

**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

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

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

**БЕЛКОВО-ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫЕ
И АМИДО-ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫЕ ДОБАВКИ****Методы определения содержания ретинола-ацетата (витамина А),
эргокальциферола (холекальциферола) (витамина D), токоферола-ацетата (витамина E)**

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

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 серноокислый. 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

ГОСТ Р 52147—2003

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 ректифицированный 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 D₂) или холекальциферола (витамина D₃), 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.

Т а б л и ц а 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, мкг/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/см² (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 см³ 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 см³ 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 ректифицированный по ГОСТ Р 51652.

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

Кислота аскорбиновая [8].

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

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

П р и м е ч а н и я

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 см³ абсолютированного этилового спирта.

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

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

Навеску реактива массой 0,500 г растворяют в 99,5 см³ 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 см³ 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/см³

Навеску токоферола-ацетата массой 0,1120 г в расчете на содержание чистого вещества помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см³ добавляют от 100 до 200 мг аскорбиновой кислоты, 50 см³ этилового спирта и 10 см³ 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 см³, приливают по 50 см³ дистиллированной воды и диэтилового эфира, встряхивают и отстаивают до разделения слоев.

После расслаивания нижний водно-спиртовой слой сливают в коническую колбу, а эфирный слой оставляют в делительной воронке. В коническую колбу приливают 50 см³ 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 см³ 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 см³ до исчезновения розовой окраски промывных вод по реакции с фенолфталеином. Промытый экстракт переносят в коническую колбу вместимостью 250 см³, 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 см³) 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 см³ абсолютированного этилового спирта, количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят объем в колбе до метки этим же спиртом и тщательно перемешивают.

7.2.6 Приготовление раствора α -токоферола массовой концентрации 20 мкг/см³

1 см³ раствора α -токоферола массовой концентрации 1 мг/см³ переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³, 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/см³, вычисляют по формуле

$$C_E = \frac{D \cdot 10^6}{E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot 100}, \quad (1)$$

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

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

$E_{1\text{ см}}^{1\%}$ — оптическая плотность раствора α -токоферола в абсолютированном этиловом спирте массовой концентрации 1 г в 100 см³ при длине волны 292 нм и толщине поглощающего свет слоя 1 см (для α -токоферола $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 75$).

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

В пять мерных пробирок вместимостью по 5 см³ приливают 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 и 4,0 см³ раствора α -токоферола массовой концентрации 20 мкг/см³. В первые четыре пробирки добавляют 3,5; 3,0; 2,0 и 1,0 см³ абсолютированного этилового спирта. Затем в пробирки добавляют по 0,5 см³ раствора *o*-фенантролина и по 0,5 см³ 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 см³ (10, 20, 40, 60 и 80 мкг/5 см³)

7.2.8 Приготовление элюирующих растворов

7.2.8.1 Приготовление раствора I

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 6 см³ 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 см³ вносят 12 см³ 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 см³ вносят 30 см³ 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 см³, приливают 50 см³ этилового спирта, 10 см³ 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 $(85 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 25 мин, периодически перемешивая содержимое колбы. После этого содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры.

Затем в колбу приливают 20—25 см³ дистиллированной воды, 50 см³ диэтилового эфира, перемешивают, жидкую часть сливают в делительную воронку вместимостью 500 см³, сохраняя осадок в колбе. Экстракцию витаминов диэтиловым эфиром проводят трижды по 7.2.5.

При образовании устойчивой эмульсии в делительную воронку добавляют 20 см³ этилового спирта.

В объединенный эфирный экстракт добавляют несколько кристаллов бутилокситолуола и промывают его дистиллированной водой порциями по 100 см³ 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 см³ 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 см³ 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 см³).

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 см³ 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 см³ элюирующего раствора I. Эту фракцию отбрасывают.

α -токоферол элюируют от 15 до 25 см³ раствора II, контролируя продвижение витамина в УФ-свете (α -токоферол имеет голубоватое свечение).

Элюат количественно переносят в коническую колбу вместимостью 50 см³.

К колонке присоединяют другую колбу с тубусом и элюируют ретинол 30—35 см³ раствора III, также контролируя продвижение витамина в УФ-свете (ретинол имеет желто-зеленое свечение). Элюат количественно переносят в коническую колбу вместимостью 50 см³ и выпаривают досуха в водяной бане при температуре не выше 50 °С в токе азота или под вакуумом.

Сухой остаток растворяют в 5—50 см³ 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 см³ абсолютированного этилового спирта. Ориентируясь на рецептуру добавки, берут 0,2—3,5 см³ раствора и переносят в кювету толщиной поглощающего свет слоя 10 мм или в мерную пробирку вместимостью 5 см³, добавляют соответственно от 3,8 до 0,5 см³ абсолютированного этилового спирта, 0,5 см³ раствора *o*-фенантролина и 0,5 см³ 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

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

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/см³;

V — объем элюата (5—50), см³;

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

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

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

V — объем раствора элюата (10), см³;

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), см³.

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 $|X_1 - X_2| \leq 0,01 dX$, 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.

Т а б л и ц а 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	
Витамин Е, мг/кг	ВЭЖ	От 5,0 до 100 включ.	15	25
		Св. 100 » 300 »	10	20
	Колоночная	От 10 до 100 включ.	15	30
		Св. 100 » 500 »	10	25
ВЭЖ	» 500 » 1000 »	10	20	
	От 10 до 100 включ.	12	28	
Витамин D, тыс. МЕ/кг	ВЭЖ	Св. 100 » 1000 »	8	20
		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 D₂) [12] или холекальциферол кристаллический (витамин D₃) [13].

Спирт изопропиловый [14].

Гексан [15].

Алюминия окись для хроматографии [16].

2,6-Ди-трет-бутил-п-крезол (бутилокситолуол) [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 дм³ спирта).

Реактив должен иметь оптическую плотность не более 0,1 е. о. п. при $\lambda = 320 - 350$ 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 см³ 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/см³.

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

шлифом вместимостью 250 см³, добавляют около 200 мг пирогаллола или гидрохинона (на кончике скальпеля), 30 см³ этилового спирта и 5 см³ раствора гидроксида 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 см³ дистиллированной воды. Затем содержимое колбы переносят в делительную воронку вместимостью 250 см³, промывают колбу 20 см³ этилового спирта, который тоже переносят в делительную воронку. Добавляют 30 см³ 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 см³ до исчезновения розовой окраски промывных вод по реакции с раствором фенолфталеина. Промытый экстракт переносят в коническую колбу вместимостью 250 см³, 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 см³). 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 см³, 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/см³

В три мерные колбы вместимостью по 50 см³ помещают 1; 5 и 25 см³ раствора ретинола массовой концентрации 1000 МЕ/см³, 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/см³ вычисляют по формуле

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

где D — оптическая плотность раствора ретинола;

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

$E_{1\text{ см}}^{1\%}$ — оптическая плотность раствора ретинола в гексане массовой концентрации 1 г в 100 см³ при длине волны 326 нм и толщине поглощающего свет слоя 1 см (для ретинола $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 1830$);

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/см³

Навеску витамина Е массой 0,1120 г в расчете на содержание чистого вещества помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 250 см³ и проводят омыление, экстракцию и обезвоживание по 7.2.5.

После выпаривания сухой остаток растворяют в 100 см³ гексана.

8.2.6.2 Приготовление градуировочных растворов α -токоферола массовой концентрации 20, 100 и 500 мкг/см³

В три мерные колбы вместимостью 50 см³ помещают 1; 5 и 25 см³ раствора α -токоферола массовой концентрации 1000 мкг/см³, 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/см³

Навеску кристаллического эргокальциферола (холекальциферола) массой 0,100 г помещают в мерную колбу вместимостью 200 см³, 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/см³

В две мерные колбы вместимостью 200 см³ помещают 0,5 и 1,0 см³ раствора витамина D массовой концентрации 20 000 МЕ/см³. 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/см³, вычисляют по формуле

$$C_D = \frac{D \cdot 10^6}{E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot 100 \cdot 0,025}, \quad (5)$$

где D — оптическая плотность раствора витамина D;

10^6 — коэффициент пересчета граммов в микрограммы;

$E_{1\text{ см}}^{1\%}$ — оптическая плотность раствора витамина D в гексане массовой концентрации 1 г в 100 см³ раствора при длине волны 265 нм и толщине поглощающего свет слоя 1 см (для витамина D₂ $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 465$; для витамина D₃ $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 500$);

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 см³, добавляют 100—150 мг пирогаллола или гидрохинона (на кончике скальпеля) и соответственно 50—70 см³ этилового спирта и 10—15 см³ раствора гидроокиси калия массовой долей 50 %. Дальнейшую процедуру омыления и экстракции проводят по 7.3.1. Сухой остаток витаминов растворяют в 4 см³ 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 см³ раствора (8.3.1) и промывают ее 20 см³ петролейного эфира и 4 см³ смеси петролейного и диэтилового эфира в объемном соотношении 1:1. Эту фракцию отбрасывают.

Витамин D элюируют 20 см³ смеси петролейного и диэтилового эфира в объемном соотношении 1:1. Элюат количественно переносят в коническую колбу вместимостью 50 см³ и выпаривают досуха в водяной бане под током азота при температуре $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Сухой остаток растворяют в 1 см³ 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 мкдм³/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 мкдм³/мин;

е) объем анализируемого раствора — 10—40 мкдм³ для витамина D и 4—5 мкдм³ 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, E 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

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

где c — концентрация используемых градуировочных растворов, МЕ/см³ (ретинол), мг/см³ (α-токоферол);

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

V — объем разведения, см³ (4 см³);

10^3 — коэффициент пересчета граммов в килограммы;

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

$h_{\text{гр}}$ — 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

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

где c — концентрация используемого градуировочного раствора, МЕ/см³;

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

V — объем разведения, см³ (4 см³);

10^3 — коэффициент пересчета граммов в килограммы;

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

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

m — масса навески испытуемой пробы, г.

При определении витамина D, если в качестве градуировочного вещества используют эргокальциферол (витамин D₂), 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 $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq 0,01 D \bar{X}$, где \bar{X}_1 , \bar{X}_2 и \bar{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 $|\bar{X}_d - \bar{X} - C| \leq K$, где \bar{X}_d , \bar{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

$$K = 0,84 \sqrt{\Delta_x^2 + \Delta_{x_d}^2}, \quad (8)$$

где Δ_x и Δ_{x_d} — значения погрешности результатов анализа пробы без добавки и пробы с добавкой, вычисленные по 7.4.4.

Пример — Проведен анализ пробы с добавкой ($X_d = 40$ 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:

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

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, E

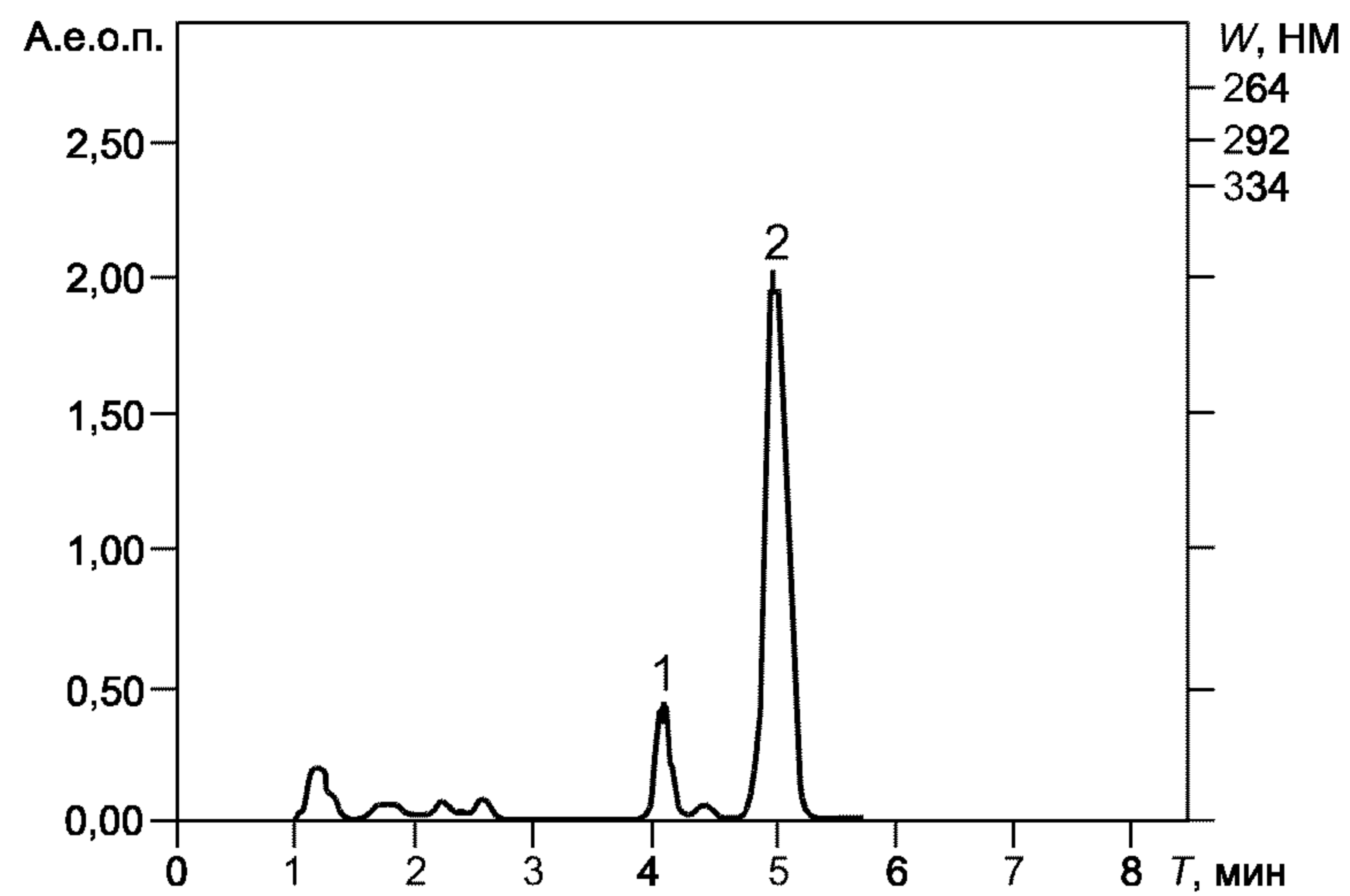


Рисунок А.1 — Хроматограмма экстракта витамина А: 1 — цис-форма, 2 — транс-форма

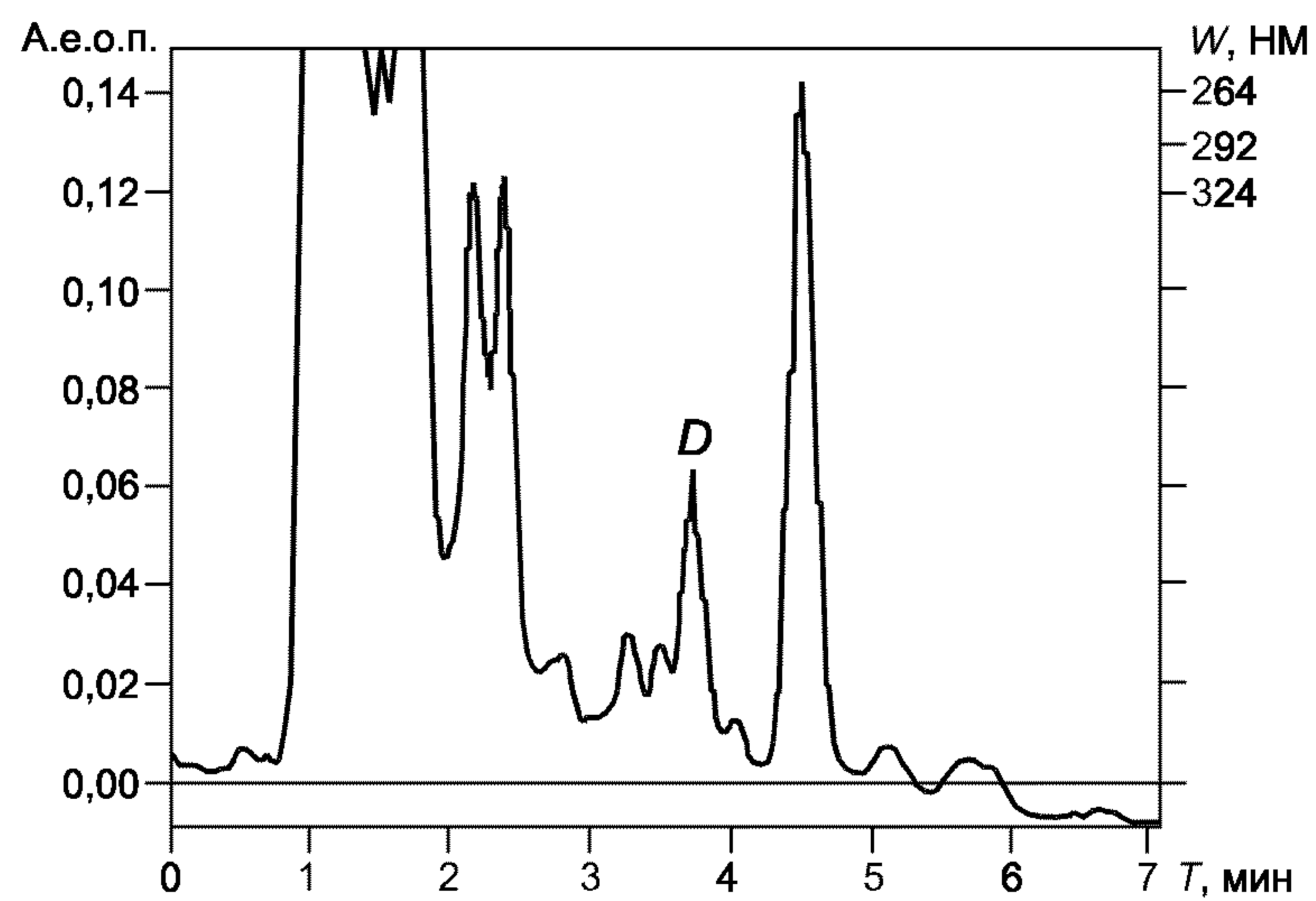


Рисунок А.2 — Хроматограмма экстракта витамина D

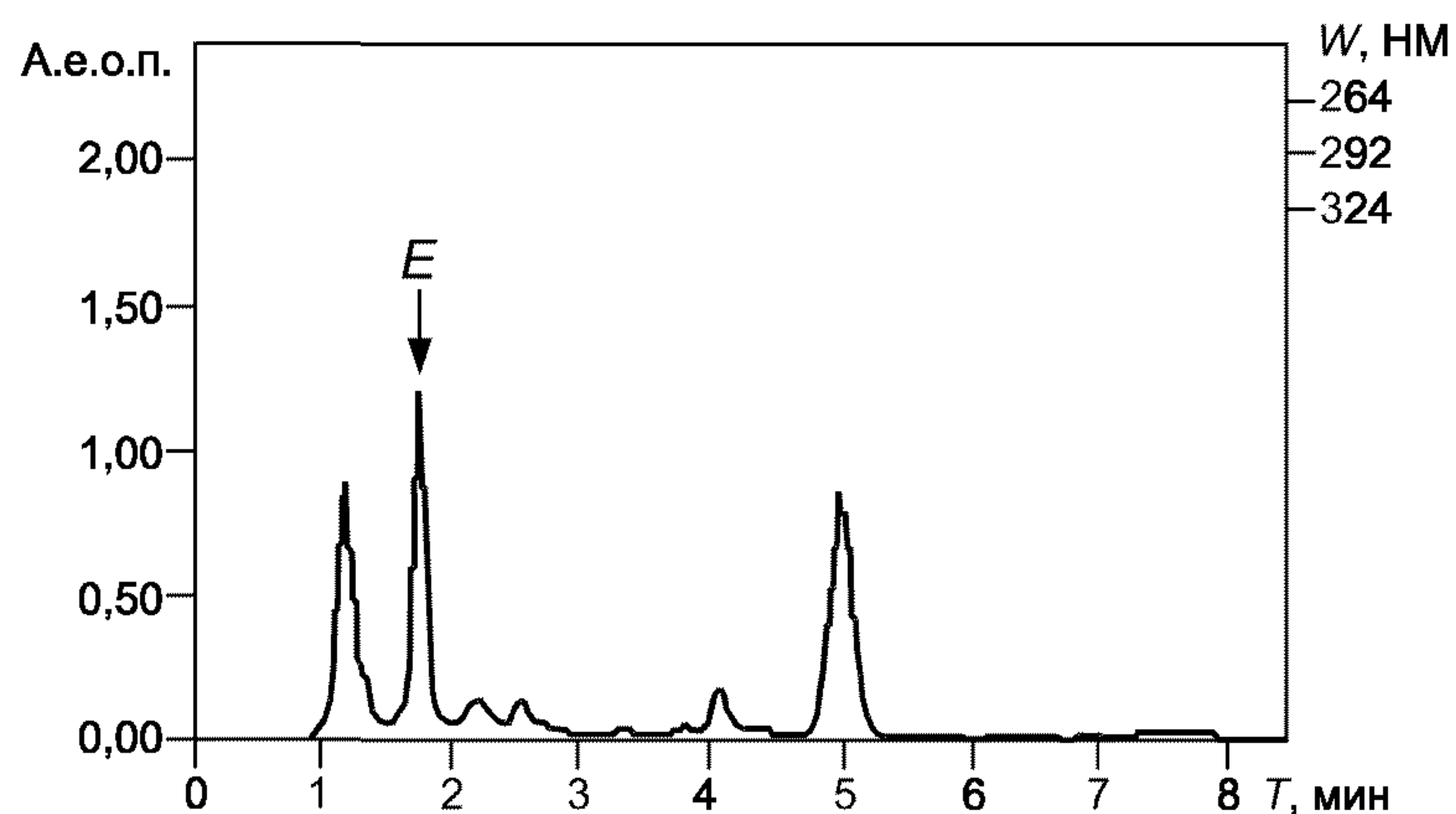


Рисунок А.3 — Хроматограмма экстракта витамина Е

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 абсолютный 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 D₃ 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.
<http://www.standards.ru> e-mail: info@standards.ru

Набрано в Издательстве на ПЭВМ
Отпечатано в филиале ИПК Издательство стандартов — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.
Плр № 080102