ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов A, D, E

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН МТК 4, АООТ «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (АООТ «ВНИИКП»)

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 29 июля 1996 г. № 487

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4 ПЕРЕИЗДАНИЕ

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов A, D, E

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

Дата введения 1997—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на премиксы и устанавливает хроматографические методы определения витаминов A, D, E в премиксах с различными наполнителями из одной навески.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 4166—76 Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 5962—67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9412—93 Марля медицинская. Технические условия

ГОСТ 13496.0—80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19627—74 Гидрохинон (парадиоксибензол). Технические условия

ГОСТ 24104—88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 24363—80 Калия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 26573.0—85 Премиксы. Технические условия

ГОСТ 29169—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

3 Определение витаминов A, E обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией

Сущность метода заключается в экстракции витаминов A (ретинола ацетат) E (α-токоферола ацетат) из премикса изопропиловым спиртом и последующем анализе содержания витаминов с использованием жидкостного хроматографа «Милихром».

Издание официальное

3.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром» по нормативному документу [1] или его последующие модификации со спектрофотометрическим детектором и спектральным диапазоном 190—360 нм.

Спектрофотометр со спектральным диапазоном работы 186—1100 нм.

Колонка хроматографическая одного из указанных размеров: 2×64, 2×80, 2×120 мм с числом теоретических тарелок не менее 4 тыс., заполненная одним из следующих сорбентов: Силасорб С 18, Силасорб РНС 18, Сепарон С 18.

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Насос водоструйный по ГОСТ 25336.

Баня водяная с терморегулятором.

Колбы конические со шлифом вместимостью 25, 50 $см^3$, КН-2-25-18МХС по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-1-(1, 2)-1 по ГОСТ 29169.

Пипетки 1-1-1(2)-1(10) по ГОСТ 29227.

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

Колбы мерные 2-25-1(2) (исполнения 2, вместимостью 25 $см^3$, 1-го или 2-го класса точности) по ГОСТ 1770.

Колбы мерные 2-50-1(2) по ГОСТ 1770.

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

Холодильник ХПТ-1-100-18 ХС по ГОСТ 25336.

Ретинол ацетат по нормативному документу [11].

Витамин Е-ацетат по нормативному документу [12].

Спирт изопропиловый (пропанол-2), х. ч. по нормативному документу [2].

Спирт пропиловый (пропанол-1), х. ч. по нормативному документу [3].

Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, х. ч. по нормативному документу [4].

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

3.2 Порядок подготовки к проведению контроля

3.2.1 Отбор проб — по ГОСТ 13496.0

3.2.2 *Приготовление элюента для хроматографии*

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

Приготовленную смесь растворителей фильтруют через стеклянный фильтр и помещают в стеклянный сосуд с притертой пробкой. Полученный раствор можно хранить в течение 1 мес.

3.2.3 *Подготовка хроматографической колонки*

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

После промывки колонки проводят ее насыщение витаминами А, Е, для этого выполняют 7—10 анализов наиболее концентрированных градуировочных растворов витаминов А, Е. Насыщение колонки прекращают, когда отношение разности между двумя последовательными определениями концентрации витамина А(Е) к среднему арифметическому значению этих операций не превышает 3%.

При правильной эксплуатации колонка выдерживает 500—600 анализов.

3.2.4 *Приготовление растворителя для экстракции витаминов А, Е из премикса*

Для экстракции витаминов используют двухкомпонентный экстрагент состава: изопропиловый спирт и дистиллированную воду в объемном соотношении 97:3. Для этого в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят пипеткой 30 $см^3$ дистиллированной воды и доводят до метки изопропиловым спиртом.

Хранят в стеклянной емкости с притертой пробкой до полного использования экстрагента.

3.2.5 *Определение активности витамина А в масляном препарате*

(0,1±0,002) г препарата растворяют в абсолютном спирте в мерной колбе вместимостью 50 см^3. Доводят этим же спиртом объем раствора в колбе до метки и перемешивают. Отбирают 1—2 см^3 полученного раствора в колбу вместимостью 50 см^3, заполняют ее до метки абсолютным спиртом и измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 326 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве контрольного раствора применяют абсолютный спирт.

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

$$X = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot d}{m \cdot V \cdot 100 \cdot 1550},$$

где D — оптическая плотность раствора;

V_1, V_2 — первое и второе разведения, см^3;

d — плотность препарата, г/см^3;

m — масса навески препарата, г;

V — объем раствора, используемый для второго разведения, см^3;

1550 — удельный показатель поглощения $E^{1\%}_{1см}$ при длине волны 326 нм для 100%-ного раствора витамина А в абсолютном спирте;

100 — коэффициент.

Содержание витамина А в 1 см^3 соответственно должно быть 0,0310 — 0,0378 г (90000 — 110000 МЕ), 0,0619 — 0,0757 г (180000 — 220000 МЕ), 0,0774 — 0,0946 г (225000 — 275000 МЕ).

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

3.2.6 *Построение градуировочного графика для витамина А*

Для приготовления стандартного раствора взвешивают навеску масляного препарата витамина А, необходимую для получения раствора с активностью 30000 МЕ в 50 см^3 или 600 МЕ/см^3. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, растворяют в изопропиловом спирте, перемешивают и доводят этим спиртом до метки.

Раствор хранят в холодильнике в емкости с притертой пробкой и используют в течение одной недели.

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

Срок годности растворов не более 1 мес при хранении в холодильнике в емкости с притертой пробкой при температуре 4—10°С.

Полученные рабочие растворы анализируют на жидкостном хроматографе «Милихром» при следующих условиях:

хроматографическая колонка 2×64 (2×80), (2×120) мм;

сорбент — Силасорб C_{18}, Силасорб $SPHC_{18}$, Сепарон C_{18};

трехкомпонентный элюент на основе ацетонитрила;

объем пробы — 6 мкдм^3;

длина волны — 328 нм;

постоянная времени — 0,2 с;

скорость подачи элюента — 150 мкдм^3/мин.

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

Каждый раствор хроматографируют 2 раза. После выхода пика колонку промывают, прокачивая через нее 100—200 мкдм^3 элюента до выхода на нулевую линию.

Значения средних высот хроматографических пиков, выраженных в единицах оптической плотности (е.о.п.), откладывают по оси ординат градуировочного графика, а по оси абсцисс — значения активности витамина А в 25 см^3 раствора.

Градуировочный график строят также, откладывая по оси ординат средние высоты хроматографических пиков, выраженные в миллиметрах.

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

$$K = \frac{\sum_{i=1}^{n} K_i}{n},$$

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

n — количество точек, по которым строится градуировочная кривая.

Значение коэффициента наклона K_i, МЕ/е.о.п или МЕ/мм, вычисляют по формуле

$$K_i = \frac{C_i}{h_i},$$

где C_i — содержание витамина А в соответствующем i-м градуировочном растворе, МЕ;

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

3.2.7 *Построение градуировочного графика для витамина Е*

0,02 г витамина Е-ацетата стандарта растворяют в изопропиловом спирте в колбе вместимостью 50 $см^3$, доводят спиртом до метки и перемешивают. Получают основной раствор витамина Е с концентрацией 0,4 $мг/см^3$.

Из полученного основного раствора готовят рабочие растворы, содержащие 7, 5, 3, 1, 0,5, 0,1 и 0,05 мг витамина Е в 25 $см^3$ раствора. Для этого соответственно 17,5; 12,5; 7,5; 2,5; 2,25; 1,25; 0,25; 0,125 $см^3$ основного раствора помещают в мерные колбы вместимостью 25 $см^3$ и объем доводят до метки изопропиловым спиртом. Рабочие растворы анализируют на жидкостном хроматографе при следующих условиях:

хроматографическая колонка 2×64 мм (2×80 мм), (2×120 мм);

сорбент — Силасорб $С_{18}$, Силасорб $SPHC_{18}$, Сепарон $С_{18}$;

трехкомпонентный элюент на основе ацетонитрила;

объем пробы — 6 $мкдм^3$;

длина волны — 286 нм;

скорость подачи элюента — 100 $мкдм^3/мин$;

постоянная времени —0,2 с.

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

Каждый раствор хроматографируют 2 раза. После выхода пика колонку промывают, прокачивая через нее 200—250 $мкдм^3$ элюента до выхода на нулевую линию.

Значение средних высот хроматографических пиков (в единицах оптической плотности или миллиметрах) откладывают по оси ординат градуировочного графика, а по оси абсцисс — значение активности витамина Е в миллиграммах в 25 $см^3$ раствора.

Построение градуировочного графика можно заменить расчетом коэффициента наклона K по 3.2.6.

3.2.8 *Проверка градуировочных графиков*

Градуировочные графики контролируют не реже 1 раза в неделю. Для этого 1—2 рабочих растворов витаминов А, Е следует хроматографировать по 3.2.6 и 3.2.7.

Отклонение полученных результатов (высота пика, выраженная в единицах оптической плотности или миллиметрах) от измеренных в момент построения градуировочного графика a, %, определяют по формуле

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

где h_1 и h_2 — высота хроматографического пика, определенная при построении градуировочного графика и в момент проверки соответственно, е.о.п. или мм.

При отклонении более 5% строят новый градуировочный график по свежеприготовленным растворам масляного препарата витамина А, витамина Е-ацетат стандарта.

3.3 Порядок проведения контроля

3.3.1 *Экстракция витаминов А, Е из премиксов*

Из тщательно перемешанной пробы исследуемого премикса берут навеску с погрешностью не более 0,0005 г. Затем навеску премикса помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 25 см^3 или 50 см^3 и приливают раствор для экстракции в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Содержание витамина А в премиксе, МЕ/г	Содержание витамина Е в премиксе, мкг/г	Масса навески премикса, г	Объем экстрагента, см^3
40—100	50—100	10	20
100—2000	100—500	5	15
2000—6000	500—1000	2	10

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

3.3.2 *Хроматографирование*

Полученные экстракты хроматографируют по 3.2.6 и 3.2.7. Примеры хроматограмм экстрактов витаминов А, Е из премиксов представлены в приложении А, рисунок А.1.

При возникновении сомнений в правильности выбора пика (по объему или времени удержания), соответствующего витамину А(Е), необходимо в анализируемый экстракт внести небольшое количество одного из градуировочных растворов витамина А(Е) (объемное соотношение экстракт — раствор витамина А(Е) равно 10 : 2 (10 : 5). Увеличение высоты соответствующего пика по сравнению с высотой этого пика на хроматограмме, полученной до введения градуировочного раствора в анализируемый экстракт, свидетельствует, что этот пик соответствует витамину А(Е).

3.4 Обработка результатов контроля

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

Содержание в премиксах витаминов А X_A, Е X_E, МЕ/г или мкг/г, определяют по формуле

$$X_A\,(X_E) = \frac{C_A\,(C_E)}{m},$$

где C_A, C_E — содержание витаминов А, Е, найденное по градуировочным графикам, соответственно МЕ, мкг;

m — масса навески премикса, г.

Содержание в премиксе витамина А X_A или витамина Е X_E, МЕ/г или мкг/г, при использовании коэффициента K вычисляют по формуле

$$X_A\,(X_E) = K\,\frac{h_A(h_E)}{m},$$

где K — коэффициент наклона градуировочного графика для витамина А, Е соответственно, МЕ/е.о.п., мкг/е.о.п.;

h_A, h_E — высота хроматографического пика витамина А, Е соответственно, е.о.п;

m — масса навески премикса, г.

3.5 Оформление результатов контроля

3.5.1 Результаты контроля витаминов в премиксе записывают в специальном журнале для регистрации анализов.

3.5.2 Журнал ведется работником, на которого возложено проведение анализов по определению содержания витаминов в премиксах.

В журнале регистрируют все пробы с обязательным заполнением следующих данных:

- обозначения премикса и витамина, на который проводится анализ;
- наименования предприятия-поставщика премикса;
- массы партии;
- даты отбора пробы;
- фамилии и личной подписи лица, отобравшего пробу;
- результата контроля;
- фамилии и личной подписи лица, проводившего контроль.

При необходимости в журнал могут быть включены дополнительные сведения.

3.5.3 Записи должны вестись четко, аккуратно.

3.6 Допустимая погрешность контроля

Результат контроля вычисляют с точностью до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат контроля принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должны быть более 10% для витамина А и 15% для витамина Е относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях, при доверительной вероятности $P = 0,95$ расхождения не должны превышать 15% для витамина А и 20% для витамина Е соответственно.

4 Определение витаминов А, D, Е нормально-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией

Сущность метода заключается в омылении навески премикса водно-спиртовым раствором гидроокиси калия, экстракции витаминов А, D, Е гексаном с последующим определением витаминов на жидкостном хроматографе.

Метод применим в диапазоне концентраций витамина А от 10 до 10000 международных единиц на 1 г премикса (МЕ/г), витамина D от 40 до 10000 МЕ/г, витамина Е от 10 до 10000 МЕ/г.

4.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный с фотометрическим детектором и систематической погрешностью измерений не выше 10% отн.: Хром-900 (ЧСФР), Ликвохром (Венгрия), Цвет (РФ) и др. жидкостные хроматографы с аналогичными характеристиками.

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

Спектрофотометр со спектральным диапазоном работы от 186 до 1100 нм.

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Линейка измерительная металлическая.

Секундомер механический.

Испаритель ротационный ИР-1М на 2 $дм^3$ или его аналоги.

Баня водяная, обеспечивающая нагрев до 80—100°С.

Холодильники стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336.

Колбы конические со шлифом вместимостью 250 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-1-1(2)-1 по ГОСТ 29169.

Пипетки 1-1-1(2)-1(5) по ГОСТ 29227.

Микрошприцы МШ-10М, МШ-50М по нормативному документу [5].

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

Воронки делительные вместимостью 200, 500 $см^3$ по ГОСТ 25336.

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

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

Воронки стеклянные диаметром 4—6 см по ГОСТ 25336.

Склянки с притертой пробкой.

Стеклянные палочки.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

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

Калия гидроокись по ГОСТ 24363.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962 или ГОСТ 18300.

Спирт этиловый абсолютированный для спектрофотометрии или по нормативному документу [6].

Гексан по нормативному документу [7].

Спирт изопропиловый (пропанол-2) по нормативному документу [2].

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166.

Ретинол ацетат (витамин А) по нормативному документу [11].

Эргокальциферол кристаллический (витамин D) по нормативному документу [13].

α-токоферолацетат (витамин Е) по нормативному документу [12].

Алюминия окись для хроматографии, нейтральная по нормативному документу [8].

Гидрохинон по ГОСТ 19627.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Бумага универсальная индикаторная по нормативному документу [9].

Фильтры обеззоленные (красная лента) по нормативному документу [10].

Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.

4.2 Порядок подготовки к проведению контроля

4.2.1 Определение массовой концентрации масляного раствора витамина А по 3.2.5.

4.2.2 *Приготовление стандартного раствора витамина А*

Для приготовления стандартного раствора взвешивают (лучше на часовом стекле) навеску масляного препарата, необходимую для приготовления раствора с активностью витамина 10000 МЕ/см^3, переносят ее в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и растворяют в изопропиловом спирте. Раствор перемешивают и доводят до метки спиртом. Хранят в холодильнике в емкости с притертой пробкой и используют в течение недели.

4.2.3 *Приготовление стандартного раствора витамина D_2*

Ампулу кристаллического эргокальциферола, содержащую 0,1000 г, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят содержимое колбы до метки изопропиловым спиртом и перемешивают. Полученный раствор (1) содержит 40000 МЕ/см^3 витамина D_2. Из него берут 1 см^3 раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, доводят до метки этим же спиртом и перемешивают. Полученный раствор (2) содержит 800 МЕ/см^3 витамина D_2. Раствор хранят в плотно закрытой стеклянной посуде в холодильнике.

4.2.4 *Приготовление стандартного раствора витамина Е*

Навеску масляного препарата α-токоферолацетата массой 0,0500 г переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3, растворяют в изопропиловом спирте, доводят им до метки и тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в емкости с притертой пробкой в течение одной недели.

4.2.5 *Подготовка растворителей*

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

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

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

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

4.3 Порядок проведения контроля

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

В конические колбы вместимостью 250 см^3, снабженные обратным холодильником, помещают 1 см^3 раствора [2] витамина D по 4.2.3, 0,25 см^3 ретинолацетата и 0,2 см^3 α-токоферолацетата.

Добавляют 0,1 г гидрохинона и 30 $см^3$ 10%-ного водно-спиртового раствора гидроокиси калия. Подвергают омылению в течение 30 мин на водяной бане при температуре 85°С. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, добавляют 30 $см^3$ дистиллированной воды и 30 $см^3$ гексана. Полученную смесь тщательно перемешивают и сливают в делительную воронку вместимостью 200 $см^3$.

После расслаивания нижний слой (водно-спиртовый) сливают в коническую колбу, а гексановый слой оставляют в делительной воронке. Эту операцию экстракции гексаном водно-спиртового слоя в конической колбе проводят еще дважды, каждый раз сливая в делительную воронку гексановый слой.

Гексановые вытяжки объединяют и промывают в делительной воронке дистиллированной водой порциями по 30 $см^3$ до нейтральной реакции среды (проверяют по индикаторной бумаге). Промытый экстракт переносят в сухую перегонную колбу, пропуская его через бумажный фильтр и слой безводного сульфата натрия (40—50 г). Делительную воронку и фильтрующий материал промывают свежими порциями гексана (20—30 $см^3$).

Все гексановые растворы объединяют и помещают в колбу роторного испарителя. Температура водяной бани роторного испарителя 70°С. После отгонки гексана сухой остаток растворяют в 3 $см^3$ гексана и переносят в мерную предварительно откалиброванную пробирку с притертой пробкой. Раствор может храниться в темном месте при температуре 4—8°С.

4.3.2 *Омыление и подготовка к хроматографированию образцов премиксов*

Навеску премикса массой 10 г взвешивают с погрешностью не более 0,0005 г, помещают в коническую колбу вместимостью 250 $см^3$, снабженную обратным холодильником. Добавляют антиоксидант (0,1 г гидрохинона), 50 $см^3$ водно-спиртового раствора щелочи и подвергают омылению на водяной бане при температуре 82—85°С в течение 30 мин.

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

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

Полученный экстракт используют для хроматографического анализа.

4.3.3 *Подготовка жидкостного хроматографа к работе*

Подготовка хроматографа осуществляется в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

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

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

4.3.4 *Проведение хроматографических измерений*

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

В колонку последовательно вводят от 3 до 20 $мкдм^3$ исследуемого раствора, стандартного раствора витамина А и стандартного раствора витамина Е. Получают соответствующие хроматограммы при длине волны фотометрического детектора 289 нм, приложение Б, рисунок Б.1.

После этого меняют светофильтр, устанавливая рабочую длину волны 254 нм, и при этих условиях снимают хроматограммы для растворов анализируемой пробы и стандарта витамина D, приложение Б, рисунок Б.2.

Высоты пиков, соответствующие времени удерживания витаминов A, D, E, измеряют металлической линейкой, как расстояние от вершины пика до линии, проведенной в основании пика. Значения высот пиков (в миллиметрах) используют для вычисления содержания витаминов A, D, E в анализируемом образце.

4.4 Обработка результатов контроля

Содержание витамина A X_1, МЕ/г, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{Q_A \cdot V_A \cdot V_{заг}^{ст} \cdot V_x \cdot h_x}{V_к \cdot V_{заг}^{x} \cdot V_{ст} \cdot h_{ст} \cdot a},$$

где Q_A — содержание витамина A в стандартном растворе, МЕ;

V_A — объем стандартного раствора витамина A, взятый на омыление, см^3;

$V_к$ — объем мерной колбы с исходным стандартным раствором витамина A, см^3;

$V_{заг}^{x}$, $V_{заг}^{ст}$ — объемы загрузки в колонку растворов пробы и стандарта, полученные после омыления, мкдм^3;

V_x, $V_{ст}$ — объемы экстрактов пробы и стандарта после проведения подготовительных операций (омыление и т.д.), см^3;

h_x — высота пика витамина A на хроматограмме премикса, мм;

$h_{ст}$ — высота пика на хроматограмме для стандарта витамина A, мм;

a — масса навески премикса, г.

Содержание витамина D_2 X_2, МЕ/г, рассчитывают по формуле

$$X_2 = \frac{Q_Д \cdot V_п' \cdot V_п'' \cdot V_{заг}^{ст} \cdot V_x \cdot h_x}{V_к' \cdot V_к'' \cdot V_{заг}^{x} \cdot V_{ст} \cdot h_{ст} \cdot a},$$

где $Q_Д$ — содержание витамина D_2 в стандартном препарате, МЕ;

$V_п'$ — объем стандартного раствора витамина D_2, взятый для последующего разбавления, см^3;

$V_к'$ — объем колбы со стандартным раствором витамина D_2, см^3;

$V_п''$ — объем стандартного раствора витамина D_2, взятый на омыление, см^3;

$V_к''$ — объем колбы со стандартным раствором витамина D_2 после первого разведения, см^3;

$V_{заг}^{ст}$, $V_{заг}^{x}$ — объемы загрузки в колонку омыленных растворов стандарта и пробы, мкдм^3;

V_x, $V_{ст}$ — окончательные объемы растворов пробы и стандарта, подготовленные для хроматографии, см^3;

$h_{ст}$, h_x — соответствующие высоты пиков витамина D_2 на хроматограммах стандарта и премикса, мм;

a — масса навески премикса, г.

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

Содержание витамина E X_3, мкг/г, рассчитывают по формуле

$$X_3 = \frac{Q_E \cdot V_п \cdot V_{заг}^{ст} \cdot V_x \cdot h_x}{V_к \cdot V_{заг}^{x} \cdot V_{ст} \cdot h_{ст} \cdot a},$$

где Q_E — масса навески α-токоферола-стандарта, мкг;

$V_п$ — объем стандартного раствора витамина E, взятый на омыление, см^3;

$V_к$ — объем мерной колбы со стандартным раствором витамина E, см^3;

$V_{заг}^{x}$, $V_{заг}^{ст}$ — объемы загрузки растворов пробы и стандарта в хроматографическую колонку, мкдм^3;

V_x, $V_{ст}$ — окончательные объемы растворов пробы и стандарта, подготовленные для хроматографии, см^3;

h_x, $h_{ст}$ — высоты пиков витамина Е на хроматограммах стандарта и премикса, мм;

a — масса навески премикса, г.

Результат контроля вычисляют с точностью до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение двух или более параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должны превышать 10% относительно среднего арифметического значения.

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому значению результатов измерений.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Хроматограммы экстрактов витаминов А, Е

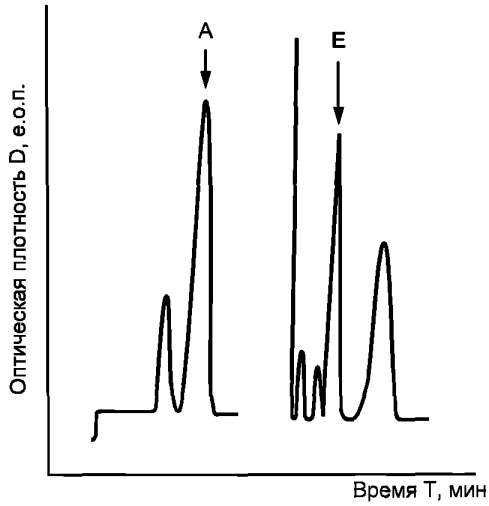

Рисунок А.1 — Хроматограммы экстрактов витаминов А, Е из премикса

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Хроматограммы экстрактов витаминов А, D, Е

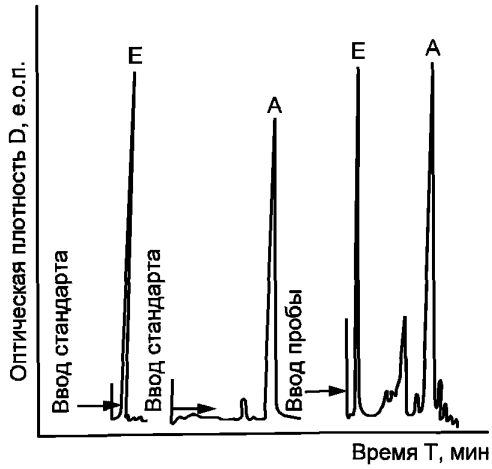

Рисунок Б.1 — Хроматограммы экстрактов витаминов А, Е из премикса при длине волны 289 нм

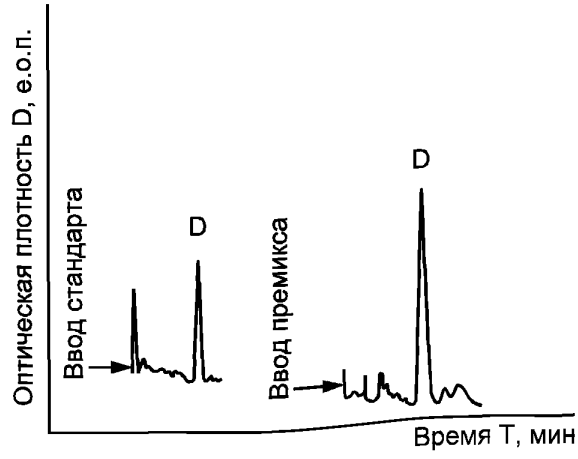

Рисунок Б.2 — Хроматограммы экстрактов стандарта витамина D из премикса при длине волны 254 нм

ПРИЛОЖЕНИЕ В
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 25—05.2830—83 Жидкостный хроматограф «Милихром»
[2] ТУ 6.09—402—87 2-пропанол (изопропиловый спирт химически чистый)
[3] ТУ 6—09—6628—70 Пропиловый спирт (пропанол-1)
[4] ТУ 6—09—06—1092—83 Ацетонитрил. Технические условия
[5] ТУ 2.833.104—85 Микрошприцы
[6] ТУ 84—11—99—89 Этиловый абсолютированный спирт
[7] ТУ 6—09—3375—78 Гексан
[8] ТУ 6—09—3916—85 Окись алюминия для хроматографии
[9] ТУ 6—09—1181—89 Бумага индикаторная универсальная для определения pH 1—10 и 7—14
[10] ТУ 6—09—1678—86 Фильтры обеззоленные (белая, красная, синяя ленты)
[11] ГФ СССР—X ст. 579 Раствор ретинола ацетата 3,44; 6,88 или 8,60% в масле
[12] ГФ СССР—X ст. 695 Токоферола ацетат (витамина Е ацетат)
[13] ГФ СССР—X ст. 627 Эргокальциферол кристаллический (витамин D_2)

ОКС 65.120.19 С19 ОКП 92 9600

Ключевые слова: стандарт, метод, хроматография, премикс, витамин, хроматограмма

gost.e-ecolog.ru