
ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EASCC)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARTIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
(первая редакция)

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ

Метод определения витамина А *Настоящий проект стандарта не подлежит
применению до его принятия*

Издание официальное

Минск
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации
202_

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 526 «Функциональные пищевые продукты»

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 202_ г. № ____)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от _____ г. № _____ межгосударственный стандарт ГОСТ _____ введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с _____

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным органам по стандартизации этих государств

Содержание

1 Область применения.....	
2 Нормативные ссылки.....	
3 Термины и определения.....	
4 Сущность метода.....	
5 Требования безопасности.....	
6 Условия выполнения испытания.....	
7 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы.....	
8 Подготовка к выполнению измерений.....	
9 Выполнение измерений.....	
10 Обработка и оформление результатов.....	
11 Метрологические характеристики метода	
Приложение А (справочное) Информация о применяемых нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ	



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ

Метод определения витамина А

Specialized food products. Method of vitamin A determination

Дата введения —

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на специализированные пищевые продукты и устанавливает метод определения массовой доли витамина А в виде ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Диапазон измерений массовой доли витамина А составляет от 0,5 до 10,0 млн-1.

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

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

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

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

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 427 Линейки измерительные металлические. Технические условия

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

ГОСТ 4166 Реактивы. Натрий серноокислый. Технические условия

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

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9293 Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

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

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 18300 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19627 Гидрохинон (парадиоксибензол). Технические условия

ГОСТ 24363 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 26809.1 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27025 Реактивы. Общие указания по проведению испытаний

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

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 32189 Маргарины, жиры для кулинарии, кондитерской, хлебопекарной и молочной промышленности. Правила приемки и методы контроля

ГОСТ 32190 Масла растительные. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ ИСО 5725-6¹⁾ Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

¹⁾ В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по нормативным правовым актам, действующим на территории государства, принявшего стандарт, а также следующий термин с соответствующим определением:

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

В настоящем стандарте приведено следующее сокращение:

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография.

Примечание — Информация о нормативных правовых актах приведена в приложении А.

4 Сущность метода

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

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

5 Требования безопасности

5.1 Условия безопасного проведения работ

5.1.1 При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования: воздух рабочей зоны должен соответствовать ГОСТ 12.1.005.

Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021.

Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать гигиенических нормативов, действующих на территории государства, принявшего стандарт.

5.1.2 При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

5.1.3 Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

5.1.4 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

5.2 Требования к квалификации оператора

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

6 Условия выполнения испытания

6.1 Общие условия

При подготовке к проведению измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха — $(20 \pm 5) ^\circ \text{C}$;
- относительная влажность — не более 80%.

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

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

6.2 Условия фотометрических измерений

Условия фотометрических измерений приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Условия фотометрических измерений

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

6.3 Условия хроматографического анализа

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

Скорость потока подвижной фазы: 0,7 см³/мин (ориентировочное значение).

Объем вводимой пробы: $50 \cdot 10^{-3}$ см³.

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

Проверку оптимальности условий хроматографического разделения осуществляют путем хроматографического анализа смешанного раствора ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола с массовой концентрацией каждого вещества не менее 0,4 мкг/см³. Данный смешанный раствор готовят из основных растворов ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола по аналогии с методикой приготовления рабочих растворов по 8.1.2. Эффективность хроматографического разделения признается удовлетворительной, если коэффициент разделения соседних пиков ретинола, ацетата ретинола, пальмитата ретинола составляет не менее 1,3. В противном случае для достижения требуемой эффективности разделения экспериментальным путем подбирают скорость потока подвижной фазы или проводят испытания других колонок.

7 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

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

- весы по ГОСТ OIML R 76-1, обеспечивающие точность взвешивания с пределами допускаемой абсолютной погрешности $\pm 0,1$ мг;
- спектрофотометр со спектральным диапазоном работы от 190 до 1100 нм, основной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1 %;
- кюветы кварцевые с длиной оптического пути 1 см;
- хроматограф высокоэффективный жидкостный, включающий следующие элементы: насос; устройство для ввода проб; флуориметрический детектор (длины волн, нм; возбуждения — 325 нм; эмиссии — 470 нм) или спектрофотометрический детектор (длина волны детектирования — 325 нм) с уровнем шумов не более 10^{-4} единиц оптической плотности и относительной погрешностью измерений не более 10 %; колонку аналитическую для ВЭЖХ диаметром 0,30—0,46 см. длиной 10—25 см, заполненную октадецилсиликагелем с размером частиц 5 мкм; регистрирующее устройство — интегратор или самописец, позволяющий проводить измерение площади (или высоты)

лика с погрешностью не более 1 %; программное обеспечение для обработки полученных результатов измерений;

- фильтры для фильтрования подвижной фазы и анализируемых растворов (например, с размером пор 0,45 мкм);

- микрошприц типа «Гамильтон» вместимостью 0,1 см³ для ввода проб в жидкостный хроматограф;

- пипетки градуированные 1(2,3)—1(2)—1—0,5(1,2,5,10,25) по ГОСТ 29227 или дозаторы автоматические с аналогичными или изменяемыми объемами доз с относительной погрешностью дозирования не более $\pm 1\%$;

- цилиндры 1—50(100,250)—1(2) по ГОСТ 1770;

- колбы мерные 2—50(100,250,500,1000)—2 по ГОСТ 1770;

- пробирки мерные с притертыми пробками П-2—5(10,15,20,25)—0,1(0,2)ХС по ГОСТ 1770;

- стаканы В(Н)-1—50(100,150,250)ТХС по ГОСТ 25336;

- колбы круглодонные К-1—100(250,500)—29/32ТС по ГОСТ 25336;

- воронки В-36(56)—80ХС, В-75—110(140)ХС, В-100—150ХС по ГОСТ 25336;

- линейка металлическая с ценой деления 1 мм по ГОСТ 427;

- встряхиватель для колб и пробирок с диапазоном частот колебаний платформ 100—150 колебаний в минуту;

- центрифуга с относительным центробежным ускорением 4000-6000 об/мин;

- баня водяная с регулятором нагрева, поддерживающая температуру от 40 °С до 100 °С;

- баня ультразвуковая лабораторная рабочим объемом не менее 2 дм³;

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

- холодильники стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336;

- термометр лабораторный жидкостный диапазоном температур от 0 °С до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498;

- баллон с газообразным азотом по ГОСТ 9293. ос. ч.;

- бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;

- плитка электрическая закрытого типа по ГОСТ 14919;

- мельница лабораторная электрическая;

- холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

7.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы и материалы:

- спирт этиловый абсолютный (C_2H_5OH) массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- спирт этиловый ректификованный (C_2H_5OH) массовой долей основного вещества не менее 96 % или по ГОСТ 18300;
- спирт метиловый (CH_3OH) массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- ацетонитрил (CH_3CN) массовой долей основного вещества не менее 99,8 %;
- метилен хлористый (CH_2Cl_2) массовой долей основного вещества не менее 99,8 %;
- н-гексан (C_6H_{14}) массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- пропанол-2 (C_3H_8O) массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- эфир петролейный, перегнанный при температуре $(50 \pm 10) ^\circ C$, очищенный от перекисей;
- эфир диэтиловый, очищенный от перекисей, содержащий 0,1 % пирогаллола;
- калия гидроокись (KOH) по ГОСТ 24363, х.ч. или ч.д.а., раствор KOH массовой долей 50 %;
- натрий сернокислый (Na_2SO_4) безводный массовой долей основного вещества не менее 99,5 % или по ГОСТ 4166, х. ч.;
- воду для лабораторного анализа первой степени чистоты по ГОСТ 6709;
- кислоту аскорбиновую ($C_6H_8O_6$), х. ч.;
- гидрохинон ($C_6H_6O_2$) массовой долей основного вещества не менее 99 % или по ГОСТ 19627;
- пирогаллол ($C_6H_6O_3$) массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- бутилгидрокситолуол ($C_{15}H_{24}O$) массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- ретинол M ($C_{20}H_{30}O$) = 286,5 г/моль, массовой долей основного вещества не менее 90 %;
- ретинола ацетат M ($C_{22}H_{32}O_2$) = 328,5 г/моль, массовой долей основного вещества не менее 90 %;
- ретинола пальмитат M ($C_{36}H_{60}O_2$) = 524,9 г/моль, массовой долей основного вещества не менее 90 %.

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

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Приготовление растворов

8.1.1 Основные стандартные растворы

Растворяют около 50 мг ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) в 50 см³ абсолютного этилового спирта. Массовая концентрация ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) в растворе составляет примерно 1,0 мг/см³. Далее 2 см³ раствора ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) с помощью пипетки помещают в мерную колбу объемом 50 см³ и доводят до метки спиртом этиловым абсолютным. Массовая концентрация соединений в полученных основных стандартных растворах составляет примерно 40 мкг/см³.

8.1.2 Градуировочные растворы

Из основных стандартных растворов готовят не менее четырех градуировочных растворов ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) в диапазоне массовых концентраций 0,4 — 4,0 мкг/см³ путем точного разведения основных стандартных растворов спиртом этиловым абсолютным в мерной колбе вместимостью 50 см³.

Определение массовой концентрации ретинола (или ретинола ацетата, или ретинола пальмитата) с (мкг/см³) проводят после измерения оптической плотности градуировочных растворов в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см на спектрофотометре при оптимальной длине волны и вычисляют по формуле

$$C = \frac{A \cdot 10^4}{E_{1\text{см}}^{1\%}} K, \quad (1)$$

где A — значение оптической плотности градуировочного раствора;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ — значение оптической плотности градуировочного раствора в абсолютном этиловом спирте или 2-пропанолe массовой концентрации 1 г в 100 см³ при толщине поглощающего слоя 1 см, приведенное в таблице 1;

10^4 — коэффициент пересчета;

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

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

где $S_{\text{ст}}$ — площадь пика стандартного вещества при проведении ВЭЖХ-анализа, мAU • с (AU • с);

$S_{\text{общ}}$ — сумма площадей пиков сопутствующих компонентов при проведении ВЭЖХ-анализа стандартного вещества. мAU • с (AU • с).

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

8.2 Отбор и подготовка проб

8.2.1 Отбор проб проводят в соответствии с документами, устанавливающими требования к отбору проб конкретных видов СПП в состав которых введены ретинол, или ретинола ацетат или ретинола пальмитат, а также по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 32189, ГОСТ 32190.

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

Анализируемые пробы гомогенизируют, избегая воздействия повышенной температуры.

8.2.3 Специализированные пищевые продукты на масложировой основе с массовой долей воды 1 % и менее, содержащие ацетат ретинола или пальмитат ретинола

2—5 г анализируемой пробы переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, растворяют в 10—15 см³ н-гексана, используя ультразвуковую баню для ускорения растворения. Раствор доводят до метки н-гексаном. При необходимости раствор можно использовать для последующего разведения н-гексаном. Затем аликвоту гексанового раствора упаривают в токе азота и сухой остаток перерастворяют в элюенте.

8.2.4 Специализированные пищевые продукты на масложировой основе с массовой долей воды не более 20 %, содержащие ацетат ретинола или пальмитат ретинола

2—5 г анализируемой пробы растворяют при интенсивном перемешивании в 10—15 см³ н-гексана, используя ультразвуковую баню для ускорения растворения. Удаляют избыток воды добавлением безводного сульфата натрия. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр для отделения нерастворившегося осадка. Колбу промывают дважды 5 см³ н-гексана. Фильтраты собирают в мерную колбу вместимостью 25 см³. Раствор доводят до метки н-гексаном. Затем аликвоту гексанового раствора упаривают в токе азота и сухой остаток перерастворяют в элюенте.

8.2.5 Другие специализированные пищевые продукты, содержащие ацетат ретинола или пальмитат ретинола

Для проведения щелочного гидролиза 1—30 г анализируемой пробы сухого или жидкого материала помещают в круглодонную колбу вместимостью 100—500 см³. К сухому материалу добавляют 5—20 см³ воды и нагревают на водяной бане при температуре 60 °С — 70 °С при перемешивании в течение 5 мин. Затем прибавляют 50—150 см³ этилового ректификованного спирта (или метилового спирта), 0,2—1,0 г антиоксиданта (аскорбиновой кислоты, гидрохинона, бутилгидрокситолуола), 4—40 см³ 50%-ного раствора гидроокиси калия и нагревают в течение 15—45 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре 80 °С — 100 °С.

Рекомендуемые соотношения испытуемого материала и реактивов приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Рекомендуемые соотношения испытуемого материала и реактивов

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

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

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

После окончания гидролиза содержимое колбы быстро охлаждают до (20 ± 5) °С и количественно переносят в делительную воронку. Колбу ополаскивают водой, объем которой равен объему добавленного этилового спирта (или метилового), и воду сливают в ту же воронку. Витамин А экстрагируют диэтиловым (или петролейным) эфиром, н-гексаном, н-гексаном с добавкой диэтилового (или петролейного) эфира в объемном соотношении 1:1 в течение 2 мин. Для учета возможной неполной экстракции витамина А следует использовать метод добавок стандартов.

Экстракцию повторяют три-четыре раза порциями экстрагента 50—100 см³. Объединенный экстракт отмывают от щелочи три-четыре раза порциями воды 50—150 см³ до исчезновения щелочной реакции промывных вод (по универсальной индикаторной бумаге).

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

Раствор, полученный по 8.2.3 (8.2.4, 8.2.5), анализируют методом ВЭЖХ. Массу анализируемой пробы и объем растворителя подбирают таким образом, чтобы концентрация определяемых веществ в анализируемом растворе находилась в диапазоне от 0,4 до 4,0 мкг/см³.

8.3 Подготовка жидкостного хроматографа

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

8.4 Построение градуировочной зависимости

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

Градуировочный график строят в координатах «аналитический сигнал» — «массовая концентрация витамина в градуировочном растворе, мкг/см³». Для каждого анализируемого градуировочного раствора проводят два параллельных измерения и находят среднее арифметическое значение. Различие между измеренными значениями аналитических сигналов и времени удерживания не должно превышать 5 % от средних значений. Линейные участки градуировочного графика должны соответствовать всему диапазону определяемых массовых концентраций витамина А.

Коэффициент градуировочного графика $k_{гр}$, мкг/см³/(мAU • с) или мкг/см³/(AU • с), определяют как среднеарифметическое значение коэффициентов k_i вычисляемых по формуле

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

где C_i — массовая концентрация стандартных веществ в i -м градуировочном растворе, мкг/см³;

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

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

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

9 Выполнение измерений

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

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

10 Обработка и оформление результатов

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

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

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

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

V — объем разведения, см^3 ;

m — масса анализируемой пробы, г .

С использованием градуировочного раствора

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

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

V — объем разведения, см^3 ;

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

m — масса анализируемой пробы, г ;

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

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

При анализе каждой пробы выполняют два параллельных определения, начиная со взятия навески испытуемой пробы.

Расхождение между результатами двух параллельных измерений X_1 , X_2 (в процентах от среднего значения $X_{ср}$), выполненных одним оператором с использованием идентичных реактивов и оборудования и в минимально возможный промежуток времени, не должно превышать r (предел повторяемости приведен в таблице 3) с доверительной вероятностью $P = 95 \%$.

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

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

Результат определения витамина А представляют в следующем виде:

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

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

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

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

Результаты испытаний заносят в протокол, в котором указывают:

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

11 Метрологические характеристики метода

11.1 Повторяемость

Каждую пробу анализируют дважды, начиная со взятия навески испытуемой пробы. Расхождение между результатами двух параллельных измерений (X_1 , X_2), выполненных одним оператором с использованием идентичных реактивов и оборудования и в минимально возможный промежуток времени, считают удовлетворительным, если $|X_1 - X_2| \leq 0,01r \cdot X_{\text{ср}}$, где $X_{\text{ср}}$ — среднеарифметическое значение, r — предел повторяемости (расхождение между двумя параллельными определениями, выполненными в условиях повторяемости). Значение r приведено в таблице 3.

При превышении предела повторяемости (сходимости) испытание повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

11.2 Воспроизводимость

Пробу делят на две равные части. Расхождение между результатами двух определений (X_1 , X_2), выполненных разными операторами в разное время с использованием различных реактивов и оборудования, считают удовлетворительным, если $|X_1 - X_2| \leq 0,01R \cdot X_{\text{ср}}$, где $X_{\text{ср}}$ — среднеарифметическое значение, R — предел воспроизводимости (расхождение между двумя определениями, выполненными в условиях воспроизводимости). Значение R приведено в таблице 3.

Таблица 3 — Метрологические характеристики

Метрологическая характеристика ($P = 0.95$)	Диапазон измерений массовой доли, млн ⁻¹	
	От 0,5 до 5,0 включ.	Св. 5,0 до 10,0 включ.
Стандартное отклонение повторяемости s_r , %	5,4	4,3
Предел повторяемости r , %	15	12
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R , %	8,9	7,1
Предел воспроизводимости R , %	25	20
Границы относительной погрешности ($\pm \delta$), %	20	15
Предел обнаружения, млн ⁻¹	0,1	

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

11.3 Контроль погрешности результатов испытаний

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

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

$$| X_{доб} - X_{ср} - C_{доб} | \leq K_{доб}, \quad (8)$$

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

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

$C_{доб}$ — массовая доля добавки, млн⁻¹.

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

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

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

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

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

11.4 Контроль стабильности результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6, используя методы контроля стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности по ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 6.2.3) и показателя правильности по ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 6.2.4). Проверку стабильности проводят с применением контрольных карт Шухарта. Периодичность контроля и процедуры контроля стабильности результатов выполнения измерений должны быть предусмотрены в Руководстве по качеству лаборатории в соответствии с ГОСТ ISO/IEC 17025 (пункт 4.2).

Приложение А

(справочное)

Информация о применяемых нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ

А.1 Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в государствах-участниках СНГ приведена в таблице А.1.

Таблица А.1

Структурный элемент	Наименование технического регламента или нормативного правового акта	Государство-участник СНГ
Раздел 3	Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011 Закон РУз «О качестве и безопасности пищевой продукции» Технический регламент «Безопасность пищевой продукции» Утвержден постановлением Правительства Республики Таджикистан от 30 апреля 2016года, № 190	AM, BY, KZ, KG, RU UZ TD
Раздел 3	Технический регламент Таможенного союза «О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции, в том числе диетического лечебного и диетического профилактического питания» ТР ТС 027/2012	AM, BY, KZ, KG, RU

УДК 664:001.4:006.354

МКС 67.050

Ключевые слова: специализированная пищевая продукция, витамин А, ретинол, ретинола ацетат, ретинола пальмитат, определения содержания, высокоэффективная жидкостная хроматография

Сведения о разработчике:

Разработчик межгосударственного стандарта:

- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14, тел. +7 (495) 698-53-30, e-mail: mailbox@ion.ru, tashenka13@inbox.ru.

Руководитель организации – разработчика:

Врио директора ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», д.б.н.

(подпись)

Н.Р.Ефимочкина

Руководитель разработки:

Заведующий лабораторией витаминов и минеральных веществ ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», к.б.н.

(подпись)

Н.В. Жилинская

Исполнители:

Старший научный сотрудник лаборатории витаминов и минеральных веществ ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», к.х.н.

(подпись)

Н.А.Бекетова

УДК 664:001.4:006.354

МКС 67.050

Ключевые слова: специализированная пищевая продукция, витамин А, ретинол, ретинола ацетат, ретинола пальмитат, определения содержания, высокоэффективная жидкостная хроматография

Сведения о разработчике:

Разработчик межгосударственного стандарта:

- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14, тел. +7 (495) 698-53-30, e-mail: mailbox@ion.ru, tashenka13@inbox.ru.

Руководитель организации – разработчик:

Врио директора ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», д.б.н.




(подпись)

Н.Р.Ефимочкина

Руководитель разработки:

Заведующий лабораторией витаминов и минеральных веществ ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», к.б.н.


(подпись)

Н.В. Жилинская

Исполнители:

Старший научный сотрудник лаборатории витаминов и минеральных веществ ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», к.х.н.


(подпись)

Н.А.Бекетова