



ВОСТОЧНО-СИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИХ И РАДИОТЕХНИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации МВИ

№ 03 - 2002

Методика выполнения измерений массовой концентрации жирорастворимых витаминов в растворах, разработанная Лимнологическим институтом СО РАН и представленная в рекомендации "ГСИ. МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В РАСТВОРАХ. МВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ" аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96. Аттестация проведена по результатам метрологической экспертизы названного документа и анализа погрешностей измерений.

В результате экспертизы установлено, что методика соответствует предъявляемым к ней требованиям и обладает следующими метрологическими характеристиками:

- Объект измерения - растворы жирорастворимых витаминов;
- Измеряемая величина - массовые концентрации витаминов *A*, *D₃*, *E* в растворах;
- Диапазоны измерения массовых концентраций витаминов: *A* - 0,002 ÷ 0,5 г/л,
D₃ - 0,006 ÷ 3,0 г/л,
E - 0,08 ÷ 50 г/л.
- Относительная погрешность измерения массовой концентрации - не более ± 10 %.

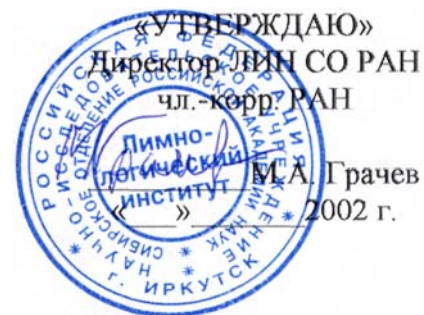
Аттестованная методика выполнения измерений может использоваться в сферах, подлежащих государственному метрологическому контролю и надзору.

Директор ВС НИИФТРИ
Главный метролог



О.И. Гудков
И.А. Соков

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ



РЕКОМЕНДАЦИЯ


ГОСУДАРСТВЕННАЯ СИСТЕМА ОБЕСПЕЧЕНИЯ
ЕДИНСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ
ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В РАСТВОРАХ

МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

МИ № 03-2002

Заведующий отделом

 Г.И. Барам
« » 2002 г.

Главный специалист

 Г.А. Федорова
« » 2002 г.

ИРКУТСК

2002

1. РАЗРАБОТАНА

Лимнологическим институтом Сибирского отделения РАН

Директор	М.А.Грачев
Заведующий отделом	Г.И.Барам
Главный специалист	Г.А.Федорова

2. АТТЕСТОВАНА

Восточно-Сибирским научно-исследовательским институтом физико-технических и радиотехнических измерений

Свидетельство об аттестации МВИ №03-2002 от 25 июля 2002 г.

3. ЗАРЕГИСТРИРОВАНА

Настоящая рекомендация устанавливает методику выполнения измерений массовой концентрации жирорастворимых витаминов *A*, *E* и *D₃* в спиртовых растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в диапазонах, приведенных в таблице 1.

Таблица 1

Витамин	Диапазон измеряемых концентраций, г/л
<i>A</i>	0,002-0,5
<i>D₃</i>	0,006-3,0
<i>E</i>	0,08-50,0

Методика аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-95 Восточно-Сибирским научно-исследовательским институтом физико-технических и радиотехнических измерений.

Свидетельство об аттестации № 03-2002 от 25 июля 2002 г.

1. Нормы погрешности измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью, не превышающей 10 %.

2. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

2.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф "Милихром А-02" с колонкой Ø2x75 мм, упакованной сорбентом Нуклеосил 100-5 С18	ТУ 25-7405.0040-95
Весы аналитические Сарториус ВР-221S, класс точности 1	ГОСТ 24104-88
Механические микродозаторы переменного объема 2-20; 20-200; 200-1000; 1000-5000 мкл	ВІОНІТ PROLINE, Финляндия
Колбы мерные объемом 50 мл	ГОСТ 1770-74
Стандартные вещества производства SIGMA-ALDRICH Chemie, Германия, содержание основного вещества 98%	Номер по каталогу SIGMA, 1999 г
α-Токоферола ацетат (витамин <i>E</i>)	Т 3376
Ретинола ацетат (витамин <i>A</i>)	V 7763
Холекальциферол (витамин <i>D₃</i>)	С 1357

2.2. Вспомогательные устройства

Колбы конические объемом 10 и 100 мл	ГОСТ 25336-82
Сушильный шкаф лабораторный	ГОСТ 13474-79
Холодильник бытовой с морозильной камерой	

2.3. Реактивы

Ацетонитрил для ВЭЖХ, "сорт 0 или 1"	"Криохром", С.-Петербург
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-77
2,6-ди- <i>трет</i> -бутил- <i>пара</i> -крезол (бутилокситолуол, БОТ)	"Sigma", Германия
Метиловый спирт, хч	ГОСТ 6995-77
Кислота серная, хч	ГОСТ 4204-77
Калий двухромовокислый (бихромат), хч	ГОСТ 4220-75

Примечание: Допускается использование средств измерений, оборудования, материалов и реактивов, отличающихся от указанных в перечне, но не уступающих им по характеристикам.

3. Метод измерения

Измерения массовой концентрации жирорастворимых витаминов *A*, *E* и *D₃* в спиртовых растворах выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе "Милихром А-02".

Исследуемый раствор перед проведением хроматографического анализа центрифугируют или фильтруют для удаления механических примесей, затем вводят в хроматограф, где витамины разделяются на колонке с обращенно-фазным сорбентом С18. Хроматограммы записывают одновременно на 6 длинах волн - 260, 270, 280, 290, 300 и 320 нм. Пример получаемой хроматограммы приведен в Приложении 1.

Перед выполнением измерений хроматограф градуируют по градуировочным растворам, приготовленным из стандартных веществ по п.7.4, для расчета спектральных отношений и для установления зависимости между концентрациями определяемых витаминов и площадями их пиков при соответствующей длине волны.

Длина волны определения для каждого из витаминов приведена в таблице 2.

Таблица 2

Витамин	Длина волны определения, нм
<i>A</i>	320
<i>D₃</i>	260
<i>E</i>	290

При проведении измерений полученные величины спектральных отношений используют для идентификации витаминов на хроматограммах исследуемых образцов, а градуировочные характеристики - для расчета массовых концентраций витаминов по площадям их пиков.

4. Требования безопасности

При выполнении измерений по настоящей методике соблюдают требования безопасности, регламентированные:

- руководством по эксплуатации хроматографа "Милихром А-02";
- инструкциями предприятия по технике безопасности по выполняемым видам работ (работа с концентрированными кислотами, метанолом, электрооборудованием);

Все действия с кислотами, работы по очистке реактивов, должны проводиться в вытяжном шкафу.

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица, имеющие квалификацию не ниже лаборанта-химика, навыки и опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение хроматографическим методам анализа, стажировку на хроматографе "Милихром А-02" и изучившие настоящую методику.

6. Условия выполнения измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура воздуха от 15 до 35°С;
- атмосферное давление 84-107 кПа (630-800 мм рт.ст);
- относительная влажность воздуха от 30 до 80%;
- напряжение переменного тока, питающего хроматограф (220±22) В;
- частота питающей сети хроматографа (50±1) Гц.

Место установки хроматографа должно быть удалено от источников тепла и прямых потоков воздуха (сквозняков), во время проведения анализов должна быть исключена возможность попадания прямого солнечного света на хроматограф.

7. Подготовка к выполнению измерений

7.1. Перед выполнением измерений по настоящей методике проводят следующие работы: подготовку (очистку) посуды, растворителей и реактивов; приготовление рабочих растворов; приготовление растворов для градуировки; градуировку хроматографа.

7.2. Подготовка посуды. Используемую при анализе стеклянную посуду моют, последовательно ополаскивают хромовой смесью, водопроводной, дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 120-150°C. Полипропиленовые наконечники для дозаторов обрабатывают аналогичным образом и сушат в сушильном шкафу при температуре 60°C.

7.3. Приготовление рабочих растворов

7.3.1. *Раствор бутилокситолуола в метаноле, 0,1%, по массе.* В мерную колбу объемом 50 мл берут навеску $0,04 \pm 0,001$ мг бутилокситолуола, растворяют в половинном объеме метанола и доводят до метки метанолом. Хранят в холодильнике.

7.3.2. *Раствор бутилокситолуола в метаноле, 0,001%, по массе.* В мерную колбу объемом 100 мл с помощью механического дозатора помещают 1 мл раствора бутилокситолуола в метаноле, приготовленного по п.7.3.1, и доводят до метки метанолом. Хранят в холодильнике.

7.4. Приготовление градуировочных растворов

7.4.1. *Исходный раствор витамина А для градуировки, 1,0 г/л.* В коническую колбу объемом 10 мл берут навеску $0,010 \pm 0,001$ г ретинол-ацетата, и с помощью механического дозатора добавляют такой объем метанола, приготовленного по п.7.3.2, чтобы концентрация ретинол-ацетата в растворе составила 1,0 г/л. Объем метанола рассчитывают по формуле

$$V = 1000 \frac{m}{C}, \text{ где}$$

V - объем метанола, мл; m - масса навески, г; C - концентрация раствора, г/л.

Раствор хранят в морозильной камере не более 2-х недель.

7.4.2. *Исходный раствор витамина Е для градуировки, 50 г/л.* В коническую колбу объемом 10 мл берут навеску $0,500 \pm 0,005$ г α -токоферол-ацетата и с помощью механического дозатора добавляют такой объем метанола, приготовленного по п.7.3.2, чтобы концентрация α -токоферол-ацетата в растворе составила 50 г/л. Объем метанола рассчитывают по формуле, как в п.7.4.1. Раствор хранят в морозильной камере не более 2-х недель.

7.4.3. *Исходный раствор витамина D₃ для градуировки, 1 г/л.* В коническую колбу объемом 10 мл берут навеску $0,010 \pm 0,001$ г витамина D₃ и с помощью механического дозатора добавляют такой объем метанола, приготовленного по п.7.3.2, чтобы концентрация витамина D₃ в растворе составила 1,0 г/л. Объем метанола рассчитывают по формуле, как в п.7.4.1. Раствор хранят в морозильной камере не более 2-х недель.

7.4.4. *Головной раствор жирорастворимых витаминов для градуировки, содержащий 0,5 г/л витамина А, 0,2 г/л витамина D₃, 10 г/л витамина Е.* В коническую колбу объемом 10 мл с помощью механического дозатора вносят 5 мл исходного раствора витамина А для градуировки с концентрацией 1.0 г/л, приготовленного по п. 7.4.1, 2 мл исходного раствора витамина Е для градуировки с концентрацией 50 г/л, приготовленного по п. 7.4.2, 2 мл раствора витамина D₃ с концентрацией 1 г/л, приготовленного по п. 7.4.3 и 1 мл метанола, приготовленного по п.7.3.2. Готовят перед использованием.

7.4.5. *Рабочие растворы жирорастворимых витаминов для градуировки.* Рабочие растворы жирорастворимых витаминов для градуировки хроматографа готовят в конических колбах вместимостью 10 мл. Для этого в каждую колбу с помощью механического дозатора вносят головной раствор для градуировки и метанол, приготовленный по п.7.3.2 в соответствии с таблицей 3. В качестве градуировочного раствора № 1

используют головной раствор для градуировки.

Таблица 3

Номер рабочего раствора для градуировки		1	2	3
Объем головного раствора для градуировки, мл			2	1
Объем метанола, мл			2	3
Концентрация витамина в рабочем растворе для градуировки, г/л	Витамин <i>A</i>	0.5	0.25	0.125
	Витамин <i>D₃</i>	0.2	0.1	0.05
	Витамин <i>E</i>	10	5	2.5

7.5. Градуировка хроматографа

7.5.1. Градуировочную характеристику устанавливают по рабочим растворам для градуировки, приготовленных по п.7.5.5 для жирорастворимых витаминов.

7.5.2. Для каждого рабочего раствора для градуировки проводят по два параллельных определения по п. 8.1.1.

7.5.3. Каждую хроматограмму обрабатывают в соответствии с компьютерной программой, определяя времена удерживания, спектральные отношения и площади пиков.

7.5.4. Рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации.

7.5.5. Экспериментальные данные обрабатывают в соответствии с программой и рассчитывают уравнение градуировочной зависимости в виде

$$S_i = A_i + B_i C_i, \text{ где}$$

где S_i - площадь пика витамина в условных единицах; C_i - концентрация соответствующего витамина в градуировочном растворе, г/л; A_i, B_i - коэффициенты регрессии.

Рассчитывают коэффициент корреляции. В случае, если коэффициент корреляции меньше 0,92, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, устраняют их и повторяют эксперимент.

8. Выполнение измерений

8.1. Определение массовой концентрации жирорастворимых витаминов *A*, *E* и *D₃* в предварительно профильтрованном исследуемом растворе выполняют следующим образом:

8.1.1. 2 мкл исследуемого раствора вводят в подготовленный к работе жидкостный хроматограф и записывают хроматограмму в следующих условиях:

Элюент А:	Дистиллированная вода
Элюент Б:	MeCN
Градиент	90% Б - 5,5 мин; от 90 до 100% Б за 6,5 мин; 100% Б - 5 мин
Скорость подачи элюента:	100 мкл/мин.
Предпроба	Элюент А
Объем предпробы	5 мкл
Длины волн детектора:	260, 270, 280, 290, 300 и 320 нм.
Время интегрирования:	0,34 с.
Температура:	35°C

8.1.2. Проводят идентификацию хроматографических пиков по п.8.2.

8.1.3. В случае положительного результата идентификации грубо оценивают концентрацию витаминов *A*, *E* и *D₃* в исследуемом растворе.

Массовая концентрация витаминов *A*, *D₃* и *E* в исследуемом растворе не должна превышать 0,5 г/л для витамина *A* и/или 3 г/л для витамина *D₃*, и/или 50 г/л для витамина *E*. В случае превышения раствор с помощью механического дозатора разбавляют метанолом с БОТ, приготовленным по п.7.3.2 в рассчитанное количество раз и проводят

хроматографический анализ разбавленного раствора. Если массовая концентрация витаминов *A*, *D₃* и *E* в исследуемом растворе ниже, чем 0,005 г/л для витамина *A* и/или 0,002 г/л для витамина *D₃*, и/или 0,2 г/л для витамина *E*, объем вводимой в хроматограф пробы необходимо увеличить до 10 мкл.

8.2. Идентификацию пиков хроматограммы исследуемого раствора проводят сравнением с хроматограммой рабочего раствора для градуировки по двум параметрам: времени удерживания и спектральному отношению *R*.

8.2.1. Если времена удерживания и спектральные отношения пиков хроматограммы исследуемого раствора совпадают в пределах допустимых отклонений ($\Delta R \leq 0,05$, $\Delta t_R \leq 3\%$) с временами удерживания и спектральными отношениями соответствующих им пиков хроматограммы раствора для градуировки, результат идентификации считают положительным.

8.2.2. Если спектральные отношения совпадают в пределах допустимого отклонения, а разница времен удерживания пиков хроматограммы исследуемого раствора и хроматограммы раствора для градуировки больше допустимого отклонения, проводят хроматографический анализ соответствующего раствора для градуировки по п.8.1.1 и сравнивают времена удерживания. В случае совпадения в дальнейшем используют новую хроматограмму в качестве образца.

В случае повторного несовпадения времен удерживания используют метод добавок, для чего к исследуемому раствору добавляют известные количества определяемых витаминов с концентрацией, сравнимой с концентрацией "сомнительных" пиков и анализируют в точном соответствии с прописью методики.

Если на хроматограмме пробы с добавкой площади "сомнительных" пиков увеличились на величину, соответствующую величине добавки, эти пики относятся к определяемым компонентам.

Если на хроматограмме пробы с добавкой наряду с "сомнительными" пиками присутствуют пики, времена удерживания и спектральные отношения которых совпадают с соответствующими параметрами добавленных компонентов, сомнительные пики не относятся к определяемым компонентам.

8.2.3. Если времена удерживания соответствующих пиков хроматограммы исследуемого раствора и хроматограммы раствора для градуировки совпадают в пределах допустимого отклонения, а разница спектральных отношений больше допустимого отклонения, настоящая методика неприменима к данному образцу.

9. Обработка результатов измерений

9.1. Обработку результатов измерений проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации к компьютерной программе.

9.2. Массовую концентрацию витамина в растворе рассчитывают по соответствующему градуировочному уравнению.

9.3. Допустимое расхождение между результатами двух параллельных измерений не должно превышать норматив *d*, приведенный в таблице 4.

Таблица 4

Витамин	Допускаемое расхождение <i>d</i> , % ($\alpha=0,05$, $n=2$)	Доверительный интервал ΔC , % ($P=0,95$, $n=2$)
<i>A</i>	3	10
<i>E</i>		
<i>D₃</i>		

Если $|C_{i,1} - C_{i,2}| \leq d$, результаты измерения усредняют:

$$\bar{C}_i = \frac{C_{i,1} + C_{i,2}}{2}$$

В случае превышения норматива d эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам анализа, устраняют их и повторяют эксперимент.

10. Оформление результатов анализа

Результат измерений оформляют записью в журнале и выдают в виде

$$C(z/l) = \bar{C} \pm \Delta C$$

где ΔC - доверительный интервал, указанный в таблице 4.

11. Контроль точности измерений

11.1. Оперативный контроль сходимости.

Оперативный контроль сходимости осуществляют постоянно путем оценки расхождения параллельных результатов по п.9.3.

11.0.2. Оперативный контроль точности

Оперативный контроль точности осуществляют 1 раз в месяц методом добавок, для чего к исследуемому раствору добавляют известные количества определяемых компонентов и анализируют в точном соответствии с прописью методики.

Результаты считают удовлетворительными, если выполняется соотношение

$$\left| \bar{C}_{доб} - \bar{C} - \mu \right| \leq K ,$$

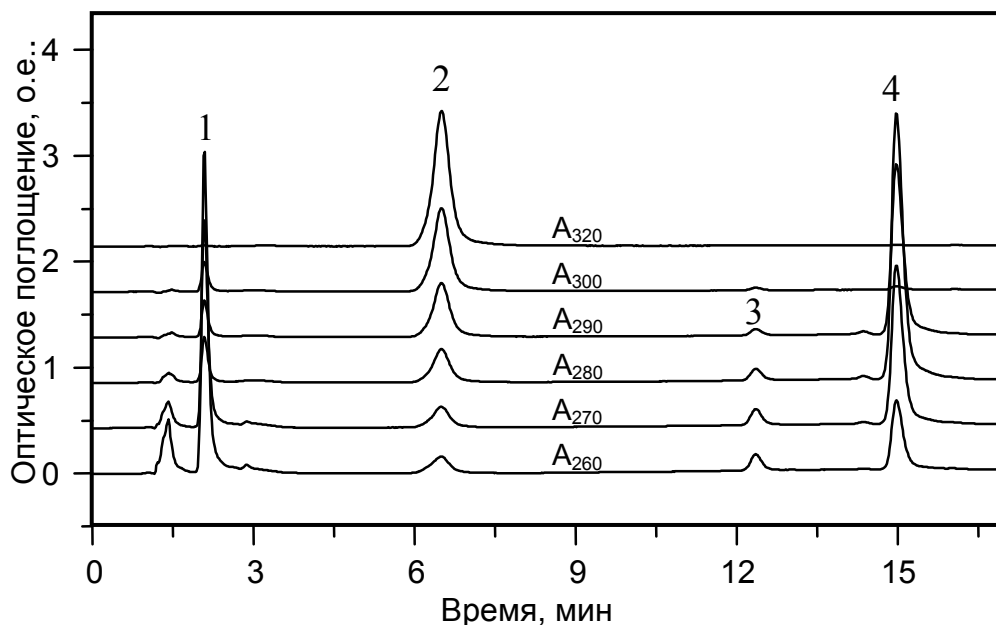
где $\bar{C}_{доб}$ - результат анализа пробы с добавкой; \bar{C} - результат анализа пробы без добавки; μ - величина добавки; K - норматив оперативного контроля.

Норматив оперативного контроля рассчитывают по формуле

$$K = 0,84 \sqrt{(\Delta C_{доб})^2 + (\Delta C)^2} ,$$

где $\Delta C_{доб}$ и ΔC - доверительные интервалы проб с добавкой и без добавки, соответственно.

Если соотношение не выполняется, повторяют эксперимент. При повторном превышении норматива K выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам анализа, устраняют их и повторяют эксперимент. При необходимости проводят переградуировку хроматографа.



Хроматограмма раствора, содержащего жирорастворимые витамины:
1– БОТ; 2–*A* (ретинол-ацетат); 3– *D*₃; 4– *E* (α-токоферол-ацетат)

Времена удерживания и спектральные отношения витаминов *A*, *D*₃, *E*.

Витамин	t_R , мин	Спектральные отношения (R)				
		S_{260}/S_{320}	S_{270}/S_{320}	S_{280}/S_{320}	S_{290}/S_{320}	S_{300}/S_{320}
<i>A</i> -ацетат	6,50	S_{260}/S_{320}	S_{270}/S_{320}	S_{280}/S_{320}	S_{290}/S_{320}	S_{300}/S_{320}
		0,133	0,160	0,250	0,404	0,620
<i>E</i> -ацетат	14,97	S_{260}/S_{290}	S_{270}/S_{290}	S_{280}/S_{290}	S_{300}/S_{290}	S_{320}/S_{290}
		0,401	0,920	1,541	0,022	0,004
<i>D</i> ₃	12,36	S_{270}/S_{260}	S_{280}/S_{260}	S_{290}/S_{260}	S_{300}/S_{260}	S_{320}/S_{260}
		0,994	0,733	0,402	0,152	0,013

Значения в таблице даны в качестве примера. Для других колонок и хроматографов они могут отличаться.