ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ УЗБЕКИСТАНА

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов группы В

ИЗМЕНЕНИЕ №1

Издание официальное

Узбекское агентство стандартизации, метрологии и сертификации

г. Ташкент

Изменение №1 к O'z DSt 1095:2006

ОКСТУ 9209
ОКС 65.120.19

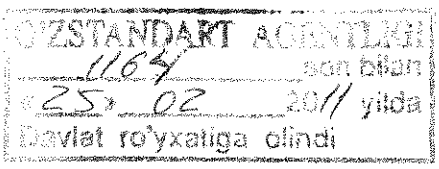
УДК 636.085.3:006.354
Группа С 19

Изменение №1 к O'z DSt 1095:2006 Премиксы. Методы определения витаминов группы В.

ЗАРЕГИСТРИРОВАН и ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Узбекского агентства стандартизации, метрологии и сертификации (Агентства «Узстандарт») от «25» «02» 2011 г. № 05-278

Дата введения 10.03.2011
Число, месяц, год

Продлить срок действия государственного стандарта до 05.04.2016 г.



СОГЛАСОВАНО

УРМК и ХП АК "Уздонмахсулот"

«25» 01 2011г

СОГЛАСОВАНО

УКДПХ и И АК "Уздонмахсулот"

«26» 01 2011 г

СОГЛАСОВАНО

УМИ и К АК "Уздонмахсулот"

«27» 01 2011 г.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI

Заместитель председателя
АК "Уздонмахсулот" А. Юлдашев

Директор
ООО «Donmahsulotlari IIChM » Д.А.Гафурова

Начальник отдела хлебопекарной,
макаронной и кондитерской продукции
ООО «Donmahsulotlari IIChM» Л.В.Матниязова

Начальник отдела стандартизации
ООО «Donmahsulotlari IIChM» М.Г.Мухамедкаримова

Ведущий инженер отдела стандартизации
ООО «Donmahsulotlari IIChM » О.Е.Кондратьева

...DARDLASHTIRISH,
...MUVOFIQLASHTIRISH
...DAVLAT NAZORATI

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ УЗБЕКИСТАНА

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов группы В

Технические условия

Издание официальное

Узбекский государственный центр стандартизации,
метрологии и сертификации

г. Ташкент

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Предисловие

1. ВНЕСЕН Техническим комитетом «Хлебопродукты»
2. УТВЕРЖДЕН Узбекским агентством стандартизации, метрологии и сертификации № 05-07 от 06.03.2006
3. Настоящий стандарт представляет собой полный аутентичный текст ГОСТ Р 50929-96
4. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Содержание

1. Область применения 1
2. Нормативные ссылки 1
3. Отбор проб 3
4. Определение витамина B_1 3
5. Определение витамина B_2 6
6. Определение витаминов B_1 и B_2 высокоэффективной жидкостной хроматографией 8
7. Определение холинхлорида 12
8. Определение витамина B_5 14
9. Определение витамина B_5 высокоэффективной жидкостной хроматографией .....18.
10. Требования техники безопасности 26
11. Библиография 27
12. Приложение А (справочное) Хроматоргамма экстракта из премикса 28
13. Приложение В (справочное) Хроматограмма смеси витаминов B_1 B_2 29
14. Приложение С (справочное) Хроматограмма экстракта витамина B_5 из премикса 30
15. Приложение D (справочное) Хроматограммы растворов витамина B_5 31

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
NUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
DOSHQARMASI

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ УЗБЕКИСТАНА

ПРЕМИКСЛАР

В гуруҳ витаминларини аниқлаш усуллари.

Техник шартлар

ПРЕМИКСЫ

Методы определения витаминов группы В

Технические условия

Premixes
Methods for determination of vitamin B complex
Technical conditions

Дата введения с 05.04.2006
до 05.04.2011

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на премиксы и устанавливает методы определения витаминов B_1, B_2, холинхлорида, B_5 химическими методами и высокоэффективной жидкостной хроматографией.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты :

ГОСТ 61-75 Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 246-76 Гидросульфит натрия технический. Технические условия

ГОСТ 427-75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

Издание официальное

O'ZSTANDART AGENTLIGI
3490 son bilan
«06» 03 2006 yilda
Davlat ro'yxatiga qilindi

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия

ГОСТ 2603-79 Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118-77 Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4109-79 Бром. Технические условия

ГОСТ 4139-75 Калий роданистый. Технические условия

ГОСТ 4166-76 Натрий серно-кислый. Технические условия

ГОСТ 4174-77 Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4201-79 Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4204-77 Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4206-75 Калий железосинеродистый. Технические условия

ГОСТ 4234-77 Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4530-76 Кальций углекислый. Технические условия

ГОСТ 6016-77 Спирт изобутиловый. Технические условия

ГОСТ 6217-74 Уголь активный древесный дробленый. Технические условия

ГОСТ 6552-80 Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9337-79 Натрий фосфорнокислый 12-водный. Технические условия

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0-80 Комбикорма, сырьё. Методы отбора проб

ГОСТ 18300-87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19908-90 Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия

ГОСТ 24104-88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Технические условия

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 25664-83 Метол (4-метиламинофенол сульфат) Технические условия

ГОСТ 26573.0-85 Премиксы. Технические условия

ГОСТ 27067-86 Аммоний роданистый. Технические условия

ГОСТ 29227-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29228-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки без установленного времени ожидания

ГОСТ 29251-91 Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29252-91 Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 2. Бюретки без времени ожидания.

[illegible] AGENTLIGI
[illegible]TANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

3 Отбор проб

Отбор проб по ГОСТ 13496.0

4 Определение витамина B_1

Сущность метода заключается в извлечении витамина B_1 (тиамина) из навески анализируемого продукта раствором серной кислоты, окисление его раствором железосинеродистого калия в тиохром, экстракции окисленной формы из водной фазы изобутиловым спиртом и измерении интенсивности флуоресценции.

4.1 Аппаратура, материалы, реактивы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 g по ГОСТ 24104

Флуорометр Квант-7 и ФАНК – 1

Аппарат для встряхивания жидкости типа АВУ-1

Колбы мерные 2-50 (100) – 1(2) по ГОСТ 1770

Воронки стеклянные типа В по ГОСТ 25336

Пробирки П-1 (2) – 25-02 по ГОСТ 1770

Шкаф сушильный с терморегулятором, обеспечивающий постоянство температуры (105 ± 2) ^{0}C

Воронки делительные типа ВД вместимостью 100 cm^3 по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1 100-ТХС по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные 4 (5)-1 (2)- 1 (2) , 6 (7)-1 (2)-5 (10) по ГОСТ 29227 и по ГОСТ 29228.

Цилиндры 1 (2,3,4)- 25 (50,100) по ГОСТ 1770

Фильтры обеззоленные (красная лента) по нормативному документу [3].

Кислота серная по ГОСТ 4204, раствор молярной концентрации с $(1/2\ H_2SO_4) = 0,1$ mol/dm ^{3}

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор в соотношении 1:1 (по объему) и раствор молярной концентрации с (HCl) = 0,01 mol/dm ^{3}

Калий хлористый по ГОСТ 4234

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 10 %

Спирт изобутиловый по ГОСТ 6016

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166

Калий железосинеродистый (красная кровяная соль) по ГОСТ 4206, раствор с массовой долей 1 %

Хининсульфат или хининхлорид по нормативным документам [9,10].

Тиминобромид или тиаминхлорид по нормативным документам [16,17].

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Примечания

1. Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.
2. Все реактивы должны быть квалификации х.ч или ч.д.а

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

4.2 Подготовка к испытанию

4.2.1 Приготовление окислительной смеси

1 cm^3 свежеприготовленного раствора железосинеродистого калия смешивают с 49 cm^3 раствора гидроокиси натрия.

Смесь готовят в день проведения анализа.

4.2.2 Приготовление основного стандартного раствора из хининсульфата.

10 mg хининсульфата растворяют в мерной колбе вместимостью 100 cm^3 в растворе серной кислоты и доводят этой кислотой объем до метки. Раствор хранится не более 1 года в склянке из темного стекла.

4.2.3 Приготовление рабочего стандартного раствора хининсульфата.

Рабочий стандартный раствор готовят непосредственно перед анализом. Для этого 1 cm^3 основного стандартного раствора (4.2.2) переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят до метки раствором серной кислоты.

Концентрация хининсульфата – 1 $\mu g/cm^3$.

4.2.4 Приготовление основного стандартного раствора из тиаминбромида.

Взвешивают 10 mg кристаллического тиаминбромида предварительно высушенного в сушильном шкафу в течении 2-3 h при температуре от 100 ^0C до 105 ^0C, растворяют его в мерной колбе вместимостью 100 cm^3 в растворе соляной кислоты молярной концентрации с (HCl) = 0,01 mol/dm^3 и доводят этой кислотой объем до метки. Раствор содержит 100 mg тиамина в 1 cm^3. Раствор хранят не более 1 месяца в склянке из темного стекла в прохладном месте.

4.2.5 Приготовление рабочего стандартного раствора тиаминбромида.

Рабочий стандартный раствор готовят непосредственно перед анализом.

1 cm^3 основного стандартного раствора тиаминбромида (4.2.4) переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят до метки дистиллированной водой.

Концентрация рабочего стандартного раствора тиаминбромида – 1 $\mu g/cm^3$.

4.2.6 Контроль за содержанием витамина B_1 в стандартном растворе проводят по п 6.2.4.

4.3 Проведение испытания

Навеску премикса массой 5 g, взвешенную с погрешностью не более 0,002 g, помещают в мерную колбу вместимостью 100 cm^3, добавляют 5 g хлористого калия и приливают 70 cm^3 серной кислоты. Затем колбу с реактивами встряхивают на аппарате в течение 10 min, доводят объемом в колбе до метки раствором серной кислоты, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбросив первую порцию фильтрата. Переносят 2 cm^3 фильтрата в мерную колбу вместимостью 50 cm^3 и доводят до метки раствором серной кислоты. Отбирают 20 cm^3 разбавленного фильтрата и переносят в делительную воронку, куда приливают 20 cm^3 изобутилового спирта, тщательно перемешивают в течении 2 min. После расслоения верхний слой сливают, а нижний – переносят в градуированную пробирку и доводят до объема 20 cm^3 раствором серной кислоты, перемешивают.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Из пробирки берут 8 cm^3 раствора в делительную воронку, приливают 6 cm^3 окислительной смеси (4.2.1), перемешивают, добавляют 20 cm^3 изобутилового спирта и встряхивают 2 min. После расслоения нижний водный слой отбрасывают , а верхний (спиртовой) – фильтруют через обеззоленный фильтр (красная лента), пропуская через слой безводного сернокислого натрия (4-5 g) в флуорометрическую пробирку и флуорометрируют.

Для окисления стандартного раствора берут 8 cm^3 рабочего стандартного раствора тиамина и проводят дальнейшую обработку, как с испытуемой пробой.

Для гашения флуоресценции в испытуемом и стандартном растворе к ним добавляют по 1-2 капли раствора соляной кислоты в соотношении 1:1 (по объему), перемешивают и измеряют остаточную флуоресценцию.

Если в качестве стандартного раствора используют раствор хининсульфата (или хининхлорида), то его не окисляют и не гасят, так как он имеет одно и тоже значение по флуорометру, равное 72.

По стандартному раствору хининхлорида (хининсульфата) настраивают (по инструкции) прибор на деление прибора 80.

4.4 Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_1 X в премиксе, g/t, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A-A_1) \cdot V \cdot V_2 \cdot C}{(F-F_1) \cdot m \cdot V_1 \cdot V_3},$$

где A – показание флуорометра для испытуемого раствора до гашения;

A_1 – показания флуорометра для испытуемого раствора после гашения;

V – первоначальный объем раствора, cm^3;

V_1, V_2 - разведения, cm^3;

C – масса витамина в стандартном растворе, μg;

F – показания флуорометра для стандартного раствора до гашения;

F_1 - показания флуорометра для стандартного раствора после гашения;

m - масса навески, g;

V_3 – объем испытуемого раствора, взятый на испытание, cm^3.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до первого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности P= 0,95 не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности P= 0,95 расхождения не должны превышать 15 %.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Примечание – При использовании в качестве стандартного раствора хининсульфата (хининхлорида) в расчетную формулу вместо выражения ($F-F_1$), подставляют цифру 72.

5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_2

Сущность метода заключается в извлечении витамина B_2 (рибофлавина) из навески путем кислотного гидролиза и измерении интенсивности флуоресценции.

5.1 Аппаратура, материалы, реактивы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 g по ГОСТ 24104,

Флуорометр Квант-7, ФАНК-1.

РН-метр по нормативному документу [8]

Баня водяная.

Центрифуга ОПН-8.

Фильтры обеззоленные (синяя лента) по нормативному документу [3]

Колбы мерные 2-50 (100, 1000) – 1 (2) по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 4 (5)- 1 (2)-1, 6 (7)-1 (2)- 25 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228.

Цилиндры 1 (2,3,4) – 100 по ГОСТ 1770.

Кислота уксусная по ГОСТ 61

Витамин B_2 по нормативному документу [11]

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор с массовой долей 5 % и раствор молярной концентрации с (HCl)= 0,1 mol/dm^3

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 15 %.

Натрий двууглекислый по ГОСТ 4201.

Натрия гидросульфит по ГОСТ 246

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Примечания

1. Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.
2. Все реактивы должны быть квалификации х.ч. или ч.д.а.

5.2 Подготовка к испытанию

5.2.1 Приготовление основного стандартного раствора витамина B_2

40 mg витамина B_2 растворяют в дистиллированной воде, подкисленной 10 cm^3 ледяной уксусной кислоты, при нагревании до 50 °С в мерной колбе вместимостью 1000 cm^3, доводят объем до метки дистиллированной водой. В 1 cm^3 раствора содержится 40 μg рибофлавина.

Раствор хранят в прохладном, темном месте в склянке из темного стекла не более 2 месяца.

5.2.2 Приготовление рабочего стандартного раствора рибофлавина.

1 cm^3 основного стандартного раствора рибофлавина переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят до метки дистиллированной

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA DAVLAT NAZORATI
XIZMATI

водой, подкисленной раствором соляной кислоты с массовой долей 5 % до pH 5,5-6,0.

В 1 cm^3 раствора содержится 0,4 μg рибофлавина.

Раствор готовят перед употреблением.

5.2.3 Контроль за содержанием витамина B_2 в стандартном растворе проводят по 6.2.4.

5.3 Проведение испытания

Навеску премикса массой 2-5 g, взвешенную с погрешностью не более 0,002 g помещают в мерную колбу вместимостью 100 cm^3, приливают 75 cm^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,1 mol/dm^3, смывая частицы премикса со стенок колбы. Колбу помещают в кипящую водяную баню на 20 min . Содержимое колбы периодически перемешивают.

После охлаждения колбы pH раствора доводят до значения 5,5-6,0 раствором гидроокиси натрия. Затем объем в колбе доводят дистиллированной водой до метки, хорошо перемешивают и центрифугируют в течении 15 min при 8000 r/min.

Из полученного фильтрата готовят раствор с нужным разведением (например, 1 cm^3 фильтрата разводят в мерной колбе вместимостью 50 cm^3) и определяют интенсивность флуоресценции, помещая в одну флуорометрическую пробирку 12-15 cm^3 испытуемого раствора, в другую – такое же количество рабочего стандартного раствора. Затем в эти же пробирки добавляют 2-3 раза по 0,1 g двууглекислого натрия и по 0,1 g гидросульфита натрия или 4-6 капель раствора гидроокиси натрия. Содержимое пробирок осторожно перемешивают, фильтруют, если раствор мутный, и снова измеряют интенсивность флуоресценции на приборе.

5.4 Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_2 X в премиксе, g/t, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A-A_1) \cdot C \cdot V \cdot V_2}{(F-F_1) \cdot m \cdot V_1},$$

где A – показание флуорометра для испытуемого раствора до гашения флуоресценции;

A_1 – показания флуорометра для испытуемого раствора после гашения флуоресценции;

C – содержание витамина B_2 в рабочем стандартном растворе, μg/cm^3

V – первоначальный объем раствора, cm^3;

V_2 - окончательный объем разведения, cm^3;

F – показания флуорометра для стандартного раствора до гашения флуоресценции;

F_1 - показания флуорометра для стандартного раствора после гашения флуоресценции;

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA RAVSAT NAZORATI
DEPARTAMENTI

m - масса навески, g V_1– объем раствора, взятый для разведения, cm^3.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности P= 0,95 не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности P= 0,95 расхождения не должны превышать 15 %.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ B_1 и B_2 ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Сущность метода заключается в экстракции витаминов B_1 (тиамина) и B_2 (рибофлавина) из навески раствором соляной кислоты и определении их на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическом детектором с использованием обращенно-фазного режима элюирования.

Метод применим в диапазоне содержания витамина B_1 от 0,05 до 0,5 g/kg в премиксе, витамина B_2 – от 0,1 до 2 g/kg в премиксе.

6.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный с фотометрическим детектором и систематической погрешностью измерений не выше 10 %. Допускается использовать хроматографы «Цвет-306», «Цвет 3006 со спектрофотометрическим детектором» и «Милихром».

Колонка хроматографическая стальная или стеклянная высотой 150 mm и диаметром 4 mm с числом теоретических тарелок не менее 2000, заполненная сорбентом «Силасорб С-18» или «Сепарон С-18».

Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46 (спектральный диапазон 186-1100 нм).

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 g по ГОСТ 24104.

Линейка измерительная металлическая по ГОСТ 427

Секундомер механический по нормативному документу [15]

Сорбент «Силасорб С-18» зернением 7 μm

РН-метр по нормативному документу [8]

Мешалка магнитная ММ-5

Центрифуга лабораторная ЦЭ-2 с числом оборотов 6000 в min

Иономер ЭБ-74 со стеклянным электродом ЭСЛ-62-07

Микрошприц МШ-10 или микропипетка МП-2

Колбы конические со шлифом вместимостью 100 cm^3 по ГОСТ 25336

Колбы мерные 2-25 (50,100,200)-1 (2) по ГОСТ 1770

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA BAHOLASH NAZORATI
DEPARTAMENTI

Воронка ВФ-1-56 (75) ХС или ВФ-2-75 (110) ХС со стеклянным фильтром ПОР 100 по ГОСТ 25336

Пипетки градуированные 6 (7)-1 (2)-10 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026

Ацетонитрил по нормативному документу [7]

Натрия октилсульфонат, хроматографически чистый (изготовление Германия, фирма Pylver)

Триэтиламин, перегнанный по нормативному документу [4]

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552

Кислота соляная по ГОСТ 3118, концентрированная и раствор молярной концентрации с (HCl) = 0,01 mol/dm^3

Витамин B_2 по нормативному документу [11]

Витамин B_1 по нормативным документам [16, 17]

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Примечания

1. Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.
2. Все реактивы должны быть квалификации х.ч. или ч.д.а.

6.2. Подготовка к испытанию

6.2.1 Приготовление элюента

Для приготовления 1 dm^3 элюента смешивают 120 dm^3 ацетонитрила с 880 dm^3 дистиллированной воды, добавляют 2,5 cm^3 триэтиламина, 0,5 g октилсульфоната натрия и приливают ортофосфорную кислоту до pH 7,6 по pH-метру. Полученную смесь фильтруют через стеклянный фильтр для удаления механических примесей.

Срок хранения элюента - не более 1 мес.

6.2.2 Приготовление раствора-экстрагента

К 1 dm^3 дистиллированной воды прибавляют 0,8 cm^3 концентрированной (37 %-ной) соляной кислоты, pH раствора 2 ± 0,2.

6.2.3 Приготовление основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2

Для приготовления основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2 берут навески 0,1 g тиаминхлорида и 0,01 g рибофлавина. Навеску тиаминхлорида растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 cm^3, а рибофлавина – в мерной колбе вместимостью 200 cm^3, при нагревании до температуры от 70 °С до 80 °С и доводят дистиллированной водой до метки. Полученные растворы содержат в 1 cm^3 1 mg витамина B_1 и 0,05 мг витамина B_2 соответственно.

Срок хранения основных стандартных растворов витаминов B_1 и B_2 не более 2 недель в холодильнике.

6.2.4 Контроль за содержанием витаминов B_1 и B_2 в основных стандартных растворах

Контроль за содержанием витаминов в основных стандартных растворах осуществляют спектрофотометрически по значениям молярных коэффициентов светопоглащения.

Для этого основные стандартные растворы разбавляют дистиллированной водой в 50 раз и измеряют оптическую плотность растворов

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

на спектрофотометре в кювете толщиной поглощающего свет слоя 1 cm. Массовую концентрацию витаминов B_1 и B_2 С рассчитывают во формуле

$$c = \frac{50\ D}{E \cdot l},$$

где D – оптическая плотность;
E – молярный коэффициент;
l – толщина слоя раствора, 1 cm;

Массовую концентрацию витаминов B_1c_1 и B_2c_2, mg/cm^3, рассчитывают соответственно по формулам :

$$C_1 = \frac{50\ D}{205};$$

$$C_2 = \frac{50\ D}{324},$$

где 205 – молярный коэффициент светопоглащения тиаминхлорида при рабочей длине волны 268 nm;
324 - молярный коэффициент светопоглащения рибофлавина при рабочей длине волны 445 nm;

6.2.5 Приготовление рабочего стандартного раствора витаминов B_1 и B_2

Из основных стандартных растворов готовят рабочие стандартные растворы с содержанием витаминов B_1 – 0,02 mg и B_2 – 0,025 mg в 1 cm^3.

Для этого в мерную колбу вместимостью 50 cm^3 помещают 1 cm^3 основного стандартного раствора тиаминхлорида (6.2.3) и 25 cm^3 основного стандартного раствора рибофлавина (6.2.3), доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Рабочий стандартный раствор готовят в день испытаний.

6.3 Проведение испытания

6.3.1 Экстракция витаминов B_1 и B_2

Навеску премикса массой 1 g, взвешенную с погрешностью не более 0,002 g, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 cm^3 и приливают 10 cm^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации с (HCl) = 0,01 mol/dm^3. Колбу ставят на магнитную мешалку с включением

O'zSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

нагрева. Перемешивание и нагрев осуществляют в течении 10 min. Полученную суспензию переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 5000 – 6000 r/min в течении 3 min. Центрифугат сливают в мерную колбу вместимостью 25 cm^3. Коническую колбу с остатком раствора смывают небольшим количеством (около 5 cm^3) раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,01 mol/dm^3, сливают раствор в центрифужную пробирку и снова центрифугируют. Центрифугат соединяют с первым в той же мерной колбе. Промывание центрифугированием повторяют 3-4 раза каждый раз сливая промывные воды в ту же колбу. После этого раствор в мерной колбе доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют или дополнительно центрифугируют для очищения от механических примесей и взвешенных частиц. Приготовленный раствор используют для хроматографического анализа.

6.3.2 Хроматографирование

Хроматографирование осуществляют в следующих условиях. Разделение проводят на колонке 4x150 mm, заполненной сорбентом (6.2.4).

Подвижная фаза - элюент (6.2.1).

Рабочая длина волны спектрофотометрического детектора хроматографа 254 nm. Скорость элюирования – 1,2 cm^3/min. Время удерживания для витамина B_1 составляет 6 min, а для витамина B_2 – 8 min. Объем загрузки анализируемого раствора – 10 μdm^3. Для насыщения колонки в начале работы производится 3-5 загрузок, отмечая высоты пиков. При достижении постоянной высоты можно приступить к испытаниям. Анализируемые растворы хроматографируют каждый по три раза в одинаковых условиях. В этих же условиях хроматографируют рабочие стандартные растворы витаминов B_1 и B_2.

Измеряют высоты пиков, как расстояние от вершины пика до линии проведенной в основании пика (приложение А, рисунок А1 и приложение В, рисунок В1)

6.4 Обработка результатов испытания

Содержание витаминов B_1 и B_2 X_1 и X_2 в премиксе, g/t, вычисляют по формуле

$$X_1(X_2) = \frac{h_x c_{cm} v_k}{h_{cm} m},$$

где h_x – высота пика витамина на хроматограммах экстракта из премикса, mm;

c_{cm} – массовая концентрация витамина в рабочем стандартном растворе, mg/cm^3;

v_k – объем премикса с экстрактом, cm^3;

h_{cm} – высота пика витамина на хроматограммах рабочего стандартного раствора, mm;

m – масса навески премикса, g.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности P= 0,95 не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности P= 0,95 расхождения не должны превышать 15 %.

7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛИНХЛОРИДА

Сущность метода заключается в экстракции холинхлорида дистиллированной водой, образовании в присутствии трехзамещенного фосфата натрия комплекса рейнеката холинхлорида и измерении интенсивности окраски его ацетоновых растворов спектрофотометрически.

7.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 g по ГОСТ 24104.

Фотоэлектроколориметр – ФЭК-56М, КФК или спектрофотометр типа СФ-26.

Насос вакуумный по ГОСТ 25336

Центрифуга ОПН-8

Колбы конические вместимостью 50-100 cm^3 по ГОСТ 25336

Эксикатор вакуумный по ГОСТ 25336

Стаканы химические вместимостью 200-250 cm^3 по ГОСТ 25336

Баня водяная

Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 100 и 250 cm^3 по ГОСТ 25336

Воронка ВФО – 40-ПОР-16 (Шотта № 2) по ГОСТ 25336

Аппарат для встряхивания жидкости типа АВУ-1

Колбы мерные 2-25 (100)-1 (2) по ГОСТ 1770

Пипетки градуированные 4 (5)-1 (2)-2, 6 (7)-1 (2)-5 (10,25) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228

Цилиндр мерный 1 (2,3,4)-100 по ГОСТ 1770

Фильтры обеззоленные (синяя лента) по нормативному документу [3]

Холинхлорид кристаллический по нормативному документу [18]

Спирт этиловый по ГОСТ 18300

Натрий фосфорнокислый 12-водный по ГОСТ 9337, раствор с массовой долей 0,1 %

Ацетон по ГОСТ 2603

Спирт изопропиловый по нормативному документу [1]

Рейнекат аммония по нормативному документу [5]

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Примечания

1. Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.
2. Все реактивы должны быть квалификации х.ч. или ч.д.а.

O'ZBEKISTON STANDARTLASHTIRISH, METROLOGIYA VA DAVLAT NAZORATI AGENTLIGI

7.2 Подготовка к испытанию

7.2.1 Приготовление осаждающего реагента

2 g рейнеката аммония растворяют в 100 cm^3 этилового спирта в конической колбе при нагревании на водяной бане при температуре (40 ± 2) ^0C в течении 20 min. После охлаждения раствор фильтруют через обеззоленный складчатый фильтр. Раствор готовят в день определения.

7.2.2 Приготовление стандартного раствора холинхлорида

0,1 кристаллического холинхлорида высушивают до постоянной массы в вакуум-эксикаторе и растворяют его в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 cm^3. Доводят до метки дистиллированной водой. Стандартный раствор содержит 1 mg холинхлорида в 1 cm^3.

Допускается приготовление стандартного раствора из 70 %-ного раствора холинхлорида с пересчетом на 100 %-ную активность.

7.2.3 Построение градуировочного графика

В 5 конических колб вместимостью 50 cm^3 помещают 1,2,5,7,10 cm^3 стандартного раствора холинхлорида соответственно добавляют 10 cm^3 раствора фосфата натрия и 5 cm^3 раствора рейнеката аммония и далее проводят все испытания по 7.2.4. Интенсивность окрашенных растворов измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром или спектрофотометре при длине волны 526 nm и кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 mm относительно ацетона и на основании его показаний строят градуировочный график.

7.2.4 Проведение испытания

Навеску премикса массой 1-5 g, взвешенную с погрешностью не более 0,002 g, вносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3, приливают 50 cm^3 дистиллированной воды, нагревают до 80 ^0C и встряхивают на аппарате 15 min Охлаждают колбу, объем доводят до метки дистиллированной водой и фильтруют через обеззоленный складчатый фильтр в стакан. Отбирают 5-20 cm^3 фильтрата в колбу с притертой пробкой , приливают 10 $см^3$ раствора фосфорнокислого натрия и 5 cm^3 раствора рейнеката аммония. Колбу с содержимым встряхивают и оставляют на 2 h при температуре 4 ^0C. После выпадения кристаллов холинхлорида раствор фильтруют на воронке Шотта № 2 с асбестовым слоем, используя вакуумный насос. Кристаллы, оставшиеся на фильтре, промывают 4-5 порциями (по 5 cm^3) охлажденного изопропилового спирта (спирт хранится в холодильнике до полного использования). Меняют колбу и растворяют кристаллы ацетоном, приливая его в три приема по 7 cm^3, каждый раз осторожно размешивая верхний асбестовый слой с осадком.

Содержимое колбы фильтруют в мерную колбу вместимостью 25 cm^3. Объем доводят в колбе ацетоном до метки. Интенсивность окрашенных растворов измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром или спектрофотометре при длине волны 526 nm в кюветах толщиной поглощающего свет слоя 10 mm относительно ацетона.

7.3 Обработка результатов испытания

Содержание 70 %-ного холинхлорида X в премиксе, g/t, рассчитывают по формуле:

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

$$X = \frac{K\ 1{,}43\ V}{m \cdot V_1},$$

где К – масса холинхлорида, найденная по градуировочному графику, mm;

1,43 – коэффициент пересчета на 70 %-ный раствор холинохлорида;

V – общий объем экстракта, cm^3;

m – масса навески, g;

V_1 - объем раствора, взятый на проведение анализа, cm^3

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности P= 0,95 не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности P= 0,95 расхождения не должны превышать 15 %.

8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_5

Сущность метода заключается в кислотном гидролизе связанных форм витамина B_5 (никотиновой кислоты), очистке гидролизата, получении окрашенного раствора и колориметрическом определении в сравнении со стандартным раствором.

8.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 g по ГОСТ 24104

Фотоэлектроколориметр типа ФЭК-56, КФК, или спектрофотометр типа СФ-26 или аналогичные с диапазоном длин волн 400-440 nm.

Баня водяная.

Баня ледяная.

Воронка Бюхнера № 3 или № 4 по ГОСТ 9147.

Палочки стеклянные.

Стакан химический вместимостью 1 и 2 dm^3 по ГОСТ 25336

Склянки из темного стекла.

Колбы конические вместимостью 250 dm^3 по ГОСТ 25336

Бюретка 1-2-25 по ГОСТ 29251 и ГОСТ 29252

Фильтры обеззоленные (красная и синяя ленты) по нормативному документу [3]

Колбы мерные 2-100 (500, 1000)-1 (2) по ГОСТ 1770

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336

Пипетки 1 (2,4,5)-1(2)-1(2), 6(7)-1(2)-5(10,25) по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228

Пробирки с притертой пробкой вместимостью 15 cm^3 по ГОСТ 1770

O'ZBEKISTON STANDARTLASHTIRISH, METROLOGIYA VA DAVLAT NAZORATI BOSHQARMASI

Цилиндры мерные 1(2,3,4)-50(100, 500) по ГОСТ 1770
Бром по ГОСТ 4109
Калий роданистый по ГОСТ 4139 или аммоний роданистый по ГОСТ 27067, растворы с массовыми долями 1 и 10 %
Кальций углекислый по ГОСТ 4530
Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации с (HCl) = 0,5 mol/dm^3 (0,5 н)
Кислота серная по ГОСТ 4204, растворы с молярными концентрациями с (1/2 H_2SO_4) = 2 mol/dm^3 и с (1/2 H_2SO_4) = 10 mol/dm^3
Витамин B_5 по нормативному документу [12]
Метол по ГОСТ 25664, раствор с массовой долей 6 %
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, растворы молярных концентраций с (NaOH) = 4 mol/dm^3 и с (NaOH) = 10 mol/dm^3
Спирт этиловый по ГОСТ 18300
Уголь активный по ГОСТ 6217
Фенолфталеин по нормативному документу [6]
Цинк сернокислый по ГОСТ 4174, раствор с массовой долей 80 %
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Примечания

1. Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.
2. Все реактивы должны быть квалификации х.ч. или ч.д.а.

8.2 Подготовка к испытанию

8.2.1 Перекристаллизация метола

500 cm^3 раствора серной кислоты молярной концентрации с (1/2 H_2SO_4) = 0,1 mol/dm^3 нагревают до кипения, добавляют 100 g метола и снова доводят до кипения. Если раствор сильно окрашен, к нему добавляют 10 g активного угля. Кипящий раствор быстро фильтруют через предварительно нагретую (кипящей водой) воронку Бюхнера, фильтрат переносят в большой химический стакан, приливают 0,7 dm^3 этилового спирта (96 °), размешивают и помещают в ледяную баню и оставляют на несколько часов в темном месте.

Выпавшие в осадок кристаллы отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают на фильтре 2-3 раза этиловым спиртом, порциями по 30-40 cm^3 и высушивают на воздухе в темном месте.

Подготовленный метол хранят в склянке из темного стекла в холодильнике до полного использования.

8.2.2 Приготовление раствора метола

Навеску перекристаллизованного метола массой (8 ± 0,002) g вносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки раствором соляной кислоты молярной концентрации с (HCl) = 0,5 mol/dm^3. Раствор готовят перед употреблением.

8.2.3 Приготовление бромной воды

В темную склянку с притертой пробкой с 100 cm^3 дистиллированной воды, добавляют в вытяжном шкафу 4-5 cm^3 брома, хорошо встряхивают и оставляют на 1-3 d для лучшего насыщения воды бромом. Бромную воду охлаждают в емкости со льдом в течении 30 min.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

8.2.4 Приготовление роданбромидного раствора

К 30 cm^3 охлажденной бромной воды по каплям прибавляют раствор роданистого калия или роданистого аммония с массовой долей 10 % до светло-желтого окрашивания. Затем по каплям прибавляют эти же растворы с массовой долей 1 % до полного обесцвечивания бромной воды. К обесцвеченному раствору постепенно, небольшими порциями, по 20-50 mg, добавляют углекислый кальций до прекращения выделения пузырьков газа.

Раствор фильтруют от осадка через обеззоленный фильтр с синей лентой в склянку из темного стекла с притертой пробкой и хранят на холоде. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

8.2.5 Приготовление основного стандартного раствора витамина B_5

(500 ± 0,002) mg витамина B_5 помещают в мерную колбу вместимостью 500 cm^3, добавляют 200 cm^3 дистиллированной воды, 5 cm^3 раствора серной кислоты молярной концентрации с (1/2 H_2SO_4) = 10 mol/dm^3 и после растворения кристаллов доводят объем дистиллированной водой до метки.

В 1 cm^3 раствора содержится 1000 μg витамина B_5.

Раствор годен к употреблению в течении 6 месяца при хранении в холодильнике.

8.2.6 Приготовление рабочего стандартного раствора витамина B_5

5 cm^3 основного стандартного раствора витамина B_5 разводят дистиллированной водой в колбе вместимостью 1 dm^3, доводят до метки этой же водой и тщательно перемешивают. В 1 cm^3 раствора содержится 5 μg витамина B_5. Раствор готовят в день проведения анализа.

8.3 Проведение испытания

Навеску массой 5 g, взвешенную с погрешностью не более 0,002 g переносят в мерную колбу вместимостью 100 cm^3, смывая горлышко колбы 60-65 cm^3 раствора серной кислоты молярной концентрации (1/2 H_2SO_4) = 2 mol/dm^3. Содержимое перемешивают и колбу помещают в кипящую водяную баню на 40 min, периодически перемешивая содержимое. По окончании гидролиза колбу охлаждают до комнатной температуры, доводят объем дистиллированной водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 5-10 cm^3 фильтрата.

Отбирают 10-20 cm^3 фильтрата в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой. Затем 25 cm^3 полученного раствора помещают в цилиндр вместимостью 50 cm^3, добавляют 1-2 капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют, внося по каплям раствор гидроокиси натрия молярной концентрации с (NaOH) = 10 mol/dm^3 до получения слабо-розового окрашивания. Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации с (1/2 H_2SO_4) = 2 mol/dm^3 добавляя по каплям до исчезновения розового окрашивания. Раствор охлаждают, добавляют 2 cm^3 раствора сернокислого цинка и 1-2 капли этилового спирта (до устранения пены).

Из пипетки по каплям добавляют раствор гидроокиси натрия молярной концентрацией с (NaOH) = 4 mol/dm^3, одновременно перемешивая палочкой до образования осадка и появления бледно-розового окрашивания раствора.

STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA VA DAVLAT NAZORATI
QO'SHMACHASI

Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации c (1/2 H_2SO_4) = 2 mol/dm^3 (до исчезновения розового окрашивания) и оставляют стоять в течение 10 min, периодически перемешивая. Палочку вынимают, обмывают над цилиндром дистиллированной водой и доводят объем до 50 cm^3, перемешивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

Цветную реакцию проводят в восьми пробирках с притертыми пробками: в одну пробирку вносят 5 cm^3 дистиллированной воды (контроль на реактивы, B_1); в три пробирки вносят по 5 cm^3 рабочего стандартного раствора, B; в четыре пробирки вносят по 5 cm^3 полученного фильтрата, из них 2 пробирки, с испытуемым раствором A; две - поправка на аминореагирующие вещества, A_1.

Все пробирки, кроме A_1, помещают на 5 min в водяную баню при температуре (50 ± 2) °C. После этого в 2 пробирки (A_1) вносят по 2 cm^3 дистиллированной воды, а во все остальные пробирки – по 2 cm^3 роданбромидного раствора из бюретки в вытяжном шкафу.

Пробирки закрывают пробками, перемешивают и помещают в баню при той же температуре на 10 min По истечении этого времени пробирки вынимают, охлаждают водой до комнатной температуры и ставят на 10 min в темное место. Затем в каждую пробирку приливают по 3 cm^3 раствора метола, перемешивают и оставляют на 1 h в темном месте при комнатной температуре. По истечении этого времени растворы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, если они мутные, и колориметрируют на фотоэлектроколориметре (синий светофильтр) или спектрофотометре при длине волны 400-440 nm в кювете толщиной поглощающего свет слоя 10 mm относительно дистиллированной воды.

8.4 Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_5 X в премиксе, g/t, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{(A-A_1)V\,V_2V_4C}{(B-B_1)mV_1V_3V_5},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора (среднее из двух параллельных определений);

A_1 – оптическая плотность раствора – поправка на аминореагирующие вещества (среднее из двух параллельных определений);

V – объем гидролизата, cm^3;

V_2 – объем разведения, cm^3;

V_4 – объем раствора после обработки сернокислым цинком, cm^3;

C – масса витамина B_5 в измеряемом стандартном растворе, μg;

B – оптическая плотность стандартного раствора (среднее из трех параллельных определений);

B_1 – оптическая плотность раствора – контроль на реактивы;

m – масса навески премикса, g;

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

V_1 – объем, взятый на дополнительное разведение, cm^3;
V_3 – объем гидролизата, взятый на обработку сернокислым цинком, cm^3;
V_5 – объем раствора, взятый для проведения цветной реакции,$см^3$.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности P= 0,95 не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности P= 0,95 расхождения не должны превышать 15 %.

9 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_5 ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

9.1 Определение витамина B_5 с применением жидкостного микроколоночного хроматографа отечественного производства марки «Милихром».

Сущность метода заключается в экстракции витамина B_5 (никотиновой кислоты) из навески премикса раствором соляной кислоты и последующем определении его содержания в испытуемом растворе с помощью хроматографа «Милихром».

9.1.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром» со спектрофотометрическим детектором (спектральный диапазон от 190 до 360 nm).

Колонка хроматографическая размером 2 x 120 mm с числом теоретических тарелок не менее 4000, заполненная одним из следующих сорбентов : Силасорб С18, Силасорб SPHC 18, Сепарон С18.

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 g по ГОСТ 24104

Колбы конические КН-100, КН-200 по ГОСТ 19908

Баня водяная с терморегулятором

Пипетки 2-1(2)-1, 2-1(2)-5, 2-1(2)-10 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228

Колбы мерные 2-50-1(2), 2-100-1(2), 2-200-1(2) по ГОСТ 1770

Воронка ВФ-1-40-ПОР 16-ХС по ГОСТ 25336

Воронка 71 по ГОСТ 19908

Стакан ВН-50, ВН-200 по ГОСТ 19908

pH-метр по нормативному документу [8]

Цилиндр мерный 2-50. 2-100 по ГОСТ 1770

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор с массовой долей 40 %
Кислота серная по ГОСТ 4204, раствор молярной концентрации с (1/2 H_2SO_4) = 5 mol/dm^3
Кислота уксусная по ГОСТ 61, с массовой долей 95 %
Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации с (HCl) = 0,1 mol/dm^3
Витамин B_5 по нормативному документу [12]
Фенолфталеин по нормативному документу [6]
Триметиламин по нормативному документу [2]
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026

Примечания

1. Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.
2. Все реактивы должны быть квалификации х.ч. или ч.д.а.

9.1.2 Подготовка к испытанию

9.1.2.1 Приготовление элюента для хроматографии

Трехкомпонентный элюент готовят смешиванием уксусной кислоты, дистиллированной воды и триметиламина в объемном соотношении 3:95:2. Для этого в мерную колбу вместимостью 500 cm^3 вносят пипеткой 15 cm^3 концентрированной уксусной кислоты, затем цилиндром вносят 100 cm^3 дистиллированной воды и перемешивают. Добавляют 10 cm^3 триметиламина, перемешивают, доводят до метки дистиллированной водой и снова тщательно перемешивают. Приготовленный раствор фильтруют через стеклянный фильтр ПОР 16 и помещают в стеклянный сосуд с притертой пробкой. Полученный элюент хранят не более 1 месяца в холодильнике.

9.1.2.2 Подготовка хроматографической колонки

Через колонку пропускают элюент в количестве 20-30 свободных объемов колонки, т.е два полных шприца насоса хроматографа при расходе элюента сначала 50 μdm^3/min, а затем 100 μdm^3/min. Промывку колонки заканчивают при получении стабильной нулевой линии.

После стабилизации колонки проводят ее насыщение витамином B_5. Для этого выполняют 7-10 анализов более концентрированного градуировочного раствора витамина B_5 . Насыщение колонки прекращают, когда расхождение между последовательными определениями не превышает 3,0 %.

9.1.2.3 Приготовление раствора серной кислоты молярной концентрации с (1/2 H_2SO_4) = 5 mol/dm^3

В мерную колбу вместимостью 100 cm^3 помещают 30-40 cm^3 дистиллированной воды и добавляют 14,2 cm^3 концентрированной серной кислоты. Осторожно перемешивают и добавляют еще 35-40 cm^3 дистиллированной воды. Когда раствор остынет до комнатной температуры, осторожно доводят объем дистиллированной водой до метки.

9.1.2.4 Построение градуировочного графика

В мерную колбу вместимостью 100 cm^3 помещают 0,1 g витамина B_5 и приливают 70 cm^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации с

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

(HCl) = 0,1 mol/dm^3. Колбу помещают в водяную баню и нагревают в течении 10 min при температуре 75 °C. Затем охлаждают и содержимое количественно переносят в химический стакан вместимостью 200 cm^3. Добавляют 1-2 капли 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина, раствор гидроокиси натрия с массовой долей 40 % до образования розового окрашивания, избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации с (1/2 H_2SO_4) = 5 mol/dm^3. Раствор фильтруют через бумажный фильтр с синей полосой в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой. Получают основной стандартный раствор витамина B_5 массовой концентрации 1 мг/см^3. Из этого раствора готовят рабочие растворы содержащие 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg витамина B_5 в 50 cm^3. Для этого соответственно 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 и 3,0 cm^3 основного раствора помещают в 6 мерных колб вместимостью 50 cm^3 и доводят до метки дистиллированной водой.

Рабочие растворы анализируют на жидкостном хроматографе при следующих условиях :

хроматографическая колонка 2 x 120 mm;
сорбент – Силасорб С18, Силасорб SPH C 18, Сепарон С18
трехкомпонентный элюент на основе уксусной кислоты;
объем пробы – 6 μdm^3;
длина волны – 260 nm;
скорость подачи элюента - 80-100 μdm^3/мин;
постоянная времени – 0,2 s.

Удерживаемый объем пика витамина B_5 – 560-580 μdm^3 (может меняться в зависимости от длины колонки и плотности ее заполнения). Каждый раствор хроматографируют два раза. После выхода пика колонку промывают, прокачивая через нее 150-200 μdm^3 элюента до выхода на нулевую линию.

Значение средних высот хроматографических пиков (в единицах оптической плотности е.о.п.) откладывают по оси ординат градуировочного графика, а по оси абсцисс – количество витамина в 50 cm^3 раствора.

Градуировочный график строят так же, откладывая по оси ординат средние высоты хроматографических пиков, выраженные в единицах длины (миллиметрах).

Построение градуировочного графика можно заменить расчетом коэффициента наклона К, mg/e.o.п, по формуле

$$K = \frac{\sum_{i=1}^{n} K_1}{n},$$

где K_1 – коэффициент наклона градуировочного графика для i – го градуировочного раствора, mg/e.o.п;
n – количество точек, по которым строится градуировочный график.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Значение коэффициента наклона градуировочного графика K_i mg/e.o.п или mg/mm, вычисляют по формуле

$$K_i = \frac{C_i}{h_i},$$

где C_i – содержание витамина в соответствующем i – m градуировочном растворе;

h_i – высота i – го хроматографического пика, e.o.п. или mm.

9.1.2.5 Проверка градуировочного графика

Градуировочный график контролируют не реже 1 раза в неделю. Для этого 1-2 рабочих раствора витамина следует анализировать, как указано в 9.1.2.4.

Отклонение полученных результатов от измеренных в момент построения градуировочного графика a, % определяют по формуле

$$a = \frac{h_1 - h_2}{h_i} \times 100$$

где h_1, h_2 - высота хроматографического пика, определенная при построении градуировочного графика и в момент проверки соответственно, e.o.п. или mm.

При отклонении результатов более чем на 5 % строят новый градуировочный график.

Градуировочные растворы хранят в холодильнике в стеклянной посуде с притертой пробкой. Срок годности растворов не более 1 месяца.

9.1.3 Проведение кислотного гидролиза

Навеску премикса массой 1-5 g, взятую с погрешностью на более 0,001 g, помещают в коническую колбу вместимостью 100 cm^3 и добавляют 3 cm^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,1 mol/dm^3. Колбу нагревают на водяной бане при температуре (75 ± 1) °C в течение 10 min, охлаждают, содержимое колбы количественно переносят в химический стакан вместимостью 200 cm^3. Добавляют 1-2 капли спиртового раствора фенолфталеина с массовой долей 1 % и раствор гидроокиси натрия с массовой долей 40 % до образования розового окрашивания. Избыток щелочи нейтрализуют раствором серной кислоты молярной концентрации c (1/2 H_2SO_4) = 5 mol/dm^3. После 10 – минутного выдерживания раствор фильтруют через обеззоленный фильтр с синей лентой в мерную колбу вместимостью 50 cm^3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

9.1.4 Хроматографирование

Полученный экстракт хроматографируют, как 9.1.2.4. Для определения содержания витамина B_5 в премиксах проводят 2 параллельных анализа, начиная со взятия навески. Каждый экстракт хроматографируют два раза,

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

находят среднеарифметическое значение высоты пиков в единицах оптической плотности или миллиметрах и по градуировочному графику определяют содержание витамина в миллиграммах, приложение С, рисунок С1.

9.1.5 Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_5 X в премиксе, mg/kg вычисляют по формуле

$$X = \frac{C}{m},$$

где C – содержание витамина, найденное по градуировочному графику, mg;
m - масса навески премикса, g.

При использовании коэффициента наклона К вместо градуировочного графика содержание витамина B_5 в премиксе, mg/g, вычисляют по формуле

$$X = \frac{KA}{m},$$

где K – коэффициент наклона градуировочного графика, mg/e.o.п.
A – высота хроматографического пика, e.o.п.
m - масса навески премикса, g.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности P= 0,95 не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности P= 0,95 расхождения не должны превышать 15 %.

9.2 Определение витамина B_5 с применением жидкостных хроматографов импортного производства.

Сущность метода заключается в экстракции витамина B_5 из навески премикса раствором соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,01 mol/dm^3 и хроматографическом анализе его содержания в испытуемом растворе с использованием жидкостного хроматографа со спектрофотометрическом детектором.

Метод применим в диапазоне содержания витамина B_5 от 0,2 до 4 g/kg премикса.

9.2.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный с фотометрическим детектором при спектральном диапазоне от 200 до 300 nm. Возможно использование детектора при постоянной длине волны 254 nm.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Колонка хроматографическая стальная или стеклянная высотой 150-200 mm и диаметром 2,6-4,6 mm с числом теоретических тарелок не менее 3000 на 1 m, заполненная сорбентом «Силосорб С-18» или «Сепарон С-18» с зернением 7,5 μm.

Весы лабораторные не ниже 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 g по ГОСТ 24104

Центрифуга лабораторная ЦЭ-2 с числом оборотов 6000 в минуту

Колбы мерные 2-50(100)-1(2) по ГОСТ 1770

Иономер ЭВ-74 со стеклянным электродом ЭСЛ-63-07

Пипетка 4-1(2)-1 по ГОСТ 29227 и ГОСТ 29228

Ацетонитрил по нормативному документу [7]

Тетрабутиламмоний хлористый по нормативному документу [14]

Тетрабутиламмоний бромистый по нормативному документу [13]

Витамин B_5 по нормативному документу [12]

Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации c (HCl) = 0,01 mol/dm^3

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026

Примечания

1. Допускается использование другой аппаратуры, реактивов и материалов с техническими и метрологическими характеристиками не ниже указанных.
2. Все реактивы должны быть квалификации х.ч. или ч.д.а.

9.2.2 Подготовка к испытанию

9.2.2.1 Приготовление элюента для хроматографии

В колбе вместимостью 1 dm^3 смешивают 120 cm^3 ацетонитрила с 880 cm^3 дистиллированной воды, добавляют (2 ± 0,002) g хлористого (бромистого) тетрабутиламмония. Полученную смесь фильтруют через бумажный фильтр для удаления механических примесей и помещают в стеклянный сосуд с притертой пробкой.

Полученный раствор можно хранить в течении 1 месяца.

9.2.2.2 Приготовление раствора экстрагента

Для экстракции витамина B_5 используют раствор соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 0,01 mol/dm^3, который готовят прибавлением к 1 dm^3 дистиллированной воды 0,6 cm^3 концентрированной 37 %-ной соляной кислоты. Значение pH должно быть 2 ± 0,2.

9.2.2.3 Приготовление основного стандартного раствора витамина B_5

Навеску витамина B_5 массой 0,1 g взвешенную с погрешностью не более 0,002 g, растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 cm^3 и доводят до метки этой же водой . Полученный раствор содержит 1 mg витамина B_5 в 1 cm^3.

Раствор хранят в холодильнике до полного использования.

9.2.2.4 Приготовление рабочего стандартного раствора витамина B_5

Рабочий стандартный раствор никотиновой кислоты готовят в зависимости от предполагаемого содержания ее в премиксе по таблице 1. Рабочий стандартный раствор готовят в день проведения контроля.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA VA DAVLAT NAZORATI
QO'SHQAYNASI

Таблица 1

Концентрация рабочего стандартного раствора, mg/cm^3	Количество основного стандартного раствора необходимое для разбавления, cm^3	Вместимость мерной колбы для разведения, cm^3	Предполагаемое содержание витамина B_5 в 1kg премикса, g
0,04	2	50	2-3
0,02	1	50	1-2
0,01	1	100	Менее 1

9.2.3 Проведение испытания

9.2.3.1 Экстрагирование

Навеску премикса массой 1 g, взвешенную с погрешностью не более 0,002 g, помещают в мерную колбу вместимостью 50 cm^3, приливают 2/3 объема раствора соляной кислоты молярной концентрации с (HCl) = 0,01 mol/dm^3 , перемешивают и оставляют стоять в течении 20 min, несколько раз при этом перемешивая , после чего доводят до метки тем же раствором. Полученную суспензию перемешивают и часть отливают в центрифужную пробирку, центрифугируют в течении 5 min при 6000 r/min. Полученный центрифугат используют для хроматографического анализа.

9.2.3.2 Хроматографирование

Хроматографирование осуществляют при следующих условиях : колонка заполненная сорбентом, подвижная фаза – элюент по 9.2.2.1, рабочая длина волны спектрофотометрического детектора 262 nm или (254 nm), скорость элюирования – 1,5 cm^3/min, температура – комнатная.. При данных условиях проводят 3-5 загрузок стандартного раствора по 5 μdm^3, отмечая время выхода выхода пика витамина B_5 в секундах в высоту пика относительно базисной линии. При достижении постоянной высоты можно приступать к контролю. Загружая по три раза в одинаковых условиях 5-10 μdm ^{3} стандартного раствора витамина массовой концентрации 0,01-0,04 mg в 1 cm^3 в зависимости от состава премикса (10 μdm^3 раствора массовой концентрации 0,01-0,02 mg/cm^3 или 5 μdm^3 раствора массовой концентрации 0,04 mg/cm^3) и экстракт премикса после центрифугирования. По времени выхода определяют пик витамина B_5 в экстракте и измеряют высоту пика, как расстояние от вершины пика до линии проведенной в основании пика (приложение D, рисунок D1). Измеряя и сравнивая высоты пиков на хроматограммах, вычисляют содержание витамина B_5 в премиксах.

9.2.3.3 Обработка результатов испытания

Содержание витамина B_5 X в премиксе, g/kg, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_{cm} h_x V}{h_{cm} m},$$

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

где C_{cm} – концентрация витамина B_5 в рабочем стандартном растворе mg/cm^3;

h_x – высота пика витамина B_5 на хроматограмме испытуемого раствора, mm;

V – общий объем экстракта, cm^3;

h_{cm} – высота пика витамина B_5 на хроматограмме рабочего стандартного раствора, mm;

m – масса навески, g.

Результат испытания вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми при доверительной вероятности P= 0,95 не должны быть более 10 % относительно среднего арифметического значения, а между результатами, выполненными в двух разных лабораториях при доверительной вероятности P= 0,95 расхождения не должны превышать 15 %.

10 ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

10.1 Работы с концентрированными кислотами, щелочами и др. летучими веществами должны проводится в вытяжном шкафу.

10.2 Необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с электроприборами.

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Библиография

[1] ТУ 6-09-402-87 2 Пропанол (изопропиловый спирт) химически чистый

[2] ТУ 6-09-11-2021-87 Триметиламин

[3] ТУ 6-09-1678-86 Фильтры обеззоленные (белая, красная, синяя ленты)

[4] МРТУ 6-09-2437-65 Триэтиламин

[5] ТУ 6-09-08-944-83 Рейнекат аммония

[6] ТУ 6-09-53-60-87 Фенолфталеин индикатор

[7] ТУ 6-09-06-1092-83 Ацетонитрил, технические условия

[8] ТУ 25-7416-0171-88 pH-метр типа pH-153

[9] ГФ СССР-X ст.149 Хининсульфат

[10] ГФ СССР-X ст. 147 Хинингидрохлорид

[11] ГФ СССР-X ст 585 Рибофлавин (витамин B_1)

[12] ГФ СССР-X ст.19 Никотиновая кислота (витамин B_5)

[13] МРТУ 6-09-105-62 Тетрабутиламмоний бромистый

[14] МРТУ 6-09-5351-68 Тетрабутиламмоний хлористый

[15] ТУ 25-1894.003-90 Секундомер СОС ПР-2А-3-000

[16] ГФ СССР-X ст.673 Тиаминбромид

[17] ГФ СССР-X ст.674 Тиаминхлорид

[18] ГФ СССР-X ст 42-1997-93 Холинхлорид

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA VA DAVLAT NAZORATI
DOSKARMASI

УДК 636.085.3:006.354 ОКС 65.120.19 С 19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова : премикс, контроль, витамины, экстракция, флуоресценция, хроматограмма

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
MUVOFIQLASHTIRISH
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Приложение А

ХРОМАТОГРАММА ЭКСТРАКТА ИЗ ПРЕМИКСА

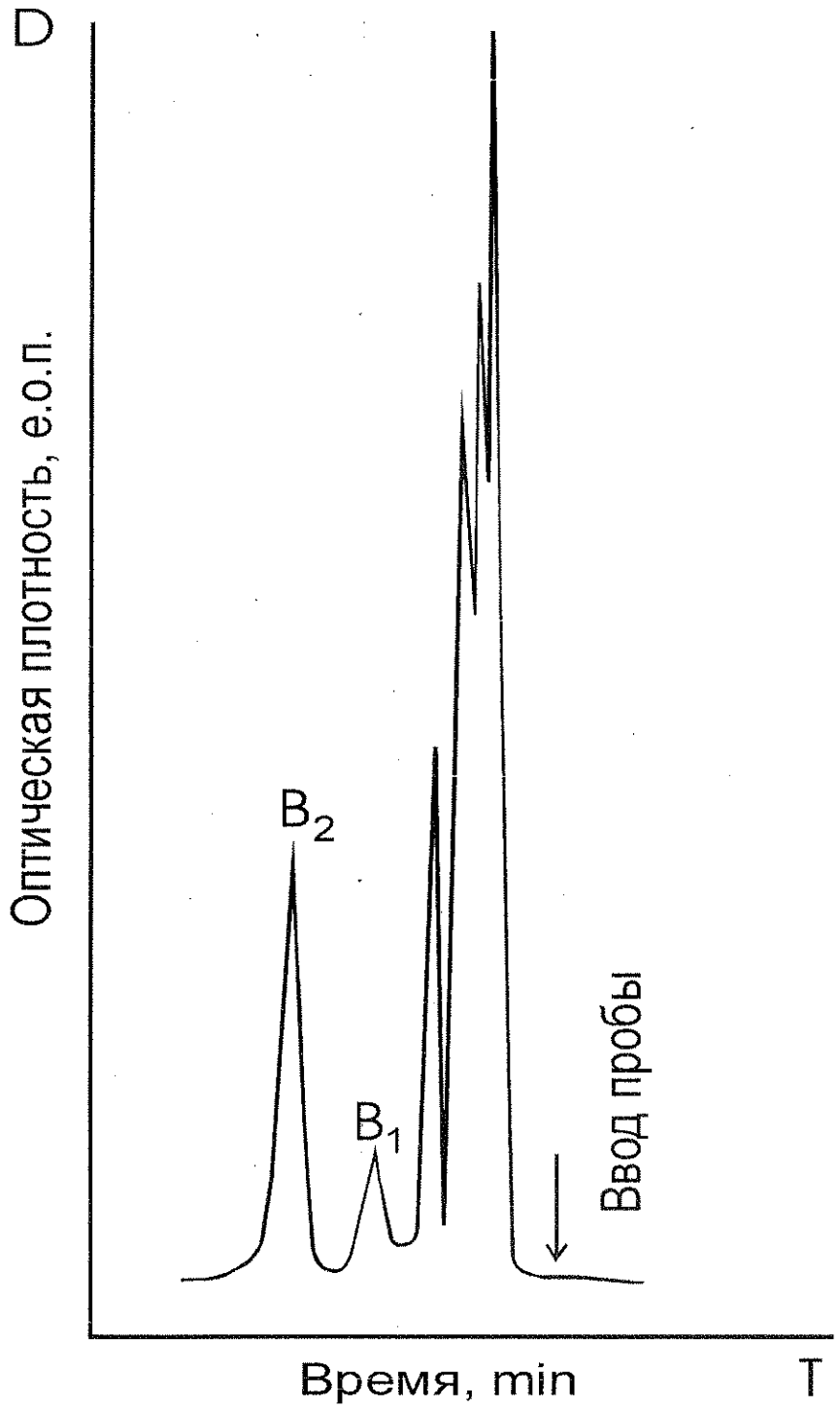


Рисунок А.1 – Хроматограмма экстракта из премикса

DAVLAT AGENTLIGI
DAVLAT ATTESTATSIYA,
METROLOGIYA
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Приложение В

ХРОМАТОГРАММА СМЕСИ ВИТАМИНОВ B_1 И B_2

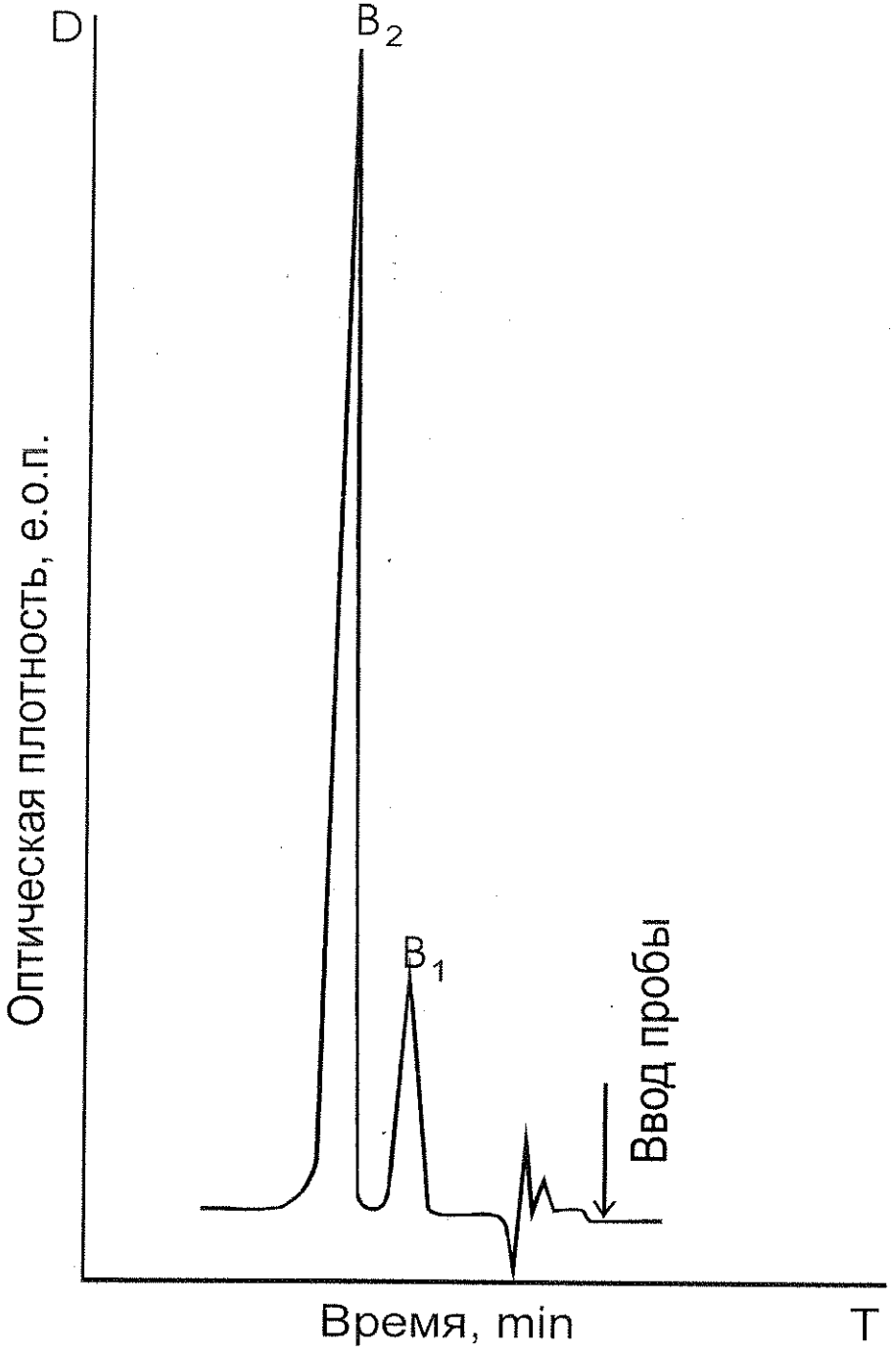


Рисунок В.1 – Хроматограмма смеси витаминов B_1 и B_2

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA
VA DAVLAT NAZORATI
BOSHQARMASI

Приложение С

ХРОМАТОГРАММА ЭКСТРАКТА ВИТАМИНОВ B_5 ИЗ ПРЕМИКСА

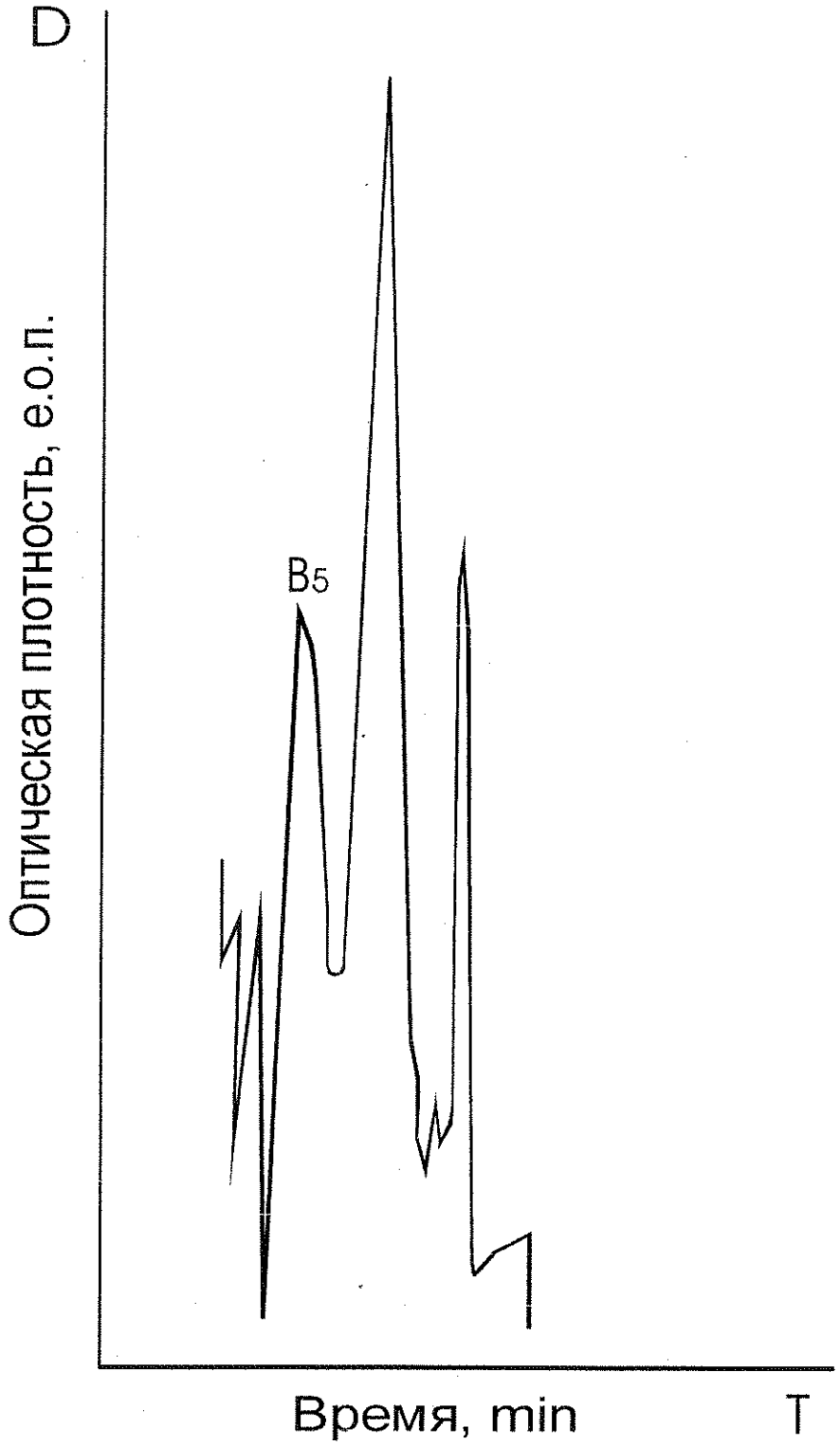
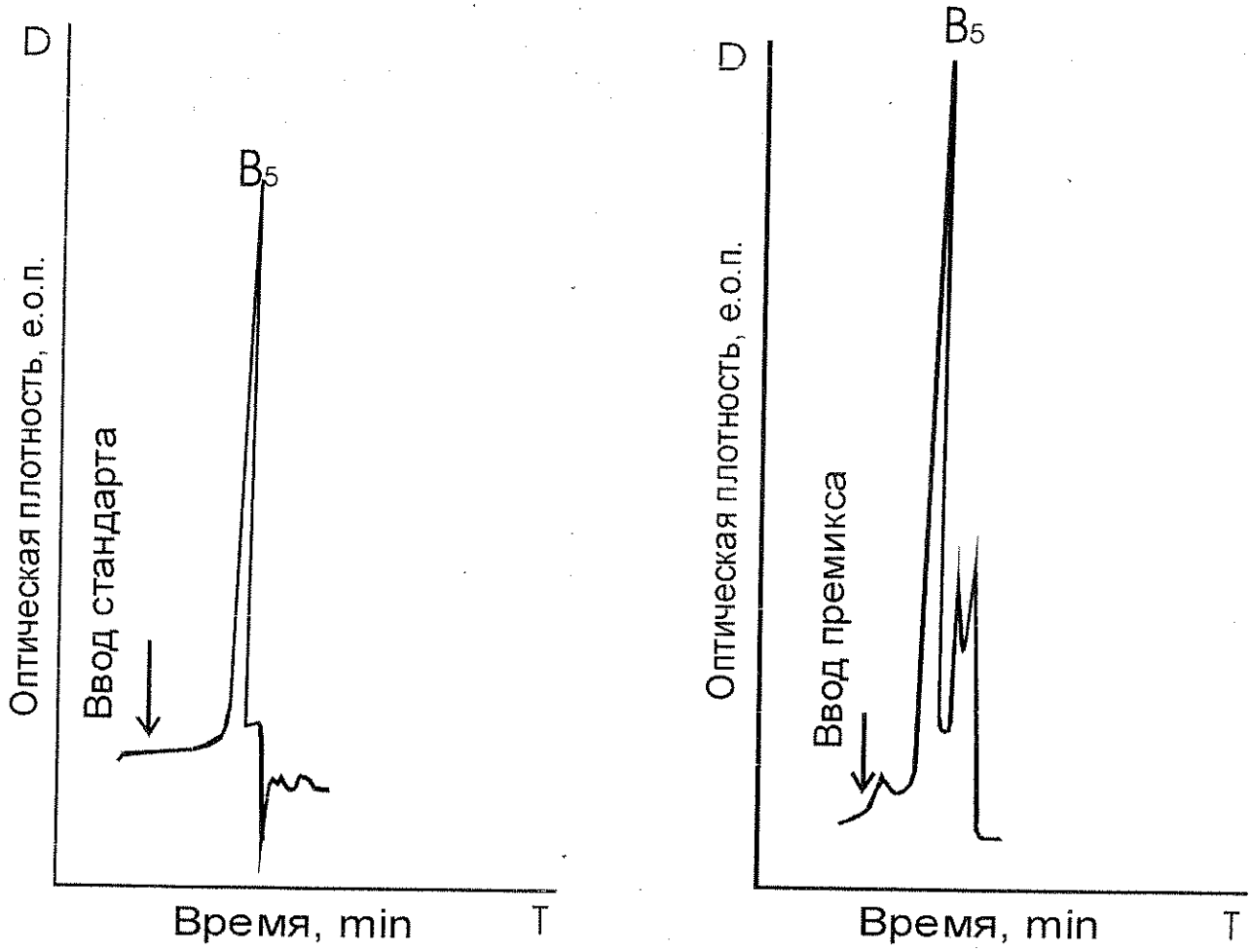


Рисунок С.1 – Хроматограмма экстракта витаминов B_5 из премикса

O'ZSTANDART AGENTLIGI
STANDARTLASHTIRISH,
METROLOGIYA VA
SERTIFIKATSIYA
BOSHQARMASI

Приложение D

ХРОМАТОГРАММЫ РАСТВОРОВ ВИТАМИНА B_5



а **б**

Рисунок D.1 – Хроматограммы: а – стандартного раствора; б – экстракта из премикса

DAVLAT STANDARTLASHTIRISH, METROLOGIYA VA DAVLAT NAZORATI BOSHQARMASI