МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 12822–
2014

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение содержания витамина Е (α-, β-, γ- и δ-токоферолов) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 12822:2000, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 – 92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе аутентичного перевода на русский язык европейского регионального стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 мая 2014 г. № 67-П)

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
Армения	AM	Минэкономразвития Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 августа 2014 г. № 900-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 12822-2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2016 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту EN 12822:2000 Foodstuffs – Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography – Measurement of α-, β-, γ- and δ-tocopherols (Продукты пищевые. Определение витамина Е высокоэффективной жидкостной хроматографией. Измерение α-, β-, γ- и δ-токоферолов).

Перевод с немецкого языка (de).

Официальный экземпляр европейского регионального стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеется в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2014

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения
2 Нормативные ссылки
3 Сущность метода
4 Реактивы
5 Аппаратура
6 Отбор проб
7 Проведение испытаний
8 Обработка результатов
9 Прецизионность
10 Протокол испытаний
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности
Приложение С (справочное) Варианты условий хроматографического анализа
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам
Библиография

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение содержания витамина Е (α-, β-, γ- и δ-токоферолов) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs. Determination of vitamin E (α-, β-, γ- и δ-tocopherols) content by high performance liquid chromatography

Дата введения – 2016–01–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения витамина Е в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение содержания витамина Е осуществляется путем определения α-, β-, γ- и δ-токоферолов. Активность витамина Е может быть рассчитана исходя из содержания токоферолов путем применения соответствующих коэффициентов [1], [2], [3].

2 Нормативные ссылки

Настоящий стандарт содержит следующие нормативные ссылки. Все последующие изменения документов, обозначенных датированными ссылками, допустимо использовать только после внесения соответствующих изменений в настоящий стандарт. В случае недатированных ссылок используют последнее издание документа, включая все изменения.

EN ISO 3696 Water for analytical laboratory use – Specification and test methods (ISO 3696:1987) (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

EN ISO 5555 Animal and vegetable fats and oils. Sampling (ISO 5555:1991) (Жиры и масла животные и растительные. Отбор проб)

3 Сущность метода

Метод основан на определении α-, β-, γ- и δ-токоферолов в растворе пробы высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с фотометрическим (в ультрафиолетовой области) или, предпочтительнее, флуориметрическим детектированием. Для приготовления раствора пробы в большинстве случаев необходимо омыление материала пробы с последующей экстракцией аналитов. Определяемые соединения идентифицируют по значениям времени удерживания и количественно определяют при помощи внешнего стандарта по результатам измерений значений площадей или высот пиков ([4] - [13]). Допускается использование метода внутреннего стандарта, если соответствующие тесты по полноте обнаружения подтверждают, что поведение внутреннего стандарта и аналитов в процессе анализа тождественно.

4 Реактивы

Если не указано иное, то при анализе используют только реактивы гарантированной чистоты и воду, по крайней мере, степени чистоты 1 по EN ISO 3696.

4.1 Метанол.

4.2 Этанол абсолютный, объемная доля $\varphi(C_2H_5OH) = 100\,\%$.

4.3 Этанол, $\varphi(C_2H_5OH) = 96\,\%$.

4.4 Сульфат натрия, безводный.

4.5 Растворы гидроксида калия для омыления – водный раствор массовой концентрации $\rho(KOH)$ = 50 г/100 см^3 или 60 г/100 см^3 или водно-этанольный раствор $\rho(KOH)$ = 28 г/100 см^3 при объемном соотношении этанола и воды 9:1.

4.6 Антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота (АК), аскорбат натрия, пирогаллол, сульфид натрия (Na_2S) или бутилокситолуол (ВНТ).

4.7 Растворители и экстрагенты, например диэтиловый эфир (не содержащий перекисей), дихлорметан, петролейный эфир (выкипающий от

40 °С до 60 °С), н-гексан, этилацетат или подходящая их смесь.

4.8 Подвижные фазы для ВЭЖХ

Примерами подходящих смесей (состав в объемных долях) являются: 3 % 1,4-диоксана или 0,5 % пропанола-2, или 3 % трет-бутилметилового эфира в н-гексане или н-гептане для нормально-фазовой хроматографии (НФ) или от 1 % до 10 % воды в метаноле для обращенно-фазовой хроматографии (ОФ).

Относительно подвижных фаз для альтернативных систем для ВЭЖХ - см. приложение С.

4.9 Образцы сравнения

4.9.1 Общие положения

β-, γ- и δ-токоферолы поставляет фирма Merck[1)], α-токоферол доступен от различных поставщиков. Массовая доля основного вещества в образцах сравнения токоферолов может колебаться от 90 % до 100 %, поэтому необходимо определить массовую концентрацию градуировочного раствора спектрофотометрическим методом (см. 4.10.5).

4.9.2 α-токоферол, $M(C_{29}H_{50}O_2) = 430,7$ г/моль, массовая доля основного вещества не менее 95 %. α-токоферилацетат $M(C_{31}H_{52}O_3) = 472,7$ г/моль после омыления может также быть использован в качестве образца сравнения.

4.9.3 β-токоферол, $M(C_{28}H_{48}O_2) = 416,7$ г/моль, массовая доля основного вещества не менее 90 %.

4.9.4 γ-токоферол, $M(C_{28}H_{48}O_2) = 416,7$ г/моль, массовая доля основного вещества не менее 90 %.

4.9.5 δ-токоферол, $M(C_{27}H_{46}O_2) = 416,7$ г/моль, массовая доля основного вещества не менее 90 %.

4.10 Основные растворы

4.10.1 Основной раствор α-токоферола

[1)] Эта информация приведена исключительно для удобства пользователя настоящего стандарта и не является поддержкой указанного поставщика со стороны CEN.

Взвешивают с точностью до 1 мг образец сравнения α-токоферола (4.9.2), например 10 мг, растворяют в определенном объеме, например 100 см^3, подходящего растворителя, например н-гексана при использовании метода нормально-фазовой ВЭЖХ или метанола при использовании метода обращенно-фазовой ВЭЖХ.

4.10.2 Основной раствор β-токоферола

Взвешивают с точностью до 1 мг образец сравнения β-токоферола (4.9.3), например 10 мг, растворяют в определенном объеме, например 100 см^3, подходящего растворителя, например н-гексана при использовании метода нормально-фазовой ВЭЖХ или метанола при использовании метода обращенно-фазовой ВЭЖХ.

4.10.3 Основной раствор γ-токоферола

Взвешивают с точностью до 1 мг образец сравнения γ-токоферола (4.9.4), например 10 мг, растворяют в определенном объеме, например 100 см^3, подходящего растворителя, например н-гексана при использовании метода нормально-фазовой ВЭЖХ или метанола при использовании метода обращенно-фазовой ВЭЖХ.

4.10.4 Основной раствор δ-токоферола

Взвешивают с точностью до 1 мг образец сравнения δ-токоферола (4.9.5), например 10 мг, растворяют в определенном объеме, например 100 см^3, подходящего растворителя, например н-гексана при использовании метода нормально-фазовой ВЭЖХ или метанола при использовании метода обращенно-фазовой ВЭЖХ.

4.10.5 Проверка концентрации и чистоты

Измеряют оптическую плотность основных растворов (4.10.1 – 4.10.4) при соответствующей длине волны (см. таблицу 1) на спектрофотометре, пригодном для проведения измерений в ультрафиолетовой области (5.1). Если в качестве растворителя используется н-гексан, то 10 см^3 основного раствора помещают пипеткой в круглодонную колбу из темного стекла и отгоняют растворитель при пониженном давлении и температуре не выше 50 °С с

использованием ротационного испарителя (5.2). Остаток растворителя в колбе удаляют в токе азота, содержимое растворяют при перемешивании в 10 см^3 метанола. Этот раствор используют для спектрофотометрических измерений.

Массовую концентрацию ρ, мкг/см^3, соответствующего α-, β-, γ- или δ-токоферола вычисляют по формуле:

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

где A – оптическая плотность основного раствора соответствующего токоферола;

$E^{1\%}_{1\,см}$ – коэффициент экстинкции соответствующего токоферола, приведенный в таблице 1.

Таблица 1 – Примеры значений $E^{1\%}_{1\,см}$

Соединение	Длина волны (в метаноле), нм	$E^{1\%}_{1\,см}$	Библиография
α-токоферол	292	76	[11]
β-токоферол	296	89	[11]
γ-токоферол	298	91	[11]
δ-токоферол	298	87	[11]

Дополнительно к полученному значению для α-токоферола при 292 нм следует также измерить оптическую плотность при 255 нм (в минимуме) и вычислить $E^{1\%}_{1\,см}$ при этой длине волны. Критерием удовлетворительной чистоты образца сравнения является нахождение значения $E^{1\%}_{1\,см}$ в диапазоне от 6 до 8, в противном случае делают вывод о том, что произошло разложение вещества [14], [15].

4.11 Градуировочные растворы

4.11.1 Градуировочный раствор α-токоферола

10 см^3 основного раствора α-токоферола (4.10.1) переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и разбавляют до метки подходящим растворителем (например, для нормально-фазовой хроматографии н-гексаном, для обращенно-фазовой – метанолом). Массовая концентрация градуировочного раствора α-токоферола должна быть от 1 до 10 мкг/см^3. При использовании спектрофотометрического детектора следует использовать более концентрированный раствор.

Градуировочный раствор хранят в условиях защиты от света при температуре ниже 4 °С.

4.11.2 Градуировочный раствор смеси α-, β-, γ- и δ-токоферолов

По 10 см^3 каждого основного раствора (4.10) переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и разбавляют до метки подходящим растворителем (например, для нормально-фазовой хроматографии н-гексаном, для обращенно-фазовой - метанолом). Массовая концентрация каждого токоферола в градуировочном растворе должна быть от 1 до 10 мкг/см^3.

Градуировочный раствор хранят в условиях защиты от света при температуре ниже 4 °С.

5 Аппаратура

При проведении испытаний используют стандартное лабораторное оборудование, в частности, следующее.

5.1 Спектрофотометр для ультрафиолетовой области, пригодный для измерений оптической плотности при заданных длинах волн, снабженный кварцевыми кюветами, например с толщиной слоя 1 см.

5.2 Ротационный испаритель, в комплекте с водяной баней и устройством для создания вакуума.

Примечание – Для сброса вакуума рекомендуется использовать азот.

5.3 Система для ВЭЖХ, состоящая из насоса, устройства для инжектирования проб, флуориметрического детектора (длина волны возбуждения 295

нм, длина волны регистрации 330 нм) и интегратора или системы обработки данных.

Допускается использование спектрофотометрического детектора, пригодного для проведения измерений при длине волны 292 нм. В этом случае градуировочные растворы и растворы проб должны быть более концентрированными. При использовании спектрофотометрического детектора вероятность помех со стороны матрицы пробы увеличивается.

5.4 Колонки для ВЭЖХ

Для проведения испытаний пригодны нормально-фазовые аналитические колонки, например внутреннего диаметра от 4,0 до 4,6 мм, длиной от 100 до 250 мм, заполненные силикагелем с размером частиц 5 мкм.

Допускается использование колонок других типоразмеров с другим размером частиц. При необходимости для достижения требуемой степени разделения пиков проводят корректировку условий хроматографического разделения.

Критерием применимости аналитических колонок является разделение определяемых аналитов до базовой линии.

Примерами подходящих сорбентов, доступных для приобретения, являются LiChrosorb® Si 60, Spherisorb® Si, Hypersil® Si и Lichrospher® 100 DIOL[1)].

Могут также применяться аналитические колонки с обращенной фазой, например C_{18}, с размером частиц 5 мкм, внутренним диаметром от 4,0 до 4,6 мм, длиной от 100 до 250 мм. Примерами подходящих обращенно-фазовых сорбентов являются Spherisorb® ODS и Hypersil ® ODS[1)]. Большинство обращенно-фазовых сорбентов не разделяют β- и γ-токоферолы. Эти колонки, однако, могут использоваться для разделения α- и δ-токоферолов.

5.5 Устройство для фильтрования, пригодное для установки фильтров

[1)] LiChrosorb® Si 60, Spherisorb® Si, Hypersil® Si, Lichrospher® 100, DIOL Spherisorb ® ODS и Hypersil ® ODS являются примерами коммерчески доступных продуктов. Эта информация приведена для удобства пользователя и не является поддержкой указанных продуктов.

большого и малого размеров для фильтрования подвижной фазы и растворов проб, например с диаметром пор 0,45 мкм.

Примечание – Как правило, фильтрование подвижной фазы и растворов проб через мембранный фильтр перед инжектированием продлевает срок жизни колонок.

5.6 Фильтр для разделения фаз (применяется по выбору пользователя стандарта).

6 Отбор проб

Отбор проб проводят по EN ISO 5555, если данный стандарт применим.

7 Проведение испытаний

7.1 Подготовка пробы к испытаниям

Испытуемую пробу гомогенизируют. Грубые материалы размалывают в подходящей мельнице и тщательно перемешивают. Чтобы исключить длительное воздействие высоких температур, пробу охлаждают.

7.2 Приготовление раствора пробы

Примечание – Важно, чтобы растворы проб при хранении были защищены от света.

7.2.1 Пробы растительных масел и жиров с низким содержанием влаги, содержащие неэтерифицированные токоферолы

7.2.1.1 Растительные масла и жиры (низкое содержание воды)

Изложенный ниже способ применим только к пробам, содержащим неэтерифицированные токоферолы. В противном случае испытания проводят по 7.2.2.

Подготовленную к испытаниям пробу массой 2 г, взвешенную с точностью до 0,1 мг, помещают в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$. Добавляют н-гексан или иной подходящий растворитель и растворяют в нем пробу. Обработка ультразвуком может ускорить процесс растворения. Доводят содержимое колбы до метки тем же растворителем. Подготовленный раствор пробы может быть использован только при анализе методом нормально-фазовой ВЭЖХ. При необходимости раствор пробы разбавляют тем же растворителем

либо готовят новый раствор с использованием подготовленной к испытаниям пробы меньшей массы.

7.2.1.2 Маргарин, сливочное масло

При испытании маргарина и сливочного масла необходимо выделить жир из пробы. Это может быть достигнуто, например, путем смешивания пробы с безводным сульфатом натрия (4.4), добавления н-гексана (4.7) и обработки смеси в ультразвуковой бане. Нерастворившиеся вещества отфильтровывают и не менее двух раз промывают н-гексаном. Растворитель отгоняют на ротационном испарителе при пониженном давлении, остаток растворяют в определенном объеме н-гексана и анализируют методом нормально-фазовой хроматографии.

7.2.2 Прочие продукты

7.2.2.1 Омыление

Подготовленную к испытаниям пробу массой от 2 до 10 г омыляют с обратным холодильником, предпочтительно в атмосфере азота, добавляя при этом необходимое количество этанола (4.3) или метанола (4.1), воды, антиокислителя (4.6), такого как аскорбиновая кислота (АК), гидрохинон, пирогаллол или ВНТ и одного из растворов гидроксида калия (4.5). Спирты и антиокислители добавляют в пробу до добавления раствора гидроксида калия. Можно также добавить сульфид натрия для снижения каталитического эффекта следов металлов.

В таблице 2 приведены примеры подходящих количеств реактивов.

Таблица 2

Масса пробы для испытаний, г	Спирт	Антиокислитель	Гидроксид калия
От 2 до 5	50 $см^3$ метанола	0,25 г АК	5 $см^3$ раствора массовой концентрации 50 г/100 $см^3$
От 5 до 10	100 $см^3$ этанола	1 г АК + 0,04 г Na_2S	20 $см^3$ раствора массовой концентрации 60 г/100 $см^3$
От 10 до 20	150 $см^3$ этанола	1 г АК	50 $см^3$ раствора массовой концентрации 60 г/100 $см^3$

Обычно время омыления составляет от 15 до 40 мин при температуре от 80 °С до 100 °С.

Если по окончании омыления на поверхности охлажденной реакционной смеси присутствует жира или масло, то омыление продолжают после добавления дополнительного количества водно-этанольного раствора гидроксида калия.

7.2.2.2 Экстракция

Чтобы избежать образования эмульсии, раствор пробы после омыления разбавляют таким количеством воды, чтобы в полученном растворе объемное отношение спирта и воды составляло 1:1.

Экстрагируют токоферолы подходящим растворителем (4.7). Для обеспечения надлежащей полноты выделения γ- и δ-токоферолов при использовании н-гексана в качестве экстрагента к нему должна быть добавлена определенная доля полярного растворителя. Для количественной экстракции токоферолов также применяют такие смеси растворителей, как, например, петролейный эфир с добавлением 20 % диэтилового эфира. Для выявления возможных потерь аналита контролируют полноту обнаружения токоферолов[16], [17].

Процедуру экстракции повторяют три-четыре раза, используя порции экстрагента объемом от 50 до 150 $см^3$. Объединенные экстракты промывают водой до нейтральной реакции (два – четыре раза объемом от 50 до 150 $см^3$). Экстракция может также быть осуществлена с использованием патронов для твердофазной экстракции (например, Extrelut ®[1)]) при условии, что содержание токоферолов не слишком мало и содержание жира составляет менее 10 % [18].

7.2.2.3 Концентрирование экстракта

Из экстракта удаляют растворитель путем дистилляции с применением ротационного испарителя (5.2) при пониженном давлении и температуре не

[1)] Extrelut® являются примером коммерчески доступного продукта. Эта информация приведена для удобства пользователя и не является поддержкой указанных продуктов.

выше 50 °С. Предварительно остающиеся следы воды удаляют путем осушения безводным сульфатом натрия (4.4) или отгонки азеотропа с абсолютным этанолом (4.2) или толуолом (4.6). Могут быть использованы другие равноценные способы удаления следов воды, такие как применение фильтра для разделения фаз, при условии, что они не оказывают негативного влияния на результаты испытаний.

7.2.2.4 Разбавление

Остаток растворяют в подвижной фазе (4.8) или в другом, совместимом с подвижной фазой растворителе, причем массовая концентрация отдельных токоферолов в полученном растворе пробы должна составлять от 1 до 10 мкг/см^3.

7.3 Идентификация

Пики токоферолов на хроматограмме раствора пробы идентифицируют по совпадению значений времени удерживания со значениями времени удерживания пиков токоферолов на хроматограммах градуировочных растворов. В качестве альтернаты пики токоферолов на хроматограмме раствора пробы идентифицируют путем ее сопоставления с хроматограммой раствора пробы с добавкой градуировочных растворов.

Примечание – Установлено, что разделение и количественное определение являются удовлетворительными при следующих хроматографических условиях (см. также приложение А, рисунки А.1 и А.2). Другие варианты условий хроматографического анализа приведены в таблице С.1 (приложение С).

Сорбент аналитической колонки: LiChrosorb® Si 60, 5 мкм;

размеры колонки: 125 мм х 4 мм;

подвижная фаза: 3 % (по объему) 1,4-диоксана в н-гексане;

скорость потока подвижной фазы: 1,0 см^3/мин;

объем инжекции: от 10 до 100 мм^3;

условия детектирования: флуориметрическое детектирование при длинах волн возбуждения 295 нм и регистрация 330 нм.

7.4 Количественное определение

В ВЭЖХ-систему (5.3) инжектируют подходящие объемы (до 100 мм^3) градуировочного раствора и раствора пробы. Количественное определение проводят путем соотнесения площади или высоты пика аналита на хроматограмме раствора пробы с аналогичными параметрами пика на хроматограмме градуировочного раствора.

Объемы инжекции раствора пробы и градуировочного раствора должны быть одинаковыми, в противном случае их учитывают при вычислении результата (см. раздел 8). Проверяют соблюдение требования проведения измерений в линейной области градуировочной характеристики.

7.5 Число определений

Следует провести по меньшей мере два независимых определения.

8 Обработка результатов

Вычисление результатов проводят при помощи градуировочной характеристики либо путем применения соответствующей программы интегратора, либо применяют следующий упрощенный способ.

Массовую долю α-, β-, γ- или δ-токоферола ρ, мг/100 г пробы, вычисляют по формуле:

$$\rho = \frac{A_S \cdot c \cdot V \cdot V_{ST}}{A_{ST} \cdot m \cdot V_S \cdot 1000} \cdot 100, \qquad (2)$$

где A_S – площадь или высота пика α-, β-, γ- или δ-токоферола в растворе пробы;

A_{ST} – площадь или высота пика α-, β-, γ- или δ-токоферола в градуировочном растворе;

V – общий объем раствора пробы (7.2.1 или 7.2.2), см^3;

c – массовая концентрация α-, β-, γ- или δ-токоферола в градуировочном растворе (4.11.1 и 4.11.2), мкг/см^3;

m – масса пробы, г;

V_{ST} – объем инжекции градуировочного раствора, мм^3;

V_S – объем инжекции раствора пробы, мм^3;

1000 – множитель для пересчета мкг в мг;

100 – множитель для пересчета массовой доли на 100 г.

Результаты для α-, β-, γ- или δ-токоферола выражаются в мг/100 г пробы. При необходимости расчета активности витамина Е руководствуются [1], [2], [3].

9 Прецизионность

9.1 Общие положения

Данные по прецизионности различных вариантов определения α-токоферола методом ВЭЖХ были исследованы в ходе межлабораторных сравнительных испытаний, организованных в 1994 году Европейской комиссией по нормированию, измерениям и испытаниям на международном уровне [18] с использованием стандартных образцов маргарина (CRM[1)] 122) и сухого молока (CRM 421). Испытания привели к получению статистических результатов, представленных в приложении В. Результаты, полученные при этих международных сравнительных испытаниях, могут быть не применимы к другим диапазонам содержаний определяемых соединений и иным матрицам по сравнению с приведенными в приложении В.

Данные по прецизионности для сухого молока и овсяной муки были установлены в соответствии с ИСО 5725:1986 [19] в ходе межлабораторных сличительных испытаний, организованных на национальном уровне институтом им. Макса фон Петтеркофера Федерального учреждения по здравоохранению (в настоящее время – Федеральный институт защиты здоровья потребителя и ветеринарной медицины) [20]. Результаты, полученные при этих сравнительных испытаниях, могут быть не применимы к другим диапазонам содержаний определяемых соединений и иным матрицам по сравнению с приведенными в приложении В.

9.2 Повторяемость

[1)] CRM - сертифицированный стандартный образец.

Абсолютная разность между двумя единичными результатами испытаний, полученными одним исполнителем на идентичном исследуемом материале на одном и том же оборудовании в течение возможно короткого промежутка времени, может превышать предел повторяемости r не чаще чем в 5 % случаев. Предел повторяемости зависит от содержания определяемых соединений в пробе. Значения приведены ниже:

Маргарин	α-токоферол	$\bar{x} = 24{,}09$ мг/100 г,	$r = 2{,}765$ мг/100 г.
Сухое молоко	α-токоферол	$\bar{x} = 9{,}89$ мг/100 г,	$r = 1{,}130$ мг/100 г.
Сухое молоко	α-токоферол	$\bar{x} = 10{,}2$ мг/100 г,	$r = 0{,}853$ мг/100 г;
	β- токоферол	$\bar{x} = 0{,}081$ мг/100 г,	$r = 0{,}025$ мг/100 г;
	γ- токоферол	$\bar{x} = 1{,}989$ мг/100 г,	$r = 0{,}311$ мг/100 г;
	δ- токоферол	$\bar{x} = 0{,}280$ мг/100 г,	$r = 0{,}082$ мг/100 г.
Овсяная мука	α-токоферол	$\bar{x} = 0{,}279$ мг/100 г,	$r = 0{,}071$ мг/100 г.
	β- токоферол	$\bar{x} = 0{,}057$ мг/100 г,	$r = 0{,}017$ мг/100 г.

9.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя единичными результатами, полученными в двух лабораториях на идентичном исследуемом материале, может превышать предел воспроизводимости R не чаще чем в 5 % случаев. Значения приведены ниже:

Маргарин	α-токоферол	$\bar{x} = 24{,}09$ мг/100 г,	$R = 4{,}18$ мг/100 г.
Сухое молоко	α-токоферол	$\bar{x} = 9{,}89$ мг/100 г,	$R = 1{,}96$ мг/100 г.
Сухое молоко	α-токоферол	$\bar{x} = 10{,}2$ мг/100 г,	$R = 3{,}705$ мг/100 г;
	β- токоферол	$\bar{x} = 0{,}081$ мг/100 г,	$R = 0{,}046$ мг/100 г;
	γ- токоферол	$\bar{x} = 1{,}989$ мг/100 г,	$R = 0{,}978$ мг/100 г;
	δ- токоферол	$\bar{x} = 0{,}280$ мг/100 г,	$R = 0{,}134$ мг/100 г.
Овсяная мука	α-токоферол	$\bar{x} = 0{,}279$ мг/100 г,	$R = 0{,}133$ мг/100 г.
	β- токоферол	$\bar{x} = 0{,}057$ мг/100 г,	$R = 0{,}030$ мг/100 г.

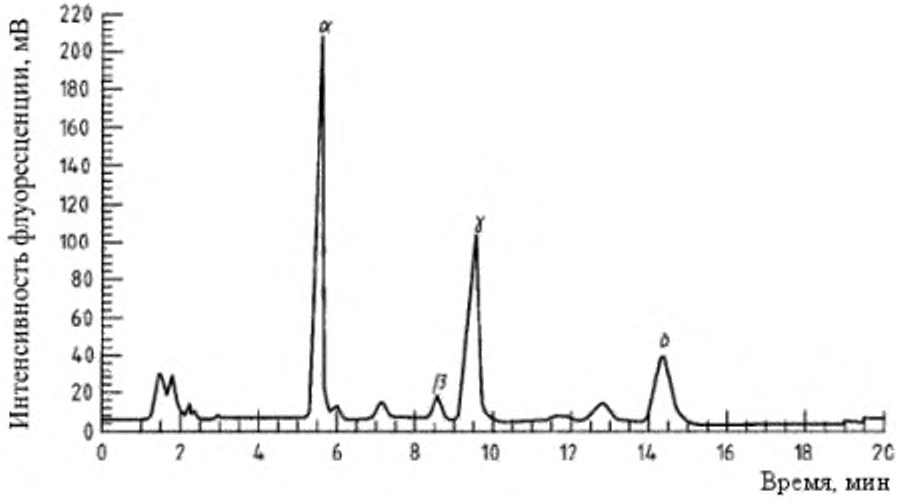
10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать, по меньшей мере, следующие сведения:

- всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
- ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;
- результаты испытаний с указанием единиц измерений, в которых выражен результат;
- дату и способ отбора проб (если он известен);
- дату поступления пробы;
- дату проведения испытаний;
- все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытаний;
- любые применявшиеся операции, не оговоренные в методе или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытаний.

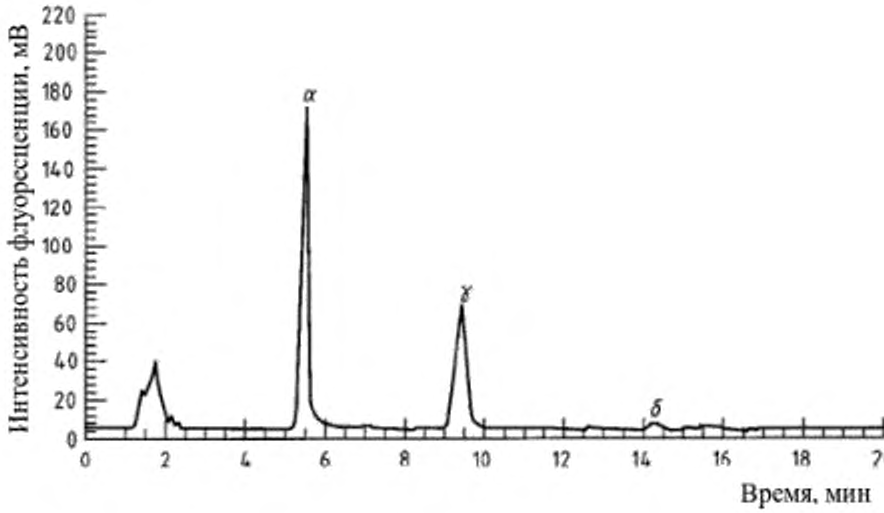
Приложение А
(справочное)

Примеры хроматограмм



Колонка: Lichrosorb® Si 60 (5 мкм);
размеры колонки: 125 х 4 мм;
подвижная фаза: 3 % (по объему) 1,4-диоксана в н-гексане;
скорость потока: 1,0 $см^3$/мин;
детектирование: Флуориметрическое, длина волны возбуждения 295 нм, регистрации 330 нм.

Рисунок А.1 – Пример разделения α-, β-, γ- и δ-токоферолов в пробе маргарина (CRM 122)



Колонка: Lichrosorb® Si 60 (5 мкм);
размер колонки: 125 х 4 мм;
подвижная фаза: 3 % (по объему) 1,4-диоксана в н-гексане;
скорость потока: 1,0 $см^3$/мин;
детектирование: флуориметрическое, длина волны возбуждения 295 нм, регистрации 330 нм.

Рисунок А.2 – Пример разделения α-, β-, γ- и δ-токоферолов в пробе сухого молока (CRM 421)

Приложение В
(справочное)

Данные по прецизионности

Приведенные ниже данные были получены при межлабораторных сравнительных испытаниях различных способов определения витамина Е (α-токоферол), которые были организованы Европейской комиссией по нормированию, измерениям и испытаниям на международном уровне [18].

Таблица В.1

Наименование показателя	Маргарин (CRM 122)	Сухое молоко (CRM 421)
Аналит	α-токоферол	α-токоферол
Год проведения испытаний	1994	1994
Число лабораторий	9	10
Число образцов	1	1
Число лабораторий после исключения выбросов	9	10
Число исключенных лабораторий	0	0
Число принятых результатов	9	10
Общее среднее $\bar{x}$, мг/100 г	24,09	9,89
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,977	0,399
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	4,1	4,0
Предел повторяемости r (2,83 s_r), мг/100 г	2,765	1,130
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	1,477	0,693
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	6,1	7,0
Предел воспроизводимости R (2,83 s_R), мг/100 г	4,180	1,960

Примечание – Данные, установленные в ходе сравнительных испытаний, были получены с использованием различных вариантов метода, которые идентичны применяемым лабораториями рутинным методам, при этом были использованы ВЭЖХ-системы, приведенные в приложении С.

Проведенные в соответствии с ИСО 5725:1986 [19] сравнительные испытания дали результаты, приведенные в таблицах В.2 и В.3. Исследования были проведены отделом химии продуктов питания института им. Макса фон Петтеркофера, Федеральное агентство по здравоохранению, Берлин, Германия [20].

Таблица В.2

Наименование показателя	Сухое молоко			
Аналит	α-токоферол	β-токоферол	γ-токоферол	δ-токоферол
Год проведения испытаний	1993	1993	1993	1993
Число лабораторий	13	12	13	10
Число образцов	5	5	5	5
Число лабораторий после исключения выбросов	12	9	11	8
Число исключенных лабораторий	1	3	2	2
Число принятых результатов	66	51	65	40
Общее среднее $\bar{x}$, мг/100 г	10,2	0,081	1,989	0,280
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,301	0,009	0,110	0,029
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	3,0	11,1	5,5	10,4
Предел повторяемости r (2,83 s_r), мг/100 г	0,853	0,025	0,311	0,082
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	1,31	0,016	0,346	0,047
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	12,8	19,8	17,4	16,8
Предел воспроизводимости R (2,83 s_R), мг/100 г	3,705	0,046	0,978	0,134

Таблица В.3

Наименование показателя	Овсяная мука	
Аналит	α-токоферол	β-токоферол
Год проведения испытаний	1993	1993
Число лабораторий	13	13
Число образцов	5	5
Число лабораторий после исключения выбросов	12	11
Число исключенных лабораторий	1	2
Число принятых результатов	70	64
Общее среднее $\bar{x}$, мг/100 г	0,279	0,057
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/100 г	0,025	0,006
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	9,0	10,5
Предел повторяемости r (2,83 s_r), мг/100 г	0,071	0,016
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/100 г	0,047	0,011
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	16,8	19,3
Предел воспроизводимости R (2,83 s_R), мг/100 г	0,133	0,030

Приложение С
(справочное)

Варианты условий хроматографического анализа

Приведенные в таблице С.1 [18] условия хроматографического анализа гарантированно обеспечивают удовлетворительное качество хроматографического разделения и количественного определения.

Таблица С.1

Колонка (размер частиц)	Размер колонки, мм	Подвижная фаза, объемное соотношение	Скорость потока, $см^3$/мин	Детектирование F: Флуориметрическое UV: Спектрофотометрическое: длина волны детектирования, нм Обращенная фаза: Обращенно-фазовая хроматография Ex: Длина волны возбуждения, нм Em: Длина волны регистрации, нм
Knauer Polygosil® 60-5	250x4,6	н-Гексан + диизопропиловый эфир (80:20)	1,5	F: Ex: 296 Em: 320
Si 60	250x4,6	н-Гексан + пропанол-2 (98:2)	1,5	F: Ex: 284 Em: 330
Silicagel, 5 мкм	100x8	Изооктан + диизопропиловый эфир с 0,15% пропанола-2 (97,5:2,5)	2,0	F: Ex: 295 Em: 330
Lichrospher® Si 100, 5 мкм	250x4	н-Гексан + пропанол-2 (99,85:0,15)	2,5	F: Ex: 290 Em: 330
Lichrosorb® Si 60, 5 мкм	250x4,6	н-Гексан + пропанол-2 (99,3:0,7)	1,2	F: Ex: 290 Em: 330
Lichrosorb® Si 60, 5 мкм	250x4	н-Гексан + 1,4-диоксан (97:3)	1,0	F: Ex: 293 Em: 326
Lichrosorb® Si 60, 5 мкм	250x4	Градиент: 1 % пропанола-2 в н-гептане до 1,5% пропанола-2 в н-гептане за 7 мин	1,0	F: Ex: 290 Em: 327
Amino, 3 мкм	100x4,6	Изооктан + изобутанол (98:2)	1,5	F: Ex: 290 Em: 330
Nucleosil® C_{18}, 5 мкм	250x4	Метанол + вода (97:3)	1,0	UV: 292 Обращенная фаза
P-8, 10 мкм	250x4,6	Ацетонитрил + метанол + вода (50:45:5)	2,0	F: Ex: 293 Em: 326 UV: 290 Обращенная фаза

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование ссылочного европейского регионального стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
EN ISO 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний	–	*
EN ISO 5555 Масла и жиры животные и растительные. Отбор проб	–	*

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного европейского регионального стандарта. Перевод данного европейского регионального стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Библиография

[1] Subcommittee on the Tenth Edition of the RDA's Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council, Recommended Daily Allowances, 10th Edition, National Academy Press, Washington, D.C. 1989

[2] Deutsche Gesellschaft für Ernahrung (DGE): Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr, 5. Überarbeitung 1991

[3] Brubacher, G. und Wiss, O.: The Vitamins, eds. Sebrell & Harris, 5th Edition, Academic Press. New York, 1972, 255

[4] Brubacher, G. et al. Methods for the Determination of Vitamins in Food. Elsevier App. Science Publishers, London, 1985, 97-106/

[5] Gertz, C. und Hermann, K.: Z. Lebensmittelunters. Forsch., 174, 1982, 390 - 394

[6] Nobile, S. und Moor H Lebensmittel Unters. Hyg. 44, 1953. 396

[7] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung der freien individuellen Tocopherole (Tocopherole und Tocotrienole) in Speisefetten and Speiseölen L-13.03?04-1, Nov.1987, in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenannahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegeständen/BGA, Losenblattausgabe, Stand Mai 1998 Bd.1 Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH

[8] Balz, M., Schulte, E. und Thier, H.P.: Fat Sci. Technol. 6. 1992. 209-213

[9] Speek, A.J., Schrijver J. und Schreures, W.H.P.: J. Food Sci. 50, 1985, 121 - 124

[10] Manz, U. und Phillip, K.: Internat. J. Vit. Nutr. Res. 51,1981, 342 - 348

[11] Pocklington, W.D. und Diefenbacher, K.: Pure Appl. Chem. 60, 1988, 877 - 892

[12] Bourgeois, C. Determination of Vitamin E.: Tocopherols and Tocotrienols, Elsevier App. Science Publishers, London, 1992

[13] Lumiey, I.D.: The Technology of Vitamins in Food, ed. by P.B. Ottawa, Blacie Academic & Professional, Glasgow, 1993, 186 - 190

[14] DAB 10, Deutsches Arzneibuch 10.Ausgabe 1991, Stand 1993; Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart

[15] Balz, M., Schulte, E. und Thier, H.-P. A new parameter for checking the suitability of α tocopherol standards, Z. Lebensm. Unters Forsch, 1996, 202, 80 - 81

[16] VDLUFA-Methodenbuch: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Band III, 4. Erg. (im Druck) Kapitel 13.5., Bestimmung von Tocopherolen - HPLC-Verfahren, VDLUFA-Verlag, Darmstadt

[17] Konings, E.J.M., Roomans, H.H S. und Beljaars, P.R. Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Margarine, Infant Foods, and Vegetables, JAOAC, Vol. 79; No 4, 1996, 902 - 906

[18] Finglas, P.M., van den Berg H. & de Froidmont-Gortz, I., 1997. The certification of the mass fractions of vitamins in three reference materials: margarine (CRM 122), milk powder (CRM 421), and lyophilized Brussels sprouts (CRM431). EUR-Report 18039, Commission of the European Union, Luxembourg

[19] ISO 5725:1986 Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by interlaboratory tests

[20] Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Tocopherolen und Tocotrienolen in diätarischen Lebensmitteln L 49.00-5 September 1998/ in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenannahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/Bundesgesundheitsamt, Losenblattausgabe, September 1998 Bd.1 Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: продукты пищевые, определение витамина Е, α-токоферол, β-токоферол, γ-токоферол, δ-токоферол, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, спектрофотометрическое детектирование, флуоресцентное детектирование