	ВЭЖ	От 10 до 100 включ. Св. 100 » 1000 »	± 20 ± 15
Витамин D, тыс. МЕ/кг	ВЭЖ	От 5,0 до 20 включ. Св. 20 » 50 »	± 20 ± 15

5 Требования техники безопасности

5.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и ГОСТ 12.1.018 и электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на фотоэлектроколориметр, спектрофотометр и хроматограф.

5.2 Помещение, в котором проводят измерения, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией. Работу необходимо проводить в вытяжном шкафу.

5.3 При работе с газовыми баллонами необходимо руководствоваться НД [1].

6 Подготовка проб к испытанию

6.1 Отбор проб — по ГОСТ 13496.0.

6.2 Измельчение пробы

6.2.1 Оборудование:

мельница лабораторная электрическая, обеспечивающая измельчение пробы до прохода остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм;

сито с отверстиями диаметром 1 мм.

6.2.2 Из средней пробы исследуемого продукта методом квартования выделяют часть пробы массой не менее 100 г и измельчают на лабораторной мельнице до такого состояния, чтобы весь продукт проходил через сито с отверстиями диаметром 1 мм без остатка. Размолотую пробу тщательно перемешивают.

7 Определение содержания ретинола-ацетата (витамина А) и токоферола-ацетата (витамина Е) фотометрическим методом

Сущность метода заключается в омылении образца водно-спиртовым раствором гидроокиси калия, экстракции витаминов диэтиловым эфиром, разделении витаминов хроматографией на колонке с окисью алюминия и количественном определении витаминов фотометрическим методом.

7.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Спектрофотометр типа СФ-26, СФ-46 со спектральным диапазоном работы 186—1100 нм, основной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %, градуировкой длин волн в ультрафиолетовой (УФ) области — не более 0,1 нм.

Фотоэлектроколориметр с пределом измерений оптической плотности от 0 до 2, основной погрешностью измерений не более 1 % и светофильтром длиной волны $\lambda = (520 \pm 25)$ нм.

Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

Баллон с азотом рабочим давлением от 40 до 60 кг/см^2 (от 4 до 6 МПа) [1].

Испаритель ротационный диапазоном измерения рабочего давления от 7 до 760 мм рт. ст. (от $9 \cdot 10^2$ до $10 \cdot 10^4$ Па) или насос водоструйный по ГОСТ 25336.

Баня водяная с регулятором нагрева.

Термометр жидкостный по ГОСТ 28498.

Печь муфельная электрическая, обеспечивающая поддержание температуры от 0 до 800 °С с погрешностью ± 10 °С по ГОСТ 9736.

Секундомер [2].

Чашки выпарительные фарфоровые диаметром 123 мм по ГОСТ 9147.

Щипцы для тиглей муфельные.

Лампа ультрафиолетовая со светофильтрами $\lambda = 260—350$ нм.

Шкаф сушильный, обеспечивающий поддержание температуры от 0 °С до 110 °С с погрешностью ± 2 °С [3].

Холодильники стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336.

Колбы конические со шлифом $К_н$-1-100(250)-24/29 по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 1(2)-50(100, 200)-2 по ГОСТ 1770.

Воронки делительные вместимостью 250, 500 см^3 по ГОСТ 25336.

Цилиндры мерные 1(2, 2а, 3, 4, 4а)-25(100, 250)-2 по ГОСТ 1770.

Воронки для фильтрования ВФ-1-56(75)ХС по ГОСТ 25336.

Пипетки с одной отметкой 1-2-0,5(1,2) по ГОСТ 29169.

Пипетки градуированные 1(2, 3, 5)-1(1а, 2, 2а)-2-0,5(1, 2, 5) по ГОСТ 29227.

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

Склянки из темного стекла.

Колбы с тубусом вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 25336.

Колбы круглодонные К-1-100(250)-14/23(19/26) по ГОСТ 25336.

Колонки стеклянные для хроматографии размером 10 × 200 мм.

Эксикатор по ГОСТ 25336, заправленный хлористым кальцием, прокаленным при температуре 250—300 °С в течение 2 ч.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026 или фильтры [4].

Вата обезжиренная, готовят по ГОСТ 4517.

Палочки деревянные.

Витамин Е фармакопейный [5].

Спирт этиловый абсолютированный [6] или приготовленный по ГОСТ 4517.

Железо хлорное, раствор массовой долей около 0,2 % в абсолютированном этиловом спирте.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363, раствор массовой долей 50 %.

Натрий сернокислый по ГОСТ 4166, безводный.

Алюминия окись, безводная [7].

Эфир петролейный, фракция (40—70) °С, не содержащая ненасыщенные и ароматические углеводороды.

Эфир диэтиловый фармакопейный, не содержащий пероксидные соединения (испытание на отсутствие пероксидных соединений — по ГОСТ 4517).

Пирогаллол или гидрохинон по ГОСТ 19627.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.

о-фенантролин или α, α′-дипиридил, раствор массовой долей около 0,5 % в абсолютированном этиловом спирте.

Кислота аскорбиновая [8].

Фенолфталеин [9], спиртовый раствор массовой долей 1 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

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

7.2 Подготовка к испытанию

7.2.1 Приготовление раствора хлорного железа массовой долей около 0,2 % в абсолютированном спирте.

Навеску реактива массой 0,2 г растворяют в 99,8 см^3 абсолютированного этилового спирта.

Раствор хранят в холодильнике в склянке из темного стекла не более 7 сут.

7.2.2 Приготовление раствора *о*-фенантролина или α, α′-дипиридила массовой долей около 0,5 % в абсолютированном этиловом спирте

Навеску реактива массой 0,500 г растворяют в 99,5 см^3 абсолютированного этилового спирта.

Раствор хранят в холодильнике в склянке из темного стекла не более 7 сут.

7.2.3 Приготовление безводного сернокислого натрия

Реактив высушивают в сушильном шкафу при температуре (105 ± 2) °С в течение 3 ч, хранят в склянке с притертой пробкой.

7.2.4 Приготовление окиси алюминия

Реактив прокаливают в муфельной печи при температуре (400 ± 10) °С в течение 4 ч, охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе. К 97 г реактива добавляют 3 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

После отстаивания в течение не менее 3 ч реактив годен к использованию.

Реактив хранят в склянке с притертой пробкой.

7.2.5 Приготовление раствора α-токоферола массовой концентрации 1 мг/см^3

Навеску токоферола-ацетата массой 0,1120 г в расчете на содержание чистого вещества помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см^3 добавляют от 100 до 200 мг аскорбиновой кислоты, 50 см^3 этилового спирта и 10 см^3 раствора гидроокиси калия массовой долей 50 %. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают в водяной бане при температуре (85 ± 2) °С в течение 25 мин. Затем содержимое колбы быстро охлаждают под струей водопроводной воды до комнатной температуры, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, приливают по 50 см^3 дистиллированной воды и диэтилового эфира, встряхивают и отстаивают до разделения слоев.

После расслаивания нижний водно-спиртовый слой сливают в коническую колбу, а эфирный слой оставляют в делительной воронке. В коническую колбу приливают 50 см^3 диэтилового эфира, встряхивают, отстаивают и после расслаивания верхний эфирный слой присоединяют к эфирному экстракту в делительной воронке, а к водно-спиртовому слою в конической колбе снова приливают 50 см^3 диэтилового эфира и проводят экстракцию, как было указано выше. После расслаивания эфирный слой из конической колбы снова присоединяют к экстракту в делительной воронке.

Объединенные эфирные экстракты промывают дистиллированной водой порциями по 30 $см^3$ до исчезновения розовой окраски промывных вод по реакции с фенолфталеином. Промытый экстракт переносят в коническую колбу вместимостью 250 $см^3$, пропуская его через бумажный фильтр и слой безводного сернокислого натрия (10—15 г). После окончания фильтрации сернокислый натрий три раза промывают порциями (по 20—30 $см^3$) диэтилового эфира. Эфир отгоняют в водяной бане при температуре не выше 50 °С в токе азота или под вакуумом, используя водоструйный насос или роторный испаритель.

К сухому остатку приливают 10—15 $см^3$ абсолютированного этилового спирта, количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем в колбе до метки этим же спиртом и тщательно перемешивают.

7.2.6 Приготовление раствора α-токоферола массовой концентрации 20 мкг/$см^3$

1 $см^3$ раствора α-токоферола массовой концентрации 1 мг/$см^3$ переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, доводят объем в колбе абсолютированным спиртом до метки и тщательно перемешивают.

В полученном растворе проверяют массовую концентрацию α-токоферола и его чистоту, снимая спектр в пределах 260—310 нм на спектрофотометре в кювете толщиной поглощающего свет слоя 1 см относительно абсолютированного этилового спирта. Чистый α-токоферол имеет симметричный пик максимумом поглощения при длине волны 292 нм.

Массовую концентрацию α-токоферола в растворе C_E, мкг/$см^3$, вычисляют по формуле

$$C_E = \frac{D\,10^6}{E^{1\,\%}_{1\,см}\,100}, \qquad (1)$$

где D — оптическая плотность раствора при длине волны 292 нм;

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

$E^{1\,\%}_{1\,см}$ — оптическая плотность раствора α-токоферола в абсолютированном этиловом спирте массовой концентрации 1 г в 100 $см^3$ при длине волны 292 нм и толщине поглощающего свет слоя 1 см (для α-токоферола $E^{1\,\%}_{1\,см} = 75$).

7.2.7 Построение градуировочного графика для определения токоферола-ацетата (витамина Е)

В пять мерных пробирок вместимостью по 5 $см^3$ приливают 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 и 4,0 $см^3$ раствора α-токоферола массовой концентрации 20 мкг/$см^3$. В первые четыре пробирки добавляют 3,5; 3,0; 2,0 и 1,0 $см^3$ абсолютированного этилового спирта. Затем в пробирки добавляют по 0,5 $см^3$ раствора *о*-фенантролина и по 0,5 $см^3$ раствора хлорного железа, перемешивают. Ставят опытную пробу в темное место на 5 мин для развития окраски. По истечении времени измеряют оптические плотности испытуемых растворов в порядке возрастания их концентрации на фотоэлектроколориметре в кювете толщиной поглощающего свет слоя 10 мм при длине волны (520 ± 25) нм относительно абсолютированного этилового спирта. Одновременно проводят контрольное испытание на реактивы без внесения α-токоферола.

По полученным данным строят градуировочный график, откладывая на оси ординат значения разности оптической плотности испытуемых растворов и контрольного раствора, на оси абсцисс — содержание α-токоферола, мкг/5 $см^3$ (10, 20, 40, 60 и 80 мкг/5 $см^3$)

7.2.8 Приготовление элюирующих растворов

7.2.8.1 Приготовление раствора I

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 6 $см^3$ диэтилового эфира и объем жидкости в колбе доводят до метки петролейным эфиром, перемешивают.

7.2.8.2 Приготовление раствора II

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 12 $см^3$ диэтилового эфира и объем жидкости в колбе доводят до метки петролейным эфиром, перемешивают.

7.2.8.3 Приготовление раствора III

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 30 $см^3$ диэтилового эфира и объем жидкости в колбе доводят до метки петролейным эфиром, перемешивают.

7.3 Проведение испытаний

Из-за высокой чувствительности витаминов к ультрафиолетовому свету и воздуху все процедуры, связанные с анализом, следует завершить в течение одного рабочего дня, избегая воздействия натурального и интенсивного флуоресцентного света.

7.3.1 Омыление и экстракция

Навеску исследуемого продукта массой 4,00—5,00 г помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см^3, приливают 50 см^3 этилового спирта, 10 см^3 раствора гидроокиси калия массовой долей 50 % и добавляют 40—50 мг пирогаллола или гидрохинона (на кончике скальпеля).

Колбу соединяют с обратным холодильником, помещают в водяную баню и нагревают при температуре (85 ± 2) °С в течение 25 мин, периодически перемешивая содержимое колбы. После этого содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры.

Затем в колбу приливают 20—25 см^3 дистиллированной воды, 50 см^3 диэтилового эфира, перемешивают, жидкую часть сливают в делительную воронку вместимостью 500 см^3, сохраняя осадок в колбе. Экстракцию витаминов диэтиловым эфиром проводят трижды по 7.2.5.

При образовании устойчивой эмульсии в делительную воронку добавляют 20 см^3 этилового спирта.

В объединенный эфирный экстракт добавляют несколько кристаллов бутилокситолуола и промывают его дистиллированной водой порциями по 100 см^3 до исчезновения розовой окраски промывных вод по реакции с фенолфталеином. Затем экстракт переносят в круглодонную колбу, пропуская его через бумажный фильтр со слоем безводного сернокислого натрия (30—50 г). Делительную воронку и фильтрующий материал промывают 40 см^3 диэтилового эфира. Эфир выпаривают досуха в водяной бане при температуре не выше 50 °С в токе азота или под вакуумом на ротационном испарителе. Сухой остаток растворяют в 4 см^3 петролейного эфира.

Примечание — Допускается для экстракции применять петролейный эфир.

7.3.2 Подготовка хроматографической колонки

В нижнюю часть колонки помещают кусочек ваты, затем активированную окись алюминия, уплотняя ее постукиванием по колонке деревянной палочкой до высоты сорбента 7 см. Сверху помещают слой безводного сернокислого натрия высотой 1 см.

В колбу с тубусом вставляют резиновую пробку, через сквозное отверстие которой проходит утонченный конец хроматографической колонки. Через колонку при вакууме, создаваемом с помощью водоструйного насоса, пропускают петролейный эфир до полного смачивания слоя окиси алюминия (около 15 см^3).

Промывание колонки проводят со скоростью одна капля в секунду, не допуская при этом высыхания верха колонки и просасывания воздуха.

7.3.3 Хроматографическое разделение ретинола и α-токоферола

4 см^3 раствора экстракта испытуемого продукта, полученного по 7.3.1, помещают в колонку, подготовленную по 7.3.2, не допуская высыхания верха колонки. Промывают колонку 15 см^3 элюирующего раствора I. Эту фракцию отбрасывают.

α-токоферол элюируют от 15 до 25 см^3 раствора II, контролируя продвижение витамина в УФ свете (α-токоферол имеет голубоватое свечение).

Элюат количественно переносят в коническую колбу вместимостью 50 см^3.

К колонке присоединяют другую колбу с тубусом и элюируют ретинол 30—35 см^3 раствора III, также контролируя продвижение витамина в УФ-свете (ретинол имеет желто-зеленое свечение). Элюат количественно переносят в коническую колбу вместимостью 50 см^3 и выпаривают досуха в водяной бане при температуре не выше 50 °С в токе азота или под вакуумом.

Сухой остаток растворяют в 5—50 см^3 абсолютированного этилового спирта в зависимости от предполагаемого содержания витамина А.

7.3.4 Оптическую плотность полученного раствора ретинола измеряют на спектрофотометре при длине волны 326 нм в кювете толщиной поглощающего свет слоя 10 мм относительно абсолютированного этилового спирта.

7.3.5 Проведение цветной реакции с раствором α-токоферола

Собранный и перенесенный в коническую колбу элюат α-токоферола выпаривают досуха на водяной бане при температуре не выше 50 °С в токе азота или под вакуумом. Остаток растворяют в 10 см^3 абсолютированного этилового спирта. Ориентируясь на рецептуру добавки, берут 0,2—3,5 см^3 раствора и переносят в кювету толщиной поглощающего свет слоя 10 мм или в мерную пробирку вместимостью 5 см^3, добавляют соответственно от 3,8 до 0,5 см^3 абсолютированного этилового спирта, 0,5 см^3 раствора *о*-фенантролина и 0,5 см^3 раствора хлорного железа. Опытную пробу ставят в темное место на 5 мин для развития окраски. По истечении времени измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны (520 ± 25) нм относительно абсолютированного этилового спирта.

Одновременно проводят контрольное испытание на реактивы без внесения α-токоферола.

7.4 Обработка и оформление результатов

7.4.1 Содержание ретинола-ацетата X, МЕ/кг, в испытуемой пробе вычисляют по формуле

$$X = \frac{18{,}3\ V\ D\ 10^3 \cdot 1{,}15}{m}, \qquad (2)$$

где 18,3 — массовая концентрация раствора ретинола в абсолютированном этиловом спирте, имеющего оптическую плотность, равную 1, при длине волны 326 нм и толщине поглощающего свет слоя 1 см, МЕ/см^3;

V — объем элюата (5—50), см^3;

D — оптическая плотность раствора;

10^3 — коэффициент пересчета граммов в килограммы;

m — масса навески, г;

1,15 — коэффициент пересчета ретинола в ретинол-ацетат.

7.4.2 Содержание токоферола-ацетата X, мг/кг, в испытуемой пробе вычисляют по формуле

$$X = \frac{K\ V\ 10^3\ 1{,}1}{m\ V_1\ 10^3}, \qquad (3)$$

где K — масса α-токоферола, найденная по градуировочному графику, мкг;

V — объем раствора элюата (10), см^3;

10^3 — коэффициенты пересчета микрограммов в миллиграммы и граммов в килограммы;

1,1 — коэффициент пересчета α-токоферола в ацетатную форму;

m — масса навески, г;

V_1 — объем раствора, взятый для проведения цветной реакции (0,2—3,5), см^3.

7.4.3 Результат вычисляют до третьей значащей цифры и округляют до двух значащих цифр.

7.4.4 При анализе каждой пробы выполняют два параллельных определения, начиная со взятия навески испытуемой пробы. Если расхождение между результатами параллельных определений не превышает допустимое $|X_1 - X_2| \le 0{,}01\ dX$, где X_1, X_2 и X — результат первого и второго параллельных определений и их среднеарифметическое значение соответственно, то среднеарифметическое значение принимают за результат анализа. В противном случае анализ повторяют.

Если расхождения между параллельными определениями вновь превышают регламентируемые допуски, выясняют и устраняют причины плохой сходимости результатов анализа.

Значения d приведены в таблице 2.

Таблица 2

Наименование витамина и единица измерения	Вид хроматографии	Диапазон измерений массовой доли витамина	Значение норматива контроля, %, $P = 0{,}95$	
			сходимости d, $n = 2$	воспроизводимости D, $m = 2$
Витамин А, тыс. МЕ/кг	Колоночная	От 5,0 до 50 включ.	20	35
		Св. 50 » 100 »	15	25
		» 100 » 300 »	10	20
	ВЭЖ	От 5,0 до 100 включ.	15	25
		Св. 100 » 300 »	10	20
Витамин Е, мг/кг	Колоночная	От 10 до 100 включ.	15	30
		Св. 100 » 500 »	10	25
		» 500 » 1000 »	10	20
	ВЭЖ	От 10 до 100 включ.	12	28
		Св. 100 » 1000 »	8	20
Витамин D, тыс. МЕ/кг	ВЭЖ	От 5,0 до 20 включ.	20	30
		Св. 20 » 50 »	12	22

По полученному результату анализа и значению относительной погрешности (таблица 1) рассчитывают абсолютную погрешность Δ по формуле

$$\Delta = 0{,}01\delta X.$$

Результат анализа представляют в виде $(X \pm \Delta)$ МЕ/кг или $(X \pm \Delta)$ мг/кг при $P = 0{,}95$.

8 Определение содержания ретинола-ацетата (витамина А), эргокальциферола (холекальциферола) (витамина D), токоферола-ацетата (витамина Е) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Сущность метода заключается в омылении образца водно-спиртовым раствором гидроокиси калия, экстракции витаминов диэтиловым эфиром с последующим определением витаминов на жидкостном хроматографе.

При содержании витамина D в испытуемом продукте менее 10 МЕ/г перед проведением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) необходима очистка экстракта на колонке с окисью алюминия по 8.3.2. Анализ проводят из отдельно взятой навески массой 10 г.

8.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по 7.1 со следующим дополнением.

Хроматограф жидкостный «Милихром» с УФ-детектором со спектральным диапазоном 190—360 нм, обеспечивающий одновременное измерение на не менее 3 длинах волн с уровнем шумов не более 10^{-4} единиц оптической плотности (е. о. п.).

Колонка аналитическая хроматографическая для ВЭЖХ, размером 80 (64, 120) × 2 мм, заполненная сорбентом Силасорб 600 (размер частиц 5 мкм) с эффективностью не ниже 5000 теоретических тарелок.

Прибор для перегонки при атмосферном давлении [10].

Ретинол-ацетат (витамин А) фармакопейный [11].

Эргокальциферол кристаллический (витамин D_2) [12] или холекальциферол кристаллический (витамин D_3) [13].

Спирт изопропиловый [14].

Гексан [15].

Алюминия окись для хроматографии [16].

2,6-Ди-трет-бутил-п-крезол (бутиолокситолуол) [17].

Примечание — Допускается применение других типов хроматографов, сорбентов и соответствующих им растворителей, обеспечивающих эффективное разделение исследуемых компонентов. При этом условия разделения витаминов подбираются самостоятельно каждым пользователем.

8.2 Подготовка к испытанию

8.2.1 Приготовление элюирующего раствора

Готовят смесь гексана с изопропиловым спиртом в объемном соотношении 98,5:1,5 (98:2)

8.2.2 Очистка изопропилового спирта

Изопропиловый спирт перегоняют над гидроокисью калия или натрия (10 г гидроокиси требуется для перегонки 1 $дм^3$ спирта).

Реактив должен иметь оптическую плотность не более 0,1 е. о. п. при λ = 320 — 350 нм относительно дистиллированной воды.

8.2.3 Приготовление окиси алюминия

Реактив прокаливают в муфельной печи при температуре (750 ± 10) °С в течение 4 ч, охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе. К 91 г реактива добавляют 9 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают и хранят в посуде с притертой пробкой.

Годен для использования после отстаивания в течение 3 ч.

8.2.4 Приготовление безводного сернокислого натрия по 7.2.3

8.2.5 Приготовление растворов ретинола

8.2.5.1 Приготовление раствора ретинола массовой концентрации 1000 МЕ/$см^3$.

Навеску ретинола-ацетата, соответствующую 50 000 МЕ препарата, помещают в колбу со

шлифом вместимостью 250 см^3, добавляют около 200 мг пирогаллола или гидрохинона (на кончике скальпеля), 30 см^3 этилового спирта и 5 см^3 раствора гидроокиси калия массовой долей 50 %. Колбу соединяют с обратным холодильником и проводят омыление в водяной бане при температуре (85 ± 2) °С в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры под струей водопроводной воды и добавляют 15 см^3 дистиллированной воды. Затем содержимое колбы переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, промывают колбу 20 см^3 этилового спирта, который тоже переносят в делительную воронку. Добавляют 30 см^3 смеси диэтилового эфира и гексана в объемном соотношении 1:1, полученную смесь тщательно перемешивают. После расслаивания нижний слой (водно-спиртовый) сливают в коническую колбу, а гексано-эфирный оставляют в делительной воронке. Эту операцию экстракции ретинола гексано-эфирной смесью из водно-спиртового слоя в конической колбе проводят еще дважды по 7.2.5, каждый раз сливая в делительную воронку гексано-эфирный слой. Объединенный экстракт в делительной воронке промывают дистиллированной водой порциями по 30 см^3 до исчезновения розовой окраски промывных вод по реакции с раствором фенолфталеина. Промытый экстракт переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3, пропуская его через бумажный фильтр и слой безводного сернокислого натрия (40—50 г). Делительную воронку и фильтрующий материал промывают дважды порциями гексано-эфирной смеси (20—30 см^3). Экстракт выпаривают досуха в водяной бане при температуре не выше 60 °С в токе азота или под вакуумом на ротационном испарителе. Сухой остаток растворяют в гексане, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3, добавляют 100 мг бутилокситолуола, перемешивают, объем раствора в колбе доводят гексаном до метки и снова тщательно перемешивают.

8.2.5.2 Приготовление градуировочных растворов ретинола массовой концентрации 20, 100 и 500 МЕ/см^3

В три мерные колбы вместимостью по 50 см^3 помещают 1; 5 и 25 см^3 раствора ретинола массовой концентрации 1000 МЕ/см^3, доводят объемы растворов в колбах до метки гексаном и тщательно перемешивают.

Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 326 нм в кювете толщиной поглощающего свет слоя 1 см относительно гексана.

Массовую концентрацию ретинола в растворе C_A, МЕ/см^3 вычисляют по формуле

$$C_A = \frac{D\,10^6}{E\,{}^{1\%}_{1\,\text{см}}\,100 \cdot 0{,}3}, \qquad (4)$$

где D — оптическая плотность раствора ретинола;

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

$E\,{}^{1\%}_{1\,\text{см}}$ — оптическая плотность раствора ретинола в гексане массовой концентрации 1 г в 100 см^3 при длине волны 326 нм и толщине поглощающего свет слоя 1 см (для ретинола $E\,{}^{1\%}_{1\,\text{см}} = 1830$);

0,3 — коэффициент пересчета массы ретинола в МЕ, мкг/МЕ.

8.2.6 Приготовление растворов α-токоферола

8.2.6.1 Приготовление раствора α-токоферола массовой концентрации 1000 мкг/см^3

Навеску витамина Е массой 0,1120 г в расчете на содержание чистого вещества помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см^3 и проводят омыление, экстракцию и обезвоживание по 7.2.5.

После выпаривания сухой остаток растворяют в 100 см^3 гексана.

8.2.6.2 Приготовление градуировочных растворов α-токоферола массовой концентрации 20, 100 и 500 мкг/см^3

В три мерные колбы вместимостью 50 см^3 помещают 1; 5 и 25 см^3 раствора α-токоферола массовой концентрации 1000 мкг/см^3, доводят объем раствора в колбах до метки гексаном и тщательно перемешивают.

Массовые концентрации α-токоферола в растворах проверяют спектрофотометрически по 7.2.6 и вычисляют по формуле 1.

8.2.7 Приготовление растворов витамина D

8.2.7.1 Приготовление раствора витамина D массовой концентрации 20 000 МЕ/см^3

Навеску кристаллического эргокальциферола (холекальциферола) массой 0,100 г помещают в мерную колбу вместимостью 200 см^3, растворяют в гексане, объем раствора в колбе доводят до метки гексаном и тщательно перемешивают.

8.2.7.2 Приготовление градуировочных растворов витамина D массовой концентрации 50 и 100 МЕ/см^3

В две мерные колбы вместимостью 200 см^3 помещают 0,5 и 1,0 см^3 раствора витамина D массовой концентрации 20 000 МЕ/см^3. Объемы растворов в колбах доводят до метки гексаном и тщательно перемешивают.

Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 265 нм в кювете толщиной поглощающего свет слоя 1 см относительно гексана.

Массовую концентрацию витамина D в растворе C_D, МЕ/см^3, вычисляют по формуле

$$C_D = \frac{D\,10^6}{E\,|\,^{\%}_{см}\,100 \cdot 0{,}025}, \qquad (5)$$

где D — оптическая плотность раствора витамина D;

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

$E\,|\,^{\%}_{см}$ — оптическая плотность раствора витамина D в гексане массовой концентрации 1 г в 100 см^3 раствора при длине волны 265 нм и толщине поглощающего свет слоя 1 см (для витамина D_2 $E\,|\,^{\%}_{см} = 465$; для витамина D_3 $E\,|\,^{\%}_{см} = 500$);

0,025 — коэффициент пересчета массы витамина D в МЕ, мкг/МЕ.

8.2.8 В растворы витаминов добавляют несколько кристаллов 2,6-ди-трет-бутил-п-крезола (бутиолокситолуола) и хранят в холодильнике не более 1 мес.

8.3 Проведение испытания

8.3.1 Омыление и экстракция

Навеску исследуемого продукта массой 5,00—10,00 г помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см^3, добавляют 100—150 мг пирогаллола или гидрохинона (на кончике скальпеля) и соответственно 50—70 см^3 этилового спирта и 10—15 см^3 раствора гидроокиси калия массовой долей 50 %. Дальнейшую процедуру омыления и экстракции проводят по 7.3.1. Сухой остаток витаминов растворяют в 4 см^3 гексана.

Примечание — Допускается для экстракции применять петролейный эфир.

8.3.2 Очистка раствора, полученного по 8.3.1, на колонке с окисью алюминия

8.3.2.1 Подготовка хроматографической колонки — по 7.3.2.

8.3.2.2 Элюирование витамина D

В колонку (8.3.2.1), не допуская высыхания верха колонки, вносят 4 см^3 раствора (8.3.1) и промывают ее 20 см^3 петролейного эфира и 4 см^3 смеси петролейного и диэтилового эфира в объемном соотношении 1:1. Эту фракцию отбрасывают.

Витамин D элюируют 20 см^3 смеси петролейного и диэтилового эфира в объемном соотношении 1:1. Элюат количественно переносят в коническую колбу вместимостью 50 см^3 и выпаривают досуха в водяной бане под током азота при температуре (60 ± 2) °С.

Сухой остаток растворяют в 1 см^3 гексана.

Полученный раствор (далее испытуемый раствор) используют для ВЭЖХ.

8.3.3 Подготовка жидкостного хроматографа к работе

Подготовку прибора осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Перед началом работы колонку промывают элюентом при скорости его подачи 100—200 мкдм^3/мин в течение 5—10 мин.

8.3.4 Выполнение измерений на хроматографе «Милихром»

8.3.4.1 Условия проведения измерений

Измерения проводят в следующих условиях:

а) разделение компонентов проводят на колонке размером 64 (80, 120) × 2 мм;

б) сорбент — Силосорб 600;

в) элюент — гексан-изопропиловый спирт в объемном соотношении 98,5:1,5 (98:2);

г) рабочие длины волн УФ-детектора — 264, 292 и 324 нм (соответственно для витаминов D, E, A);

д) скорость элюирования — 150 — 200 мкдм^3/мин;

е) объем анализируемого раствора — 10—40 мкдм^3 для витамина D и 4—5 мкдм^3 для витаминов A, E.

8.3.4.2 Проведение измерений испытуемого раствора

Для измерений используют метод внешнего стандарта. 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.

Концентрация градуировочных растворов должна уточняться в день их использования по 8.2.5.2, 8.2.6.2 и 8.2.7.2.

Пик витамина на хроматограмме испытуемого раствора идентифицируют по времени удерживания.

Примеры хроматограмм экстрактов витаминов А, D, Е из белково-витаминно-минеральных добавок представлены в приложении А.

8.4 Обработка результатов

8.4.1 Содержание витаминов X, витамина А — МЕ/кг, витамина Е — мг/кг, в испытуемой пробе вычисляют по формуле

$$X = \frac{c\, h_{обр}\, V\, 10^3 \cdot \alpha}{h_{гр}\, m}, \qquad (6)$$

где c — концентрация используемых градуировочных растворов, МЕ/см^3 (ретинол), мг/см^3 (α-токоферол);

$h_{обр}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений высоты (площади) пика испытуемого раствора для двух параллельных определений анализируемого компонента, мм или е. о. п.,

V — объем разведения, см^3 (4 см^3);

10^3 — коэффициент пересчета граммов в килограммы;

α — коэффициент пересчета в ацетатную форму (для витамина А α = 1,15, для витамина Е α = 1,1);

$h_{гр}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений высоты (площади) пика градуировочного раствора для двух параллельных определений анализируемого компонента, мм или е. о. п.,

m — масса навески испытуемой пробы, г.

Примечание — При расчете содержания витамина А высоты (площади) пиков испытуемого и градуировочного растворов рассчитывают как сумму высот (площадей) *цис-* и *транс*-формы ретинола.

8.4.2 Содержание витамина D X, МЕ/кг, в испытуемой пробе вычисляют по формуле

$$X = \frac{c\, h_{обр}\, V\, 10^3\, 1{,}15}{h_{гр}\, m}, \qquad (7)$$

где c — концентрация используемого градуировочного раствора, МЕ/см^3;

$h_{обр}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений высоты (площади) пика испытуемого раствора для двух параллельных анализов, мм или е. о. п.;

V — объем разведения, см^3 (4 см^3);

10^3 — коэффициент пересчета граммов в килограммы;

1,15 — коэффициент, учитывающий превращение витамина D в провитамин;

$h_{гр}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений высоты (площади) пика градуировочного раствора для двух параллельных анализов, мм или с. о. п;

m — масса навески испытуемой пробы, г.

При определении витамина D, если в качестве градуировочного вещества используют эргокальциферол (витамин D_2), то числитель в формуле дополнительно умножают на коэффициент 0,97.

8.4.3 Результаты вычисляют до третьей значащей цифры и округляют до двух значащих цифр.

8.4.4 Контроль сходимости результатов параллельных определений и представление результатов по 7.4.4.

9 Контроль точности испытаний

9.1 Контроль сходимости результатов параллельных определений — по 7.4.4.

9.2 Для контроля воспроизводимости используют рабочие пробы. Каждую пробу делят на две равные части и анализируют в соответствии с методикой настоящего стандарта, получают два результата испытаний в разных лабораториях или в одной, но выполненные разными исполнителями

на разном оборудовании с использованием реактивов разных партий в разное время. Воспроизводимость считают удовлетворительной, если $|\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \le 0{,}01D\overline{\overline{X}}$, где $\overline{X}_1$, $\overline{X}_2$ и $\overline{\overline{X}}$ — результаты испытаний одной и той же пробы, полученные в двух разных лабораториях или в разных условиях в одной лаборатории, и их среднеарифметическое значение. Значение D приведено в таблице 2.

9.3 Контроль точности выполняют методом добавок. Рабочую пробу делят на две равные части, первую из которых анализируют в соответствии с методикой, а во вторую вводят известную добавку витамина и затем анализируют в соответствии с методикой настоящего стандарта. Значение добавки должно составлять 50 % — 150 % содержания витамина в испытуемой пробе. Точность контрольных испытаний признают удовлетворительной, если $|\overline{X}_д - \overline{X} - C| \le K$, где $\overline{X}_д$, $\overline{X}$ и C — результаты контрольных испытаний пробы с добавкой, без добавки и значение добавки. Значение норматива K для вероятности $P = 0{,}90$ вычисляют по формуле

$$K = 0{,}84\sqrt{\Delta_X^2 + \Delta_{X_д}^2}\,, \qquad (8)$$

где Δ_X и $\Delta_{X_д}$ — значения погрешности результатов анализа пробы без добавки и пробы с добавкой, вычисленные по 7.4.4.

Пример — Проведен анализ пробы с добавкой ($X_д = 40$ МЕ/кг) и без добавки ($X = 30$ МЕ/кг) на содержание витамина А. Значение добавки составляет $C = 20$ МЕ/кг, значение относительной погрешности $\delta = 25$ %. Результат контрольного анализа равен:

$$(X_д - X - C) = 40 - 30 - 20 = 10.$$

Норматив контроля точности находят по формуле

$$K = 0{,}84\sqrt{(0{,}01 \cdot 25 \cdot 40)^2 + (0{,}01 \cdot 25 \cdot 30)^2} = 10{,}5$$

Анализ выполнен с достаточной точностью, так как результат контрольного анализа меньше норматива контроля точности ($10 < 10{,}5$).

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Хроматограммы экстрактов витаминов А, D, Е

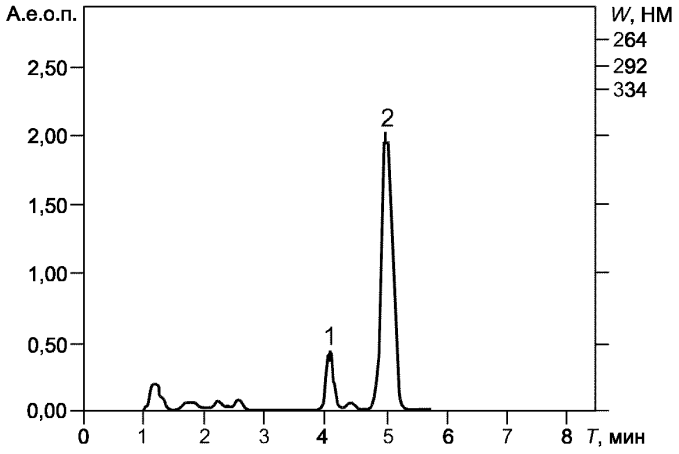

Рисунок А.1 — Хроматограмма экстракта витамина А: 1 — цис-форма, 2 — транс-форма

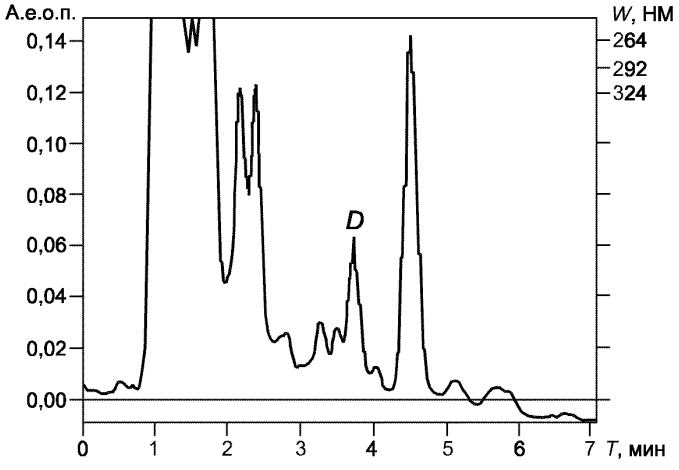

Рисунок А.2 — Хроматограмма экстракта витамина D

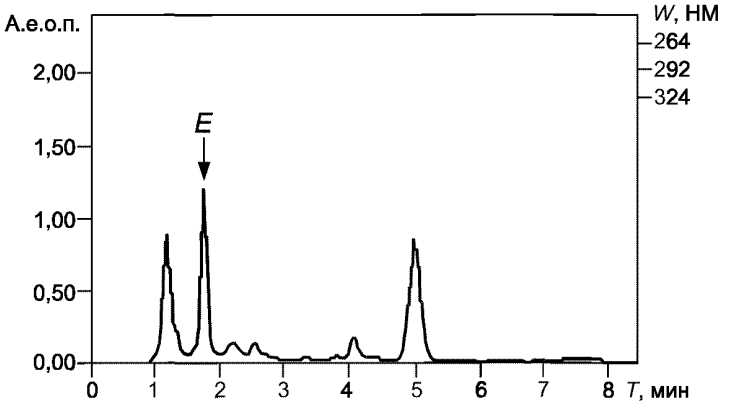

Рисунок А.3 — Хроматограмма экстракта витамина Е

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Библиография

[1] ПВ 10-115—96 Правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением
[2] ТУ 25-1819.0021—90 Секундомеры механические «Слава»
[3] ТУ 64-1.1411—76 Шкаф сушильный
[4] ТУ 6-09-1678—86 Фильтры обеззоленные (белая, красная, синяя ленты)
[5] ГФ СССР—X ст. 695 Токоферола-ацетат
[6] ТУ 84-11-99—89 Этиловый абсолютированный спирт
[7] МРТУ 6-09-426—70 Алюминия окись безводная
[8] ГФ СССР-X ст. 6 Кислота аскорбиновая
[9] ТУ 6-09-53-60—87 Фенолфталеин (индикатор)
[10] Воскресенский П.И. Техника лабораторных работ. Химия, М., 1969, стр. 490
[11] ГФ СССР-X ст. 579 Раствор ретинола-ацетата в масле 3,44 %
[12] ФС 42-1764—96 Эргокальциферол кристаллический
[13] ФС 421046299 Витамин D_3 1 000 000 МЕ/г субстанция (производитель «Хоффманн — Ля Рош», Швейцария
[14] ТУ 6.09-402—87 2-пропанол (изопропиловый спирт химически чистый)
[15] ТУ 6-09-3375—78 Гексан
[16] ТУ 6-09-3916—85 Окись алюминия для хроматографии
[17] ТУ 6.09-10-9954—74 2,6-Ди-трет-бутил-п-крезол

УДК 636.087:543.06:006.354 ОКС 65.120 С19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: белково-витаминно-минеральные добавки, амидо-витаминно-минеральные добавки, фотоэлектроколориметр, оптическая плотность, градуировочный график, рабочие растворы, светофильтр, фотометрический метод, высокоэффективная жидкостная хроматография, концентрация, витамины

Редактор *Т.П. Шашина*
Технический редактор *Л.А. Гусева*
Корректор *В.И. Кануркина*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Сдано в набор 26.12.2003. Подписано в печать 21.01.2004. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд.л. 1,65.
Тираж 390 экз. С 285. Зак. 20.

ИПК Издательство стандартов, 107076 Москва, Колодезный пер., 14.
gost.e-ecolog.ru e-mail: gost.e-ecolog.ru
Набрано в Издательстве на ПЭВМ
Отпечатано в филиале ИПК Издательство стандартов — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.
Плр № 080102

gost.e-ecolog.ru