

---

ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ  
(EASCC)

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

---



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

**ГОСТ EN**  
**12823-1**

*(проект, ВУ,  
первая редакция)*

---

## **ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ**

**Определение содержания витамина А  
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

**Часть 1**

**Измерение количества полного Е-ретинола и 13-Z-ретинола**

**(EN 12823-1:2014, IDT)**

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

# ГОСТ EN 12823-1

(проект, ВУ, первая редакция)

## 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 основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены».

### Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4.

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_ г.)

За принятие стандарта проголосовали:

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

4 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 12823-1:2014 Foodstuffs – Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography – Part 1: Measurement of all-E-retinol and 13-Z-retinol (Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Часть 1. Измерение количества полного Е-ретинола и 13-Z-ретинола).

Европейский стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

Официальные экземпляры европейского стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и европейских стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Госстандарте Республики Беларусь.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочного европейского стандарта соответствующий ему межгосударственный стандарт, сведения о котором приведены в дополнительном приложении ДА.

5 ВЗАМЕН ГОСТ EN 12823-1-2014

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

## **ГОСТ EN 12823-1**

*(проект, ВУ, первая редакция)*

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

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

**Содержание**

Введение .....  
1 Область применения .....  
2 Нормативные ссылки .....  
3 Сущность метода.....  
4 Реактивы .....  
5 Оборудование .....  
6 Методика проведения испытания .....  
7 Вычисление .....  
8 Прецизионность .....  
9 Протокол испытания.....  
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм .....  
Приложение В (справочное) Данные прецизионности.....  
Приложение С (справочное) Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии .....  
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочного европейского стандарта межгосударственному стандарту .....  
Библиография.....

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й   С Т А Н Д А Р Т

---

**ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ**

**Определение содержания витамина А  
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии  
Часть 1**

**Измерение количества полного Е-ретинола и 13-Z-ретинола**

Foodstuffs  
Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography  
Part 1  
Measurement of all-E-retinol and 13-Z-retinol

---

Дата введения — \_\_\_\_\_

### 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания витамина А в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод был подтвержден в ходе межлабораторного исследования образцов маргарина и сухого молока с содержанием полного Е-ретинола в диапазоне от 653 до 729 мкг/100 г и 13-Z-ретинола в диапазоне от 30 до 39 мкг/100 г. Определение содержания витамина А осуществляется посредством измерения содержания полного Е-ретинола, 13-Z-ретинола и β-каротина. Метод, установленный в настоящем стандарте распространяется на измерение содержания полного Е-ретинола и 13-Z-ретинола.

Экстракт, полученный после омыления, проводимого при проведении метода, установленного в настоящем стандарте, может быть использован для определения содержания β-каротина в соответствии с методом, установленным в EN 12823-2:2000 «Продукты пищевые. Определение содержания витамина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Часть 2. Определение содержания β-каротина». В этом случае предпочтительно, чтобы температура омыления не превышала 80 °С, чтобы предотвратить изомеризацию и окисление β-каротина.

### 2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения).

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

### 3 Сущность метода

Ретинол омыляют с помощью метанольного или этанольного раствора гидроксида калия и экстрагируют посредством соответствующего растворителя. Определение проводят методом ВЭЖХ с флуориметрическим (Ф) или ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Вещества идентифицируют на основании времени их удерживания и количественно определяют с помощью метода внешнего стандарта по площадям или высотам пиков [1] – [4]

### 4 Реактивы

Для проведения анализа, если не указано иное, используют только реактивы признанной аналитической степени чистоты и воду не ниже первой степени чистоты по EN ISO 3696.

#### 4.1 Метанол

4.2 Этанол абсолютный, объемная доля, φ (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) = 100 %.

4.3 Этанол, φ (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) = 96 %.

4.4 Сульфат натрия, безводный.

## ГОСТ EN 12823-1

(проект, ВУ, первая редакция)

**4.5 Раствор гидроксида калия (КОН) для омыления** в соответствующих массовых концентрациях, например  $\rho(\text{КОН}) = 50 \text{ г/100 мл}$  или  $60 \text{ г/100 мл}$ , или спиртовые растворы, например  $28 \text{ г КОН}$  в  $100 \text{ мл}$  смеси объемных частей этанола и воды  $9 : 1$ .

**4.6 Антиоксиданты**, например, аскорбиновая кислота (АК), аскорбат натрия, сульфид натрия ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), бутилгидрокситолуол (БГТ), пирогаллол или гидрохинон.

**4.7 Растворители и растворители для экстракции**, например, диэтиловый эфир (без пероксида), диизопропиловый эфир, петролейный эфир (с диапазоном температуры кипения  $40 \text{ }^\circ\text{C} - 60 \text{ }^\circ\text{C}$ ), *n*-гексан, бутанол, изооктан или соответствующие смеси из перечисленных веществ.

### 4.8 Подвижные фазы ВЭЖХ

Примеры соответствующих смесей (в объемных долях) включают:

- *n*-гексан и 2-пропанол (98 : 2);
- *изо*-октан и 2-пропанол (98,5 : 1,5);
- *изо*-октан и *изо*-бутанол (98 : 2);
- *n*-гексан и *n*-бутанол (98 : 2);
- 2-пропанол и *n*-гептан, градиент от (0,5 : 99,5) до (8,5 : 91,5) за 12 мин.

### 4.9 Стандартные вещества

#### 4.9.1 Общие положения

Полный Е-ретинол (полный Е-витамин А, спиртовая форма) и 13-*Z*-ретинол существуют в нескольких формах и могут быть приобретены у различных поставщиков. Поэтому необходимо определить концентрацию стандартного раствора спектрометрически (4.10.4). Если используются сложные эфиры витамина (например, ретинил пальмитат или ацетат), то их концентрацию проверяют после омыления (6.3.1). Витамин А и его производные чувствительны к кислороду и свету. Стандартные вещества следует хранить в защищенном от света месте в атмосфере азота или аргона при температуре минус  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Особое внимание следует уделить информации о содержании витамина А в стандартных веществах, поставляемых различными производителями.

**4.9.2 Полный Е-ретинол**, спиртовая форма витамина А,  $\text{M}(\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}) = 286,5 \text{ г/моль}$ , со степенью чистоты не менее 90 %.

#### 4.9.3 Сложные эфиры витамина А

**4.9.3.1 Ретинил пальмитат**, витамин А, пальмитат,  $\text{M}(\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_2) = 524,9 \text{ г/моль}$ .

**4.9.3.2 Ретинил ацетат**, витамин А, ацетат,  $\text{M}(\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2) = 328,5 \text{ г/моль}$ , со степенью чистоты не менее 90 %.

**4.9.4 13-*Z*-ретинол**,  $\text{M}(\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}) = 286,5 \text{ г/моль}$ , со степенью чистоты не менее 60 %, для качественного определения.

### 4.10 Основные и стандартные растворы

#### 4.10.1 Основной раствор полного Е-ретинола

Взвешивают около  $50 \text{ мг}$  полного Е-ретинола (4.9.2) с точностью до  $1 \text{ мг}$  в мерной колбе вместимостью  $100 \text{ мл}$ , растворяют в *n*-гексане или другом подходящем растворителе (4.7) и объем содержимого колбы доводят до метки тем же растворителем. Основной раствор содержит приблизительно  $0,5 \text{ мг/мл}$  полного Е-ретинола.

В качестве альтернативы, взвешивают около  $100 \text{ мг}$  ретинила пальмитата (4.9.3.1) или  $50 \text{ мг}$  ретинила ацетата (4.9.3.2) с точностью до  $1 \text{ мг}$  в мерной колбе вместимостью  $100 \text{ мл}$  и объем содержимого колбы доводят до метки. Концентрации основного раствора, в ретиноловом эквиваленте, составляют приблизительно  $0,55 \text{ мг/мл}$  и  $0,44 \text{ мг/мл}$  соответственно.

Могут использоваться массы и объемы, отличающиеся от вышеуказанных, в соответствии с хроматографическим разделением и количественным определением.

Хранят основной раствор в защищенном от света месте при температуре около минус  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Максимальное время хранения основного раствора при соблюдении указанных условий хранения должно быть установлено пользователем настоящего стандарта на основе испытания раствора на стабильность.

#### 4.10.2 Основной раствор 13-*Z*-ретинола

Взвешивают около  $1 - 2 \text{ мг}$  13-*Z*-ретинола (4.9.4) с точностью до  $0,1 \text{ мг}$  в мерную колбу вместимостью  $100 \text{ мл}$ , растворяют в абсолютном этаноле (4.2) или в другом подходящем растворителе и объ-

ем содержимого колбы доводят до метки. Раствор содержит приблизительно от 10 до 20 мкг/мл 13-Z-ретинола, и используют его только для идентификационных целей.

#### 4.10.3 Стандартный раствор полного Е-ретинола

Пипеткой переносят 5 мл основного раствора полного Е-ретинола (4.10.1) в мерную колбу вместимостью 100 мл и объем содержимого колбы доводят до метки *n*-гексаном (4.7) или другим подходящим растворителем, совместимым с подвижной фазой. Пипеткой переносят 5 мл данного раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл и объем содержимого колбы доводят до метки тем же растворителем. Концентрация полного Е-ретинола в стандартном растворе приблизительно равна 2,5 мкг/мл. Затем проводят проверку концентрации и чистоты раствора в соответствии с 4.10.4.

В качестве альтернативы для приготовления стандартного раствора можно использовать основные растворы ретинил пальмитата или ретинил ацетата (4.10.1). В этом случае омыление аликвотных объемов основных растворов проводят в условиях, описанных в 6.3.1. После экстракции и выпаривания повторно растворяют остаток в *n*-гексане или ином подходящем растворителе и проводят определение концентрации в соответствии с 4.10.4.

Хранят стандартный раствор в защищенном от света месте при температуре не выше 4 °С. Максимальное время хранения стандартного раствора при соблюдении указанных условий хранения должно быть установлено пользователем настоящего стандарта на основе испытания раствора на стабильность.

#### 4.10.4 Определение концентрации и испытание на чистоту

Готовят стандартный раствор полного Е-ретинола в этаноле и измеряют оптическую плотность в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при максимальной длине волны от 325 до 326 нм с использованием этанола в качестве раствора сравнения.

Вычисляют массовую концентрацию полного Е-ретинола  $\rho_{\text{all-E}}$ , мкг/мл, по формуле

$$\rho_{\text{all-E}} = \frac{A_{\text{all-E}} \cdot M_{\text{all-E}} \cdot 10^3}{\epsilon_{\text{all-E}}} \cdot P \quad (1)$$

Вычисляют массовую концентрацию 13-Z-ретинола  $\rho_{13-Z}$ , мкг/мл, по формуле

$$\rho_{13-Z} = \frac{A_{13-Z} \cdot M_{13-Z} \cdot 10^3}{\epsilon_{13-Z}} \cdot P, \quad (2)$$

где  $A_{\text{all-E}}$  – значение абсорбции при максимальной длине волны от 325 до 326 нм;

$M_{\text{all-E}}$  – молярная масса полного Е-ретинола (286,5 г/моль);

$\epsilon_{\text{all-E}}$  – коэффициент молярной экстинкции (52400) для полного Е-ретинола, растворенного в этаноле, рассчитанный исходя из значения  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ , равного 1830 [5] и округленного до трех значащих цифр. Данное значение может изменяться в зависимости от вида используемого растворителя;

$A_{13-Z}$  – значение абсорбции при максимальной длине волны 328 нм;

$M_{13-Z}$  – молярная масса 13-Z-ретинола (286,5 г/моль);

$\epsilon_{13-Z}$  – коэффициент молярной экстинкции (48300) для 13-Z-ретинола, растворенного в этаноле, рассчитанный исходя из значения  $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ , равного 1686 [5] и округленного до трех значащих цифр. Данное значение может изменяться в зависимости от вида используемого растворителя;

$P$  – поправочный коэффициент для чистоты полного Е-ретинола или 13-Z-ретинола, определенный с помощью ВЭЖХ и рассчитанный по формуле

$$P = \frac{B}{B_{\text{total}}}, \quad (3)$$

где  $B$  – площадь пика или высота стандартного раствора полного Е-ретинола или 13-Z-ретинола (4.10.3);

$B_{\text{total}}$  – суммарная площадь пиков или высот стандартного раствора полного Е-ретинола или 13-Z-ретинола (4.10.3).

При использовании стандартных веществ витамина А, вновь приобретенного или хранящегося в течение длительного периода, проверяют, находится ли значение максимальной абсорбции стандартного раствора полного Е-ретинола (4.10.3) в диапазоне длин волн между 325 и 326 нм, используя соответствующий спектрометр.

Для дальнейшей проверки показателей витамина А измеряют оптическую плотность стандартного раствора в кварцевой кювете (5.1) при длине волны 300, 325, 350 и 370 нм с использованием

## ГОСТ EN 12823-1

(проект, ВУ, первая редакция)

2-пропанола (или другого подходящего растворителя, см. 4.7) в качестве раствора сравнения. Определяют следующее соотношение для каждой длины волны:

$$\frac{E}{E_{325}} \text{ для полного E-ретинола.}$$

Если это соотношение не превышает 0,602 (300 нм), 0,452 (350 нм) и 0,093 (370 нм) для спиртовой формы витамина А, то стандартное вещество пригодно для использования [6], [7].

Для ретинил пальмитата (4.9.3.1) определяют соотношение  $E/E_{326}$  при длине волн 300, 350 и 370 нм с использованием 2-пропанола (или другого подходящего растворителя) в качестве раствора сравнения. Если соотношение не превышает 0,593 (300 нм), 0,537 (350 нм) и 0,142 (370 нм), то стандартное вещество пригодно для использования по [6], [7], [8].

## 5 Оборудование

Используют стандартное лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

**5.1 УФ-ВОС спектрометр**, пригодный для измерения оптической плотности при определенной длине волны, с кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 1 см.

**5.2 Роторный испаритель**, с водяной баней и вакуумным насосом. Рекомендуется использовать азот для восстановления атмосферного давления.

**5.3 Система ВЭЖХ**, состоящая из насоса, устройства для ввода пробы, УФ-ВОС детектора или флуоресцентного детектора и устройства для интеграции/обработки данных.

### 5.4 Колонки для ВЭЖХ

Применяют аналитические стандартные колонки, например, LiChrospher® Si 60 <sup>1)</sup> (5 мкм, 250 × 4 мм) и LiChrosorb® Si 60 <sup>1)</sup> (5 мкм, 250 × 4 мм и 125 × 4 мм). Критерий выбора подходящей колонки основан на разделении полного E-ретинола и 13-Z-ретинола.

Допускается использовать колонки других типов и размеров, отличающиеся от установленных в настоящем стандарте. Для таких колонок должны быть подобраны условия для проведения хроматографии, чтобы гарантировать получение эквивалентных результатов.

### 5.5 Устройство для фильтрования

Чтобы отфильтровать подвижные фазы ВЭЖХ и растворы проб, используют устройства для фильтрации крупных и небольших размеров соответственно, например, с размером пор 0,45 мкм.

*Примечание* – Фильтрация подвижной фазы, а также раствора анализируемой пробы через мембранный фильтр перед использованием или введением увеличивает долговечность колонок.

**5.6 Экстракционные колонки** (дополнительные), например, Extrelut® <sup>1)</sup> [1].

**5.7 Фильтры для разделения фаз** (дополнительные).

## 6 Методика проведения испытания

### 6.1 Общие положения

Витамин А чувствителен к УФ-излучению и окислителям (например, атмосферному кислороду). Поэтому необходимо исключить воздействие УФ-света (используя посуду из темного стекла, алюминиевую фольгу или УФ-абсорбционные материалы) и кислорода (промывание азотом) при работе с ним. В частности, воздух над жидкостью при омылении должен быть вытеснен слоем азота. Испарение растворителей должно проводиться при пониженном давлении с использованием ротационного испарителя (5.2) при температуре не выше 50 °С.

### 6.2 Приготовление пробы

Анализируемую пробу гомогенизируют. Измельчают грубый материал при помощи мельницы и тщательно перемешивают. Чтобы предотвратить длительное воздействие на пробу высокой температуры, ее необходимо предварительно охладить.

---

<sup>1)</sup> LiChrospher® Si 60, LiChrosorb® Si 60, Extrelut® являются примерами продукции, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой указанной продукции со стороны CEN.



### 6.3 Приготовление раствора пробы

#### 6.3.1 Омыление

Омыляют от 2 до 20 г анализируемой пробы желательно в атмосфере азота, используя соответствующее количество метанола (4.1) или этанола (4.3), антиоксиданты (4.6) (необязательно) и один из растворов гидроксида калия (4.5). Если используют такие антиоксиданты, как аскорбиновая кислота (АК), пирогаллол или бутилгидрокситолуол, то их необходимо добавлять к пробе перед внесением раствора гидроксида калия. Можно также добавить сульфид натрия, чтобы устранить влияние окислительного каталитического воздействия следовых количеств металлов.

Примеры подходящих соотношений реагентов, которые использовались лабораториями в ходе проведения валидационного исследования, приведены в таблице 1 (для получения дополнительной информации см [3]).

Т а б л и ц а 1 – Примеры подходящих соотношений реагентов

Масса пробы, г	Спирт	Антиоксидант	Гидроксид калия
От 2 до 5 включ.	50 мл метанола	0,25 г АК	5 мл раствора с концентрацией 50 г/100 мл
Св. 5 « 10 «	100 мл этанола	1 г АК + 0,04 г Na <sub>2</sub> S	20 мл раствора с концентрацией 60 г/100 мл
« 10 « 20 «	150 мл этанола	1 г АК	50 мл раствора с концентрацией 60 г/100 мл

Омыление обычно длится от 15 до 45 мин при температуре от 80 °С до 100 °С. Если экстракт будет использован для определения β-каротина в соответствии с EN 12823-2, температура при омылении по возможности не должна превышать 80 °С, чтобы предотвратить изомеризацию и окисление β-каротина.

П р и м е ч а н и е - Омыление также может быть проведено при комнатной температуре при перемешивании в течение ночи (приблизительно 16 ч) при других аналогичных условиях или с использованием микроволновой печи [9]. Указанные процедуры не были проверены в межлабораторном исследовании.

Если после омыления и охлаждения на поверхности омыленной смеси присутствует жир или масло, добавляют дополнительное количество этанолового раствора гидроксида калия и увеличивают продолжительность омыления.

#### 6.3.2 Экстрагирование

Во избежание образования эмульсии количество воды, которую добавляют в омыленный раствор пробы, должно быть таким, чтобы соотношение спирта к воде в конечном растворе было 1:1.

Экстрагирование ретинола из омыленного раствора пробы проводят соответствующим растворителем или соответствующей смесью растворителей (4.7) и процедуру повторяют 3 – 4 раза с объемами растворителя от 50 до 150 мл. Промывают комбинированные экстракты водой до нейтральной среды (2 – 4 раза, объем воды от 50 до 150 мл).

П р и м е ч а н и е - Экстрагировать также можно с помощью системы твердофазной экстракции, жидкостной экстракции (например, Extrelut®), если содержание ретинола не очень низкое и содержание жира в пробе меньше 10 % [1]. Указанная процедура не была проверена в межлабораторном исследовании.

#### 6.3.3 Выпаривание

Следы воды удаляют высушиванием с сульфатом натрия (4.4) и/или используют фильтровальную бумагу для разделения фаз (5.5) перед выпариванием или посредством азеотропной перегонки с абсолютным этанолом (4.2) после выпаривания.

Экстракт выпаривают при пониженном давлении и температуре не более 50 °С, используя ротационный испаритель (5.2). Остатки растворителя удаляют под струей азота, чтобы предотвратить потерю ретинола.

#### 6.3.4 Разведение

Незамедлительно, повторно растворяют остаток, предпочтительно используя подвижную фазу (4.8), или другой растворитель, совместимый с ВЭЖХ, для получения соответствующей концентрации для ввода в колонку ВЭЖХ (5.4). Полученный раствор является анализируемой пробой.

## ГОСТ EN 12823-1

(проект, ВУ, первая редакция)

### 6.4 Приготовление градуировочных растворов

Используя стандартные растворы (4.10.3), готовят градуировочные растворы для ВЭЖХ, используя соответствующие растворители, охватывающие необходимый диапазон измерения.

### 6.5 Идентификация и проверка чистоты

Определяют полный Е-ретинол и 13-Z-ретинол, сравнивая время удерживания на хроматограммах пробы с временем удерживания градуировочных растворов, полученным в тех же условиях хроматографирования. Также идентификацию пиков можно осуществить, добавляя стандартные вещества в раствор анализируемой пробы.

**Примечание 1** – Разделение и количественное определение будут удовлетворительными, если будут выполняться следующие хроматографические условия (см. рисунок А.1). Для альтернативных систем ВЭЖХ см. таблицу С.1.

Колонка:	Merck LiChrosorb® Si 60, 5 мкм.
Размер колонки:	250 × 4 мм.
Подвижная фаза:	<i>n</i> -гексан и <i>n</i> -бутанол (98 : 2).
Скорость потока:	2 мл/мин.
Объем введенной пробы:	50 мкл.
Детектор:	Флуориметрический: длина волны возбуждения 325 нм, длина волны эмиссии 475 нм, УФ: 325 нм

Проверяют чистоту стандартных растворов полного Е-ретинола и 13-Z-ретинола посредством ввода соответствующего объема (например, 20 мкл) стандартного раствора (4.10.3), содержащего приблизительно 10 мкг/мл полного Е-ретинола или 13-Z-ретинола, в систему ВЭЖХ. Интегрируют площади или высоту пиков полного Е-ретинола и 13-Z-ретинола и, если необходимо, корректируют массовую концентрацию стандартного раствора полного Е-ретинола.

**Примечание 2** – Свежеприготовленный стандартный раствор полного Е-ретинола (4.10.3) обычно не содержит 13-Z-ретинола или других пиков, указывающих на присутствие примесей. Эфирная форма витамина А (ретирил пальмитат или ацетат) может содержать некоторое количество 13-Z-ретинола после омыления.

### 6.6 Определение

Вводят соответствующий объем (например, 20 мкл) градуировочного раствора (6.4) и раствора анализируемой пробы (6.3.4) в систему ВЭЖХ (5.3). Чтобы провести определение методом внешнего стандарта, интегрируют площади пиков или определяют высоту пиков, полученных при исследовании раствора анализируемой пробы, и сравнивают результаты с соответствующими значениями стандартных веществ, имеющих такое же время удерживания, или строят градуировочную кривую. Следует проверить линейность градуировочной кривой.

**Примечание** – Также может быть использован метод внутреннего стандарта, если в результате соответствующих испытаний получены такие же характеристики внутреннего стандарта, как и самого анализируемого вещества. Кроме того, соответствующие вещества могут быть добавлены к раствору анализируемой пробы перед вводом в колонку ВЭЖХ для количественного определения [7].

## 7 Вычисление

Результат определения вычисляют, используя градуировочный график в линейной области или приведенный ниже упрощенный способ вычисления.

Вычисляют массовую долю  $w_{\text{all-E}}$  полного Е-ретинола в пробе, мг/100 г, по формуле

$$w_{\text{all-E}} = \frac{A_S \cdot \rho_{\text{all-E}} \cdot V_S \cdot V_{\text{St}} \cdot 100}{A_{\text{all-E}} \cdot m \cdot V_{\text{is}} \cdot 1000}, \quad (4)$$

где  $A_S$  – площадь или высота пика полного Е-ретинола на хроматограмме раствора анализируемой пробы (6.3.4), выражаемая в единицах площади или высоты;

$\rho_{\text{all-E}}$  – концентрация полного Е-ретинола в градуировочном растворе (6.3.4), с учетом измерения УФ-спектрометром (5.1) стандартного раствора в 4.10.4, мкг/мл;

$V_S$  – общий объем раствора анализируемой пробы (6.3.4), мл;

$V_{\text{St}}$  – объем введенного градуировочного раствора (6.4), мкл;

100 – коэффициент для пересчета массовой доли на 100 г;

$A_{\text{all-E}}$  – площадь или высота градуировочного раствора полного Е-ретинола (6.4), выраженная в единицах площади или высоты;

- $m$  – масса навески пробы, г;  
 $V_{is}$  – объем введенного раствора анализируемой пробы (6.3.4), мкл;  
 1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы.

Вычисляют массовую долю  $w_{13-Z}$  13-Z-ретинола в пробе, мг/100 г, по формуле

$$w_{13-Z} = \frac{A_{13-Z} \cdot \rho_{all-E} \cdot V_S \cdot V_{St} \cdot 100}{A_{all-E} \cdot F_R \cdot m \cdot V_{is} \cdot 1000}, \quad (5)$$

- где  $A_{13-Z}$  – площадь или высота пика 13-Z-ретинола на хроматограмме раствора анализируемой пробы (6.3.4), выраженная в единицах площади или высоты;  
 $\rho_{all-E}$  – концентрация полного Е-ретинола в градуировочном растворе (6.3.4), с учетом измерения УФ-спектрометром (5.1) стандартного раствора в 4.10.4, мкг/мл;  
 $V_S$  – общий объем раствора анализируемой пробы (6.3.4), мл;  
 $V_{St}$  – объем введенного градуировочного раствора (6.4), мкл;  
 100 – коэффициент для пересчета массовой доли на 100 г;  
 $A_{all-E}$  – площадь или высота пика на хроматограмме градуировочного раствора полного Е-ретинола (6.4), выраженная в единицах площади или высоты;  
 $m$  – масса навески пробы, г;  
 $V_{is}$  – объем введенного раствора анализируемой пробы, мкл;  
 1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы;  
 $F_R$  – коэффициент соответствия 13-Z-ретинола полному Е-ретинолу, определенный с помощью ВЭЖХ с использованием стандартного раствора известной концентрации, вычисляют по формуле

$$F_R = \frac{B_{13-Z} \cdot \rho_{all-E}}{B_{all-E} \cdot \rho_{13-Z}}, \quad (6)$$

- где  $B_{13-Z}$  – площадь или высота пика на хроматограмме стандартного раствора 13-Z-ретинола;  
 $B_{all-E}$  – площадь или высота пика на хроматограмме стандартного раствора полного Е-ретинола;  
 $\rho_{13-Z}$  – массовая концентрация стандартного раствора 13-Z-ретинола;  
 $\rho_{all-E}$  – массовая концентрация стандартного раствора полного Е-ретинола.

Если стандартное вещество 13-Z-ретинола не доступно для определения коэффициента отклика, содержание 13-Z-ретинола можно рассчитать, используя коэффициент пересчета равный 1. Результат должен быть указан соответствующим образом.

## 8 Прецизионность

### 8.1 Общие положения

Результаты межлабораторных испытаний прецизионности методов приведены в приложении В. Данные, полученные в ходе таких исследований, могут быть применены только для диапазонов концентраций и матриц проб, приведенных в приложении В.

### 8.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя независимыми результатами испытаний, полученными при исследовании идентичного анализируемого материала одним и тем же оператором, который использовал одно и то же оборудование в пределах самого короткого промежутка времени, не должна превышать предел повторяемости  $r$  более чем в 5 % случаев.

Значения:

Маргарин	полный Е-ретинол	$\bar{x} = 729$ мкг/100 г	$r = 78,4$ мкг/100 г
	13-Z-ретинол	$\bar{x} = 39$ мкг/100 г	$r = 8,4$ мкг/100 г
Сухое молоко	полный Е-ретинол	$\bar{x} = 653$ мкг/100 г	$r = 39,2$ мкг/100 г
	13-Z-ретинол	$\bar{x} = 30$ мкг/100 г	$r = 4,2$ мкг/100 г

## ГОСТ EN 12823-1

(проект, ВУ, первая редакция)

### 8.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя независимыми результатами испытаний, полученными при исследовании идентичного анализируемого материала, анализируемого в двух лабораториях, не должна превышать предел воспроизводимости  $R$  более чем в 5 % случаев.

Значения:

Маргарин	полный Е-ретинол	$\bar{x} = 729$ мкг/100 г	$R = 204,4$ мкг/100 г
	13-Z-ретинол	$\bar{x} = 39$ мкг/100 г	$R = 33,6$ мкг/100 г
Сухое молоко	полный Е-ретинол	$\bar{x} = 653$ мкг/100 г	$R = 61,6$ мкг/100 г
	13-Z-ретинол	$\bar{x} = 30$ мкг/100 г	$R = 20,2$ мкг/100 г

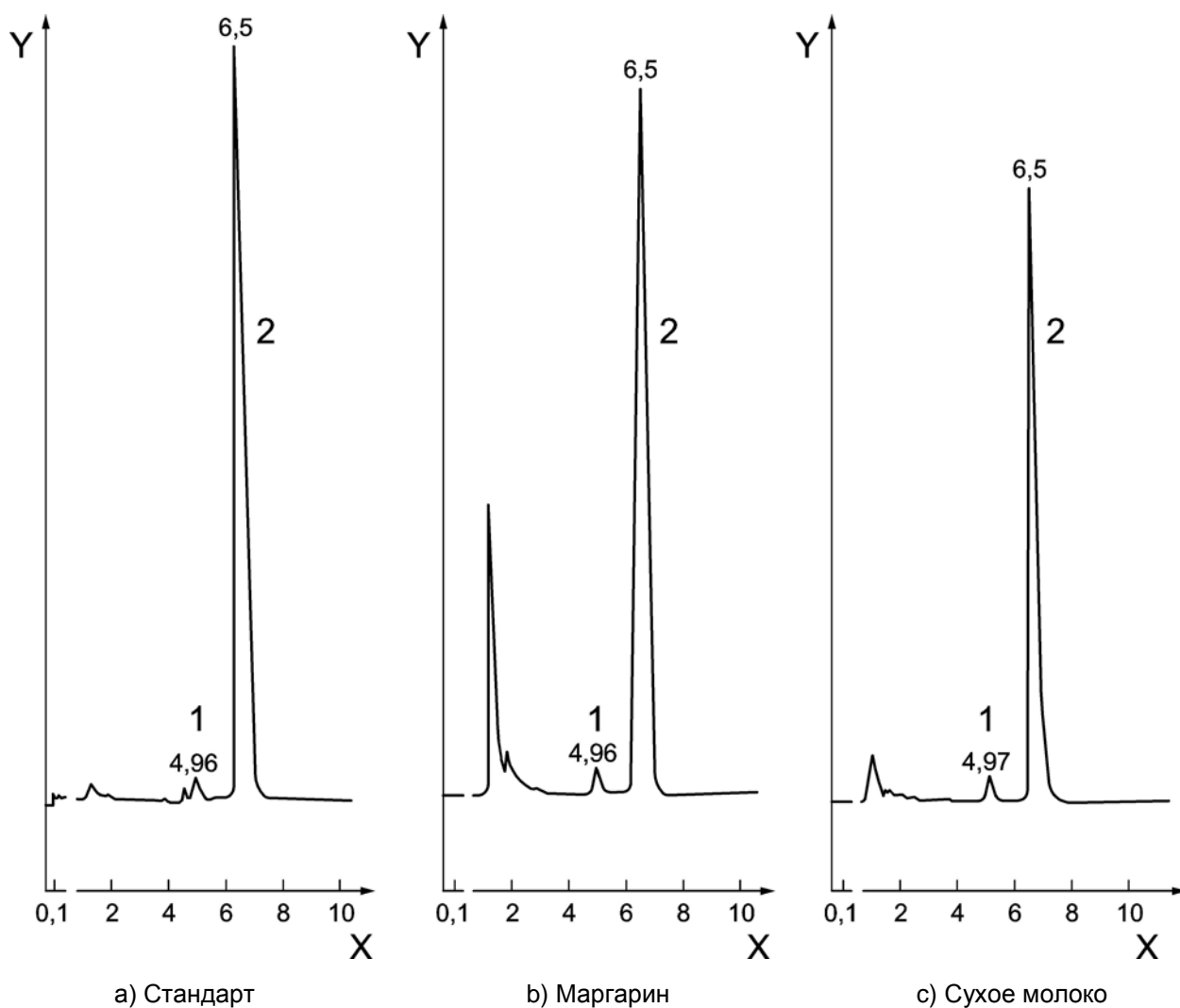
### 9 Протокол испытания

Протокол испытания должен соответствовать требованиям EN ISO/IEC 17025 [11] и содержать следующие данные:

- a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
- b) ссылку на настоящий стандарт или на используемый метод;
- c) дату и время отбора проб (если известно);
- d) дату получения пробы;
- e) дату проведения испытания;
- f) результаты и единицы измерения, в которых выражены результаты;
- g) любые особенности, которые наблюдались в ходе проведения испытания;
- h) любые операции, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые в качестве дополнительных, которые могли повлиять на результаты.

Приложение А  
(справочное)

Примеры хроматограмм



Пояснение:

Y Флюоресценция  
X Время, мин  
1 13-Z-ретинол  
2 полный E-ретинол

Колонка: Merck LiChrosorb® Si 60, 5 мкм, 250 × 4 мм.

Подвижная фаза: *n*-гексан и *n*-бутанол (98 : 2).

Скорость потока: 2 мл /мин.

Детектор: Флуориметрический: длина волны возбуждения 325 нм, длина волны эмиссии 475 нм.

Рисунок А.1 – Хроматограммы стандартного раствора витамина А (а), витамина А в маргарине (b) и сухом молоке (c)

## Приложение В (справочное)

### Данные прецизионности

Данные, приведенные в таблице В.1, были получены в результате межлабораторных испытаний [3], проведенных в соответствии с Руководством по сертификационным испытаниям ЕС (EU MAT Certification Study Guidelines). Исследование было организовано Институтом исследования пищевой продукции, г. Норвич, Великобритания (Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom).

Т а б л и ц а В . 1 – Данные прецизионности для маргарина и сухого молока

Параметр	Маргарин (CRM 122) <sup>а</sup>		Сухое молоко (CRM 421) <sup>а</sup>	
	полный Е-ретинол	13-Z- ретинол	полный Е-ретинол	13-Z- ретинол
Проба				
Год межлабораторного испытания	1994	1994	1994	1994
Количество лабораторий	9	5	8	5
Количество проб	2	2	2	2
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	9	5	6	5
Количество выбросов (лабораторий)	0	0	2	0
Количество полученных результатов	45	25	40	21
Среднее значение $\bar{x}$ , мкг/100 г	729	39	653	30
Стандартное отклонение повторяемости $s_r$ , мкг/100 г	28	3	14	1,5
Относительное стандартное отклонение повторяемости $RSD_r$ , %	3,8	7,7	2,1	5,0
Предел повторяемости $r [r = 2,8 \times s_r]$ , мкг/100 г	78,4	8,4	39,2	4,2
Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$ , мкг/100 г	73	12	22	7,2
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости $RSD_R$ , %	10,0	30,8	3,4	24,0
Предел воспроизводимости $R [R = 2,8 \times s_R]$ , мкг/100 г	204,4	33,6	61,6	20,2
Значение индекса Горвица (HorRat) в соответствии с [10]	0,85	1,68	0,28	1,26

<sup>а</sup> CRM = Сертифицированный стандартный материал.

Приложение С  
(справочное)

**Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Было выявлено, что разделение и количественное определение полного Е-ретинола и 13-Z-ретинола оказывались удовлетворительными, если соблюдались хроматографические условия, приведенные в таблице С.1 [3].

Т а б л и ц а С . 1 – Альтернативные системы ВЭЖХ и хроматографические условия

Колонка (размер частиц)	Параметры (длина x диаметр), мм	Подвижная фаза (объемные доли V:V)	Детектирование (нм)
LiChrospher® Si 60 (5 мкм)	250 x 4	<i>n</i> -гексан и 2-пропанол (98 : 2)	Ф (325/480)
LiChrosorb® Si 60 (5 мкм)	250 x 4	<i>n</i> -гексан и <i>n</i> -бутанол (98 : 2)	Ф (325/475)
LiChrosorb® Si 60 (5 мкм)	250 x 4	<i>изо</i> -пропанол и <i>n</i> -гептан, градиент: от (0,5 : 99,5) до (8,5 : 91,5) за 12 мин	УФ 325

**ГОСТ EN 12823-1***(проект, ВУ, первая редакция)***Приложение ДА  
(справочное)****Сведения о соответствии ссылочного европейского стандарта  
межгосударственному стандарту**

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
EN ISO 3696	IDT	ГОСТ ISO 3696-2013 «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля»
Примечание – В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта: - IDT — идентичный стандарт.		



### Библиография

- [1] BOURGEOIS C.F., CIBA N. Disposal cartridge extraction of retinol and alpha-tocopherol from fatty samples. J.A.O.A.C 1988, 71 (1), pp 12 – 15  
(Экстракция ретинола и альфа-токоферола из жирных проб с использованием картриджа)
- [2] LETH T., JACOBSEN J.S. 1993. Vitamin A in Danish pig, calf and ox liver. J. Food Composition & Analysis 6, 3 – 9  
(Витамин А в печени датских свиней, телят и быков)
- [3] FINGLAS P.M., VAN DEN BERG H., DE FROIDMONT-GORTZ I. The certification of the mass fractions of vitamins in three reference materials: margarine (CRM 122), milk powder (CRM 421), and lyophilized Brussels sprouts (CRM 431). EUR-Report 18039, Commission of the European Union, Luxembourg, 1997.  
(Сертификация массовых долей витаминов в трех стандартных материалах: маргарине (CRM 122), сухом молоке (CRM 421) и лиофилизированной брюссельской капусте (CRM 431) Евродоклад 18039, Комиссия Европейского союза, Люксембург)
- [4] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Vitamin A in diätetischen Lebensmitteln L 49.00-3, Mai 1985 (Inspection of foodstuffs; determination of the vitamin A content in dietetic foodstuffs L 49.00-3, 1985-05) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH  
(Анализ кормов: Определение витамина А в диетических продуктах питания)
- [5] ISLER O., BRUBACHER G. Vitamine. 1982, I p. 34 [Georg Thieme Verlag, Stuttgart]  
(Витамины)
- [6] TAKASHIMA Y. et al. Stability of retinol analogs. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 1979, 27 pp. 1553–1563  
(Стабильность аналогов ретинола)
- [7] BOLLIGER H.R. et al. The monograph of vitamin A in the European Pharmacopoeia. Pharm. Acta. Helv. 1977, 52 (8) pp. 161 – 174  
(Монография витамина А в Европейской Фармакопее)
- [8] Arens, M. and Gertz, Chr, 1996. Gehaltsbestimmung von Vitamin A-Standardsubstanzen – Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, 124. Mitt.; (Determination of vitamin A content in standard substances – German methods for analysis of fats, fat products, tensids and related products, 124. ann) Fett/Lipid, VCH Verlag, Weinheim, 98, Nr. 5, S. 185 – 187  
(Определение витамина А в стандартных веществах. Немецкие методы анализа жиров, жировых продуктов, поверхностно-активных веществ и родственных продуктов)
- [9] HOELLER U., WOLTER D., HOFMANN P., SPITZER V. Microwave-assisted rapid determination of vitamins A and E in beverages. J. Agric. Food Chem. 2003, 51 pp. 1539–1542  
(Ускоренное определение витаминов А и Е в напитках с использованием микроволнового излучения)
- [10] HORWITZ W., ALBERT R., The Horwitz Ration. (HorRat): A useful Index of Method Performance with Respect to Precision. J. AOAC Int. 2006, 89 pp. 1095–1109  
(Индекс Горвица. (HorRat): Приемлемый индекс эффективности метода с точки зрения прецизионности)
- [11] EN ISO/IEC 17025:2005 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2005)  
(Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

**ГОСТ EN 12823-1***(проект, ВУ, первая редакция)*

УДК

МКС 67.050

IDT

Ключевые слова: витамин А, ретинол, высокоэффективная жидкостная хроматография, отбор проб, антиоксиданты

Научно-производственное республиканское унитарное предприятие  
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

Заместитель директора  
по техническому нормированию,  
стандартизации и методологии  
оценки соответствия

О.Ф.Ильянкова

Начальник сектора  
отдела ведения  
Национального фонда  
технических нормативных  
правовых актов

Н.В.Станилевич

Начальник сектора  
отдела технического нормирования  
и стандартизации пищевой  
и сельскохозяйственной продукции

К.А.Родригес

Ведущий инженер  
отдела технического нормирования  
и стандартизации продукции  
химической и легкой промышленности

Я.Н. Боровко

Ведущий инженер  
отдела технического нормирования  
и стандартизации пищевой  
и сельскохозяйственной продукции

Н.Ю.Павленок

Инженер 1 категории  
отдела ведения  
Национального фонда  
технических нормативных  
правовых актов

Н.В.Скуратова

Инженер 1 категории  
отдела технического нормирования  
и стандартизации пищевой  
и сельскохозяйственной продукции

\_\_\_\_\_

Н.Н.Шиманович