
ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EASC)

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



МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ EN
14152**

*(проект, ВУ,
первая редакция)*

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение содержания витамина В₂
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 14152:2014, IDT)

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

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 14152:2014 Foodstuffs – Determination of vitamin B₂ by high performance liquid chromatography (Продукты пищевые. Определение витамина В₂ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии).

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.

ВЗАМЕН ГОСТ EN 14152-2013

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

ГОСТ EN 14152

(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

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.....

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ
Определение содержания витамина В₂
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
Foodstuffs
Determination of vitamin В₂ by high performance liquid chromatography

Дата введения — _____

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Применение настоящего стандарта может быть связано с проведением опасных операций, использованием вредных веществ, опасного оборудования. В задачи настоящего стандарта не входит решение всех вопросов безопасности, связанных с его применением. Ответственность за соблюдение техники безопасности и установление необходимых ограничений при применении настоящего стандарта несет его пользователь.

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания витамина В₂ в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и флуоресцентного детектирования. Данный метод был валидирован в двух межлабораторных исследованиях. В первом исследовании проводился анализ проб сухого молока и свиной печени в пределах от 1,45 до 10,68 мг/100 г. Во втором исследовании анализировали пробы раствора для энтерального питания, пищевой продукции для детского питания, сухого молока, цельнозерновой муки с фруктами, дрожжей, продуктов переработки зерна, шоколадного порошка в диапазоне от 0,21 до 87,10 мг/100 г. Содержание витамина В₂ представляет собой массовую долю общего рибофлавина, включая его фосфорилированные производные.

Для получения более подробной информации о валидации см. раздел 8 и приложение В.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, 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

Рибофлавин извлекают из пищевой продукции путем кислотного гидролиза с последующим дефосфорилированием, используя ферментативную обработку, и определяют его количество методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием. Для количественной оценки используют метод внешнего стандарта. Для получения дополнительной информации см. [1] - [11].

4 Реактивы

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

4.1 Метанол для ВЭЖХ, массовая доля $w(\text{CH}_3\text{OH}) \geq 99,8 \%$.

4.2 Натрия ацетат тригидрат, $w(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 99 \%$.

4.3 Раствор ацетата натрия, с молярной концентрацией $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 0,1$ моль/л.

4.4 Раствор ацетата натрия, $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 2,5$ моль/л.

4.5 Ледяная уксусная кислота, $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 99,8 \%$.

ГОСТ EN 14152

(проект, ВУ, первая редакция)

4.6 Раствор уксусной кислоты, $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,02$ моль/л

4.7 Раствор соляной кислоты, $w(\text{HCl}) = 36$ %.

4.8 Раствор соляной кислоты, $c(\text{HCl}) = 0,1$ моль/л.

4.9 Раствор соляной кислоты, $c(\text{HCl}) = 0,01$ моль/л.

4.10 Раствор серной кислоты, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ моль/л.

4.11 Раствор гидроксида натрия, $w(\text{NaOH}) \geq 99\%$.

4.12 Раствор гидроксида натрия, $c(\text{NaOH}) = 0,5$ г/л.

4.13 Оксид фосфора, $w(\text{P}_2\text{O}_5) = 98$ %.

4.14 Фермент или смесь ферментов, способный(ая) высвободить витамин В₂ из пищевой продукции в виде свободного рибофлавина.

Примечание 1 – Для получения прецизионных данных, указанных в таблице В.1, была использована така-диастаза, произведенная компанией Pfaltz and Bauer¹⁾. Для получения прецизионных данных, указанных в таблицах В.2, В.3, была использована смесь β -амилазы из ячменя и така-диастазы, произведенной Serva¹⁾.

4.15 Подвижные фазы ВЭЖХ

Примеры соответствующих смесей с объемными долями метанола (4.1) от 10 % до 50 % в воде или использования фосфатного или ацетатного буфера представлены в приложениях А, С. Также представлен вариант подвижной фазы с использованием ион-парного реагента.

4.16 Фосфатный буфер (рН 3,5), $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 9,0$ ммоль/л.

4.17 Тетраэтиламмоний хлорид, $w(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NCl}) \geq 98$ %.

4.18 Натрия гептансульфонат, $w(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}) \geq 98$ %.

4.19 Стандартные вещества

4.19.1 Рибофлавин, $w(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) = 98$ %.

Витамин В₂ в виде рибофлавина может быть получен от различных поставщиков, поэтому степень его чистоты может различаться. В связи с этим необходимо определять концентрацию градуировочного раствора методом УФ-спектрометрии (см. проверку концентрации 4.20.3).

4.19.2 Рибофлавин-5'-фосфат натрия, $w(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{NaO}_9\text{P}) = 95$ %.

Соль рибофлавин-5'-фосфат натрия (для проверки фермента и времени удерживания на хроматограмме).

4.20 Основные растворы

4.20.1 Меры предосторожности.

Витамин В₂ является очень чувствительным к свету. Поэтому необходимо защитить витамин В₂ и соответствующие растворы в течение всей процедуры подготовки проб, например посредством использования посуды из темного стекла.

4.20.2 Основной раствор рибофлавина, $M = 376,36$, $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx 100$ мкг/мл

Взвешивают около 50 мг стандартного вещества рибофлавина (4.19.1) с точностью до 1 мг, которое было предварительно высушено и хранилось в темноте в эксикаторе под вакуумом и/или с помещенным в него оксидом фосфора (4.13), помещают в мерную колбу из темного стекла вместимостью 500 мл и растворяют в растворе уксусной кислоты (4.6). Полученный раствор хранят в темноте при температуре 4 °С в течение 2 мес.

Рибофлавин трудно растворим. Для облегчения его растворения в мерную колбу со стандартным веществом рибофлавина вносят около 300 мл раствора уксусной кислоты (4.6) и выдерживают колбу на водяной бане при постоянном перемешивании до полного растворения рибофлавина, затем раствор охлаждают и объем содержимого колбы доводят до метки раствором уксусной кислоты (4.6). В качестве альтернативы в мерную колбу вместимостью 500 мл со стандартным веществом рибофлавина вносят

¹⁾ Информация о поставщиках така-диастазы Pfaltz & Bauer, Уотербери, СТ 06708, США (№ T00040) и Serva приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанной продукции. Допускается использовать аналогичную продукцию при условии обеспечения идентичных результатов.

5 мл раствора гидроксида натрия (4.12). Поскольку рибофлавин нестабилен в щелочной среде, сразу же после его растворения в колбу вносят 1,5 мл ледяной уксусной кислоты (4.5), после чего объем содержимого колбы доводят до метки раствором уксусной кислоты (4.6) или другой соответствующей кислотой. Точную концентрацию свежеприготовленного основного раствора рибофлавина и, при необходимости хранившегося, следует определять (4.20.3).

4.20.3 Определение точной концентрации основного раствора рибофлавина

В мерной колбе вместимостью 200 мл смешивают 20 мл основного раствора рибофлавина (4.20.2) с 3,5 мл раствора ацетата натрия (4.3) и объем содержимого колбы доводят до метки водой. Для подготовки холостого раствора в мерной колбе вместимостью 200 мл смешивают 20 мл раствора уксусной кислоты (4.6) с 3,5 мл ацетата натрия (4.3) и объем содержимого колбы доводят до метки водой. Данные растворы используют для спектрометрического измерения.

Измеряют оптическую плотность раствора рибофлавина на спектрометре (5.1) при длине волны 444 нм (A_{444}) в кювете с длиной оптического пути 1 см, используя холостой раствор в качестве раствора сравнения. Рассчитывают массовую концентрацию основного раствора рибофлавина (4.20.2) ρ , мкг/мл, по формуле

$$\rho = \frac{A_{444} \cdot M \cdot 1000}{\varepsilon}, \quad (1)$$

где ε Молярный коэффициент поглощения рибофлавина при максимальной длине волны приблизительно 444 нм, $\varepsilon = 12340 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Данное значение рассчитывается исходя из коэффициента экстинкции $E_{1\text{см}}^{1\%} = 328$ в ацетатном буфере (pH=3,8) при 444 нм [9], и молярной массы $M = 376,36$. Значение округляют до четырех значащих цифр;
 M молярная масса, г/моль. Значение равно 376,36;
 A_{444} значение оптической плотности раствора рибофлавина.

4.21 Стандартные растворы

4.21.1 Стандартный раствор рибофлавина, $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx 10 \text{ мкг/мл}$

Готовят разведение 1 : 10 основного раствора рибофлавина (4.20.2). Переносят пипеткой 10 мл основного раствора рибофлавина в мерную колбу из темного стекла вместимостью 100 мл и объем содержимого колбы доводят до метки раствором уксусной кислоты (4.6) или другим подходящим растворителем. Раствор используют свежеприготовленным.

4.21.2 Стандартный аналитический раствор рибофлавина, $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx \text{от } 0,1 \text{ до } 1 \text{ мкг/мл}$.

В мерную колбу из темного стекла вместимостью 100 мл переносят пипеткой от 1,0 до 10,0 мл стандартного раствора (4.21.1) и объем содержимого колбы доводят до метки подвижной фазой (4.15). Раствор используют свежеприготовленным.

5 Оборудование

Используют стандартные лабораторное оборудование, стеклянную посуду, в том числе перечисленные ниже:

5.1 УФ-спектрометр, пригодный для измерения оптической плотности при определенной длине волны (444 нм) с соответствующими кюветами с длиной оптического пути 1 см.

5.2 Автоклав или нагревательный прибор, автоклав, предназначенный для экстракции, например электрического типа, работающий под давлением, со считывающим устройством давления или температуры, плитка электрическая или водяная баня.

5.3 Система ВЭЖХ

Система ВЭЖХ состоит из насоса, устройства для ввода проб, флуоресцентного детектора с длиной волны возбуждения и эмиссии, установленные на уровнях 468 нм и 520 нм соответственно (см. приложение С), а также устройства для обработки данных, например интегратора.

5.4 Колонка для ВЭЖХ

Аналитическая колонка для обращенно-фазовой хроматографии, например диаметром от 4,0 до 4,6 мм, длиной от 100 до 250 мм, размер частиц от 3 до 10 мкм. Также могут использоваться другие системы (см. приложение С) при условии обеспечения приемлемой степени отделения пика рибофлавина от пиков сопутствующих компонентов матрицы пробы.

ГОСТ EN 14152

(проект, ВУ, первая редакция)

Допускается использовать колонку других размеров, заполненную сорбентом с размером частиц, отличным от указанных в настоящем стандарте. Условия хроматографического разделения подбирают применительно к используемой колонке для обеспечения сопоставимости результатов анализов.

5.5 Фильтровальное устройство

Фильтрация подвижной фазы, а также раствора анализируемой пробы, через мембранный фильтр, с размером пор 0,45 мкм до использования или ввода проб продлевает срок службы колонок.

6 Методика проведения испытания

6.1 Меры предосторожности.

Витамин В₂ является очень чувствительным к свету. Необходимо предпринимать меры, чтобы защитить витамин В₂ и соответствующие растворы в течение всей процедуры подготовки проб, например посредством использования посуды из темного стекла.

6.2 Подготовка анализируемой пробы

Гомогенизируют анализируемую пробу. Твердую продукцию измельчают в соответствующей мельнице и перемешивают. Перед измельчением пробу рекомендуется охладить, чтобы не подвергать ее воздействию высоких температур в течение длительного времени.

6.3 Подготовка раствора анализируемой пробы

6.3.1 Экстракция

В конической колбе взвешивают от 2 до 10 г анализируемой пробы с точностью до 1 мг. Добавляют определенный объем от 50 до 200 мл раствора соляной (4.8) или серной кислоты (4.10). Значение рН раствора не должен быть выше 2,0. Накрывают колбу предметным стеклом и автоклавируют пробу для испытания при температуре 121 °С в течение 30 мин или нагревают ее при температуре 100 °С в течение 60 мин.

Исследования, проводимые Европейским бюро стандартов (BCR), показали, что можно применять обширный диапазон условий для кислотного гидролиза (температура от 95 °С до 130 °С, продолжительность от 15 до 60 мин), при этом чем выше температура, тем меньше продолжительность гидролиза. Тем не менее длительное нагревание рибофлавина и рибофлавина-5'-фосфата натрия может вызвать потери. Испытания показали, что, в частности для пищевой продукции, содержащей шоколад, эффективность экстракции снижается, если значение рН раствора выше 2.

6.3.2 Ферментативная обработка

После охлаждения до комнатной температуры к экстракту добавляют раствор ацетата натрия (4.4) до достижения значения рН, оптимального для действия предполагаемого к использованию фермента, и добавляют подходящее количество дефосфорелирующего фермента (4.14). Инкубируют полученную смесь в течение промежутка времени и при температуре, оптимальных для используемого фермента или смеси ферментов. После охлаждения до комнатной температуры переносят раствор в мерную колбу, используя раствор уксусной кислоты (4.6) или другой соответствующий растворитель, и доводят раствор анализируемой пробы до заданного объема (V_E).

Для каждого используемого фермента необходимо установить оптимальное значение рН, оптимальные продолжительность и температуру инкубирования.

Для установления оптимальных условий дефосфорилирования проводят процедуру ферментативной обработки проб с добавленным известным количеством рибофлавина-5'-фосфата натрия (4.19.2) а также проб, аналогичных исследуемой пробе по составу матрицы и являющихся аттестованными образцами сравнения.

Количество рибофлавина, внесенное с ферментом, должно учитываться при расчете результата.

Примечание – Для определения прецизионности результатов испытаний, указанных в таблицах В.1, В.2, В.3, для дефосфорилирования использовали така-диастазу (таблица В.1) и смесь така-диастазы и β-амилазы из ячменя (таблица В.2 и таблица В.3) при следующих условиях. Значение рН экстракта довели раствором ацетата натрия (4.4) до 4,0 и 4,5 соответственно и добавили 100 мг така-диастазы и 10 мг β-амилазы на грамм пробы. Смесь инкубировали при температуре от 37 °С до 45 °С в течение от 4 до 24 ч, см. [9], [10], [13].

6.3.3 Раствор анализируемой пробы

При необходимости раствор анализируемой пробы (6.3.2) фильтруют через фильтровальную бумагу или мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм или центрифугируют на подходящем *g* уровне.

При необходимости разбавляют аликвоту (V_A) определенным объемом (V) смеси растворителя, совместимого с системой элюирования ВЭЖХ. Например, 1,0 мл экстракта (6.3.2) разбавляют 1,0 мл метанола (4.2.1). Полученный раствор является раствором анализируемой пробы для анализа ВЭЖХ.

6.4 Идентификация

В систему ВЭЖХ вводят одинаковые соответствующие объемы стандартных растворов, а также растворов анализируемой и холостой проб. Идентифицируют рибофлавин путем сравнения времени удерживания индивидуальных пиков на хроматограммах раствора анализируемой пробы и стандартного раствора. Идентификация пиков также может быть выполнена путем добавления определенного количества стандартного вещества в раствор анализируемой пробы.

Примечание - Ниже приведены условия хроматографического анализа, которые обеспечивают удовлетворительное качество хроматографического разделения и количественного определения (см. рисунок А.1). Для информации об альтернативных системах ВЭЖХ см. таблицу С.1.

Колонка:	Supelco® LC-18-DB ²⁾ , 5 мкм, 250 × 4,6 мм.
Подвижная фаза:	Метанол (4.1) : фосфатный буфер pH 3,5 (4.16), содержащий 1 г/л тетраэтиламмония хлорида (4.2.17) и 5 ммоль/л натрия гептасульфата (4.18) (35 : 65).
Скорость потока:	1,0 мл/мин.
Объем введенной пробы:	20 мкл.
Детектор:	Флуорометрический: длина волны возбуждения 468 нм, длина волны эмиссии 520 нм.

6.5 Определение

В систему ВЭЖХ вводят равные соответствующие объемы (до 100 мкл) раствора рибофлавина (4.20.2), а также раствора анализируемой пробы (6.3.3). Для выполнения количественного определения методом внешнего стандарта интегрируют площади пиков или определяют высоты пиков пробы и результаты сравнивают с соответствующими значениями стандартного раствора.

Проверяют линейность градуировочной зависимости.

7 Вычисление

Результат определения вычисляют, используя градуировочный график или соответствующие программы системы обработки данных, или приведенный ниже упрощенный способ вычисления. Рассчитывают массовую долю витамина В₂, w , мг/100 г пробы, по формуле

$$w = \frac{A_S \cdot \rho \cdot V \cdot V_E}{A_{ST} \cdot m_S \cdot V_A \cdot 1000} \cdot 100 - \frac{m_E \cdot E}{m_S} \quad (2)$$

- где A_S – площадь или высота пика рибофлавина на хроматограмме раствора анализируемой пробы (6.3.3), выраженная в единицах площади или высоты;
- A_{ST} – площадь или высота пика рибофлавина на хроматограмме раствора рибофлавина (4.20.2), выраженная в единицах площади или высоты;
- V – общий объем раствора анализируемой пробы (6.3.3), мл;
- V_E – объем экстракта пробы (6.3.2), мл;
- V_A – объем аликвоты, используемый для разбавления (6.3.3), мл;
- ρ – массовая концентрация рибофлавина в растворе рибофлавина (4.20.2), мкг/мл;
- m_S – масса пробы, г;
- 1000 – коэффициент пересчета микрограммов в миллиграммы;
- 100 – коэффициент пересчета массовой доли на 100 г;
- E – массовая доля рибофлавина, присутствующего в ферменте, мг/100 г.
- m_E – масса фермента, используемого в анализе, г;

²⁾ Supelco® LC-18-DB – пример подходящей продукции, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанной продукции.

ГОСТ EN 14152

(проект, ВУ, первая редакция)

Результат определения содержания витамина В₂, мг/100 г, представляют в пересчете на рибофлавин.

8 Прецизионность

8.1 Общие положения

Данные прецизионности для метода частично основываются на данных различных методов ВЭЖХ, применяемых для определения рибофлавина в ходе международного сравнительного исследования, организованного Европейской комиссией в рамках Программы стандартных измерений и испытаний на пробах цельнозерновой муки (CRM 121), сухого молока/сухого молока, полученного методом распылительной сушки, (CRM 421), смеси лиофилизированных овощей (CRM 485) и лиофилизированной свиной печени (CRM 487). Статистические данные, полученные в ходе исследования, приведены в таблице В.1 приложения В. Кроме того данные прецизионности включают результаты совместного французского исследования проб раствора для энтерального питания, пищевой продукции для детского питания с овощами, сухого молока, цельнозерновой муки с фруктами, дрожжей, продуктов переработки зерна, шоколадного порошка и пищевой добавки. Результаты, полученные в ходе исследования, приведены в таблицах В.2, В.3 приложения 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 для рибофлавина:

Сухое молоко	$\bar{x} = 1,45$ мг/100 г	$r = 0,13$ мг/100 г
Свиная печень	$\bar{x} = 10,5$ мг/100 г	$r = 0,51$ мг/100 г
Раствор для энтерального питания	$\bar{x} = 0,21$ мг/100 г	
Детское питание с овощами	$\bar{x} = 0,30$ мг/100 г	$r = 0,02$ мг/100 г
Сухое молоко	$\bar{x} = 1,13$ мг/100 г	$r = 0,08$ мг/100 г
Цельнозерновая мука с фруктами	$\bar{x} = 0,60$ мг/100 г	$r = 0,06$ мг/100 г
Дрожжи	$\bar{x} = 4,34$ мг/100 г	$r = 0,37$ мг/100 г
Продукты переработки зерна	$\bar{x} = 0,43$ мг/100 г	$r = 0,06$ мг/100 г
Продукты переработки зерна	$\bar{x} = 2,48$ мг/100 г	$r = 0,18$ мг/100 г
Шоколадный порошок	$\bar{x} = 1,26$ мг/100 г	$r = 0,14$ мг/100 г
Пищевая добавка	$\bar{x} = 87,1$ мг/100 г	$r = 9,5$ мг/100 г

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 для рибофлавина:

Сухое молоко	$\bar{x} = 1,45$ мг/100 г	$R = 0,30$ мг/100 г
Свиная печень	$\bar{x} = 10,5$ мг/100 г	$R = 2,35$ мг/100 г
Раствор для энтерального питания	$\bar{x} = 0,21$ мг/100 г	$R = 0,02$ мг/100 г
Детское питание с овощами	$\bar{x} = 0,30$ мг/100 г	$R = 0,09$ мг/100 г
Сухое молоко	$\bar{x} = 1,13$ мг/100 г	$R = 0,27$ мг/100 г
Цельнозерновая мука с фруктами	$\bar{x} = 0,60$ мг/100 г	$R = 0,09$ мг/100 г
Дрожжи	$\bar{x} = 4,34$ мг/100 г	$R = 1,2$ мг/100 г
Продукты переработки зерна	$\bar{x} = 0,43$ мг/100 г	$R = 0,19$ мг/100 г
Продукты переработки зерна	$\bar{x} = 2,48$ мг/100 г	$R = 0,53$ мг/100 г
Шоколадный порошок	$\bar{x} = 1,26$ мг/100 г	$R = 0,37$ мг/100 г
Пищевая добавка	$\bar{x} = 87,1$ мг/100 г	$R = 16,6$ мг/100 г

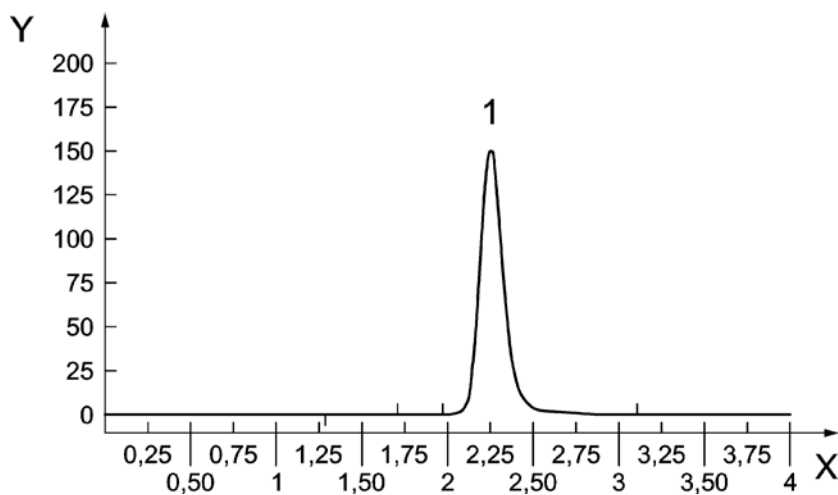
9 Протокол испытания

Протокол испытания должен соответствовать требованиям EN ISO/IEC 17025 [17] и содержать следующие данные:

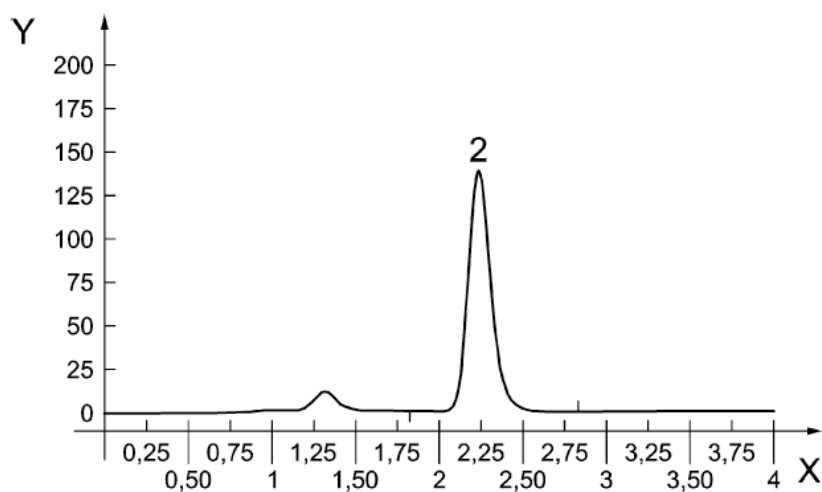
- a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
- b) ссылку на настоящий стандарт или на используемый метод;
- c) дату и время отбора проб (если известно);
- d) дату получения пробы;
- e) дату проведения испытания;
- f) результаты и единицы измерения, в которых выражены результаты;
- g) любые 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



a)



b)

Пояснение:

Y Флюоресценция

X Время, мин

1 Витамин В₂ в стандартном растворе рибофлавина (0,05 мкг/мл), время удерживания 2,3 мин2 Витамин В₂ в смеси для детского питания, время удерживания 2,3 мин

Колонка:

SymmetryShield RP18, 5 мкм, 150 x 3,0 мм.

Подвижная фаза:

Метанол (4:1): ацетат натрия (0,05 моль/л) (30 : 70).

Скорость потока:

1,0 мл/мин.

Объем введенной пробы:

10 мкл.

Детектор:

Флуориметрический: длина волны возбуждения 468 нм, длина волны эмиссии 520 нм.

Рисунок А.1 – Пример ВЭЖХ-разделения рибофлавина в стандартном растворе а)
и смеси для детского питания б)

Приложение В
(справочное)
Данные прецизионности

Данные, приведенные в таблице В.1, получены в результате межлабораторных испытаний [9], проведенных в соответствии с Руководством по аттестации образцов сравнения (EU SMT Certification Study Guidelines). Исследование было организовано Институтом исследования пищевой продукции, г. Норвич, Великобритания (Institute of Food Research, Norwich, UK), по заданию Бюро эталонов Европейского сообщества (EU Community Bureau of Reference). Данные, приведенные в таблицах В.2, В.3, были получены в ходе межлабораторного испытания во Франции [10].

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

Пробы	CRM 421 Сухое молоко	CRM 487 Свиная печень
Аналит	Рибофлавин	Рибофлавин
Год межлабораторного испытания	1996	1996
Количество лабораторий	13	11
Количество проб	1	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	12	11
Количество выбросов	1	0
Количество полученных результатов	60	55
Среднее значение \bar{x} , мг/100 г	1,45	10,5
Стандартное отклонение повторяемости s_r , мг/100 г	0,046	0,181
Коэффициент вариации повторяемости, %	3,2	1,7
Значение повторяемости $r [r = 2,83 \times s_r]$, мг/100 г	0,130	0,511
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R , мг/100 г	0,106	0,832
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	7,3	7,9
Значение воспроизводимости $R [R = 2,83 \times s_R]$, мг/100 г	0,30	2,35
Значение индекса Горвица (HorRat) в соответствии с [14]	0,6	1,0

П р и м е ч а н и е – В результате рассматриваемого международного сравнительного исследования данные были получены с использованием установленных методов и являются идентичными собственным систематическим процедурам анализа участвующих лабораторий с системами ВЭЖХ, описанными в приложении С.

ГОСТ EN 14152

(проект, ВУ, первая редакция)

Т а б л и ц а В . 2 – Данные прецизионности для раствора для энтерального питания, детского питания с овощами, сухого молока, цельнозерновой муки с фруктами и дрожжей

Пробы	Раствор для энтерального питания	Детское питание с овощами	Сухое молоко	Цельнозерновая мука с фруктами	Дрожжи
Год исследования	1995	1995	1995	1995	1995
Количество лабораторий	8	11	11	11	11
Количество проб	1	1	1	1	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	7	10	10	10	11
Количество выбросов	1	1	1	1	0
Количество полученных результатов	14	20	20	20	22
Среднее значение \bar{x} , мг/100 г	0,21	0,30	1,13	0,60	4,34
Стандартное отклонение повторяемости s_r , мг/100 г	<0,01	0,01	0,03	0,02	0,13
Коэффициент вариации повторяемости, %	<1	3	3	4	3
Значение повторяемости $r[r = 2,83 \times s_r]$, мг/100 г	-	0,02	0,08	0,06	0,37
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R , мг/100 г	0,01	0,03	0,1	0,03	0,43
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	4	10	9	6	10
Значение воспроизводимости R [$R = 2,83 \times s_R$], мг/100 г	0,02	0,09	0,27	0,09	1,2
Значение индекса Горвица (HorRat) в соответствии с [13]	0,3	0,7	0,8	0,5	1,1

Т а б л и ц а В . 3 – Данные прецизионности для продуктов переработки зерна, шоколадного порошка и пищевой добавки

Пробы	Продукт переработки зерна	Продукт переработки зерна	Шоколадный порошок	Пищевая добавка
Год исследования	1995	1995	1995	1995
Количество лабораторий	11	11	11	9
Количество проб	1	1	1	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	10	10	11	9
Количество выбросов	1	1	0	0
Количество полученных результатов	20	20	22	18
Среднее значение \bar{x} , мг/100 г	0,143	2,48	1,26	87,1
Стандартное отклонение повторяемости s_r , мг/100 г	0,02	0,07	0,05	3,4
Коэффициент вариации повторяемости, %	5	3	4	4
Значение повторяемости $r[r = 2,83 \times s_r]$, мг/100 г	0,06	0,18	0,14	9,5
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R , мг/100 г	0,07	0,19	0,13	5,9
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	16	8	11	7
Значение воспроизводимости R [$R = 2,83 \times s_R$], мг/100 г	0,19	0,53	0,37	16,6
Значение индекса Горвица (HorRat) в соответствии с [14]	1,2	0,8	1,0	1,2

Приложение С
(справочное)

Альтернативные системы высокоэффективной жидкостной хроматографии

Удовлетворительное качество хроматографического разделения и количественного определения обеспечивается при соблюдении следующих условий хроматографического анализа [2].

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

Колонка ^а	Размеры колонки, мм × мм	Подвижная фаза	Поток, мл/мин	Параметры флуориметрического детектирования, нм
Hypersil [®] ODS, 5 мкм	125 × 4,6	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение: 462 Эмиссия: 520
Supelco [®] LC-18-DB, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : фосфатный буфер; (4.16), содержащий тетраэтиламмоний хлорид, ρ(C ₈ H ₂₀ NCl) = 1 г/л и натрия гептансульфонат, с(C ₇ H ₁₅ NaO ₃ S) = 5 ммоль/л (35 : 65)	1,0	Возбуждение 468 Эмиссия: 520
Lichrospher [®] RP18, 5 мкм	25 × 4 + 125 × 4	Метанол : 0,025 % аммиака (+ 1 г гексансульфоновой кислоты); (250 : 500), рН 3,6	1,5	Возбуждение 467 Эмиссия: 525
Apex [®] C18, 3 мкм	250 × 4	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение 450 Эмиссия: 510
Bondapak [®] C18 radial-pak cartridges	100 × 8	Метанол : 5 ммоль/л : фосфатный буфер, рН = 7, (35 : 65)	1,0	Возбуждение 440 Эмиссия: 520
Spherisorb [®] ODS2, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение 450 Эмиссия: 510
μBondapak [®] C18, 10 мкм	100 × 8	Метанол : 0,05 моль/л натрий ацетатный буфер, рН = 4,5 (40 : 60)	1,0	Возбуждение 422 Эмиссия: 522
Kromasil [®] C-18, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : вода (40 : 60)	1,0	Возбуждение 440 Эмиссия: 520
Eurospher [®] C18, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение 445 Эмиссия: 530
Spherisorb [®] ODS, 5 мкм	250 × 4,6	Метанол : вода (50 : 50)	1,0	Возбуждение 410 Эмиссия: 510
Spherisorb [®] ODS, 5 мкм	250 × 4,6	КН ₂ РО ₄ : ацетонитрил : метанол (60 : 10 : 30)	0,8	Возбуждение 450 Эмиссия: 520
^а Указанные торговые марки являются примерами подходящей продукции для целей применения настоящего стандарта, имеющейся в продаже. Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанной продукции.				

**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»
<p>Примечание – В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта: - IDT — идентичный стандарт.</p>		

Библиография

- [1] LUMLEY I.D., WIGGINS R.A. Determination of riboflavin and flavin mononucleotide in foodstuffs using high-performance liquid chromatography and a column-enrichment technique. *Analyst* (Lond.). 1981, 106 pp. 1103–1108
(Определение рибофлавина и флавино-мононуклеотида в пищевой продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и метода колонного обогащения)
- [2] FINGLAS P.M., FAULKS R. M: Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. *J. Micronutr. Anal.* 1987, 3 pp. 251–283
(Критический обзор методов ВЭЖХ для определения тиамина, рибофлавина и ниацина в пищевой продукции)
- [3] BALL F.M. in g. F. M. Ball (Ed.): *Water-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis*. Elsevier Applied Science, London, 1994, 237-246
(Химические анализы растворимых в воде витаминов при анализе пищевой продукции)
- [4] HASSELMANN C., FRANCK D., GRIMM P., DIOP P.A., SOULES C. High-performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietic foods. *J. Micronutr. Anal.* 1989, 5 pp. 269 – 279
(Высокоэффективный хроматографический анализ тиамина и рибофлавина в диетической пищевой продукции)
- [5] OLLILAINEN V., MATTILA P., VARO P., KOIVISTOINEN P., HUTTUNEN J. The HPLC determination of total riboflavin in foods. *J. Micronutr. Anal.* 1990, 8 pp. 199–207
(Определение общего содержания рибофлавина методом ВЭЖХ в пищевой продукции)
- [6] HÄGG M., KUMPULAINEN J. Thiamin and riboflavin contents in domestic and imported cereal products in Finland. *J. Food Compos. Anal.* 1993, 6 pp. 299 – 306
(Содержание тиамина и рибофлавина в отечественных и импортируемых в Финляндию крупяных продуктах)
- [7] HÄGG M. Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamin and riboflavin in foods. *J. AOAC Int.* 1994, 77 pp. 681 – 686
(Влияние различных имеющихся в продаже ферментов в жидкостном хроматографическом определении с применением внешних стандартов тиамина и рибофлавина в пищевой продукции)
- [8] EITENMILLER R.R., LANDEN W.O. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 1999, pp. 271 – 297
(Анализ витаминов для валеологии и науки о продуктах питания)
- [9] FINGLAS P.M., SCOTT K.J., WITTHOFT C.M., VAN DEN BERG H., DE FROIDMONT-GORTZ I. The certification of the mass fractions of vitamins in four reference materials: Wholemeal flour (CRM 121), milk powder (CRM 421), lyophilised mixed vegetables (CRM 485) and lyophilised pig's liver (CRM 487). EUR-report 18320, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1999
(Сертификация массовых долей витаминов в четырех эталонных материалах: цельнозерновой муке (CRM 121), сухом молоке (CRM 421), смеси лиофилизированных овощей (CRM 485) и лиофилизированной свиной печени (CRM 487))
- [10] ARELLA F., LAHÉLY S., BOURGUIGNON J.B., HASSELMANN C. Liquid chromatographic determination of vitamin B1 and B2 in foods. A collaborative study. *Food Chem.* 1996, 56 pp. 81 – 86
(Жидкостное хроматографическое определение витамина В₁ и В₂ в пищевой продукции).
- [11] OLLILAINEN V., FINGLAS P.M., VAN DEN BERG H., DE FROIDMONT-GORTZ I. Certification of B-Group Vitamins (B1, B2, B6, and B12) in Four Food Reference Materials. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49 pp. 315–321
(Сертификация витаминов группы В (В₁, В₂, В₆ и В₁₂) в четырех эталонных материалах пищевой продукции)

ГОСТ EN 14152

(проект, ВУ, первая редакция)

- [12] European Pharmacopoeia 1997: 1997: 0292; Riboflavine. 1442-1443
(Европейская Фармакопея 1997: 1997: 0292; Рибофлавин)
- [13] NDAW S., BERGAENZLE M., AOUDE-WERNER D., HASSELMANN C. Extraction procedures for the liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. Food Chem. 2000, 71 pp. 129–138
(Процедуры экстракции для определения методом жидкостной хроматографии тиамин, рибофлавина и витамина В₆ в пищевой продукции)
- [14] HORWITZ W., ALBERT R. The Horwitz Ratio (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)
- [15] THOMPSON M. Recent trends in inter-laboratory precision at and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. Analyst (Lond.). 2000, 125 pp. 385–386
(Последние тенденции в межлабораторной точности в концентрациях частей на млрд (ppb) и субчастей на млрд (sub-ppb) в отношении пригодности критериев назначения в квалификационных испытаниях).
- [16] JAKOBSEN J. Food Chem. 2008, 106 pp. 1209–1217. Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl)thiamine, and riboflavin in food samples by use of HPLC.
(Оптимизация определения тиамин 2-(1-гидроксиэтил)тиамин и рибофлавина в пробах пищевой продукции с помощью ВЭЖХ)
- [17] 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)

УДК

МКС 67.050

IDT

Ключевые слова: пищевая продукция, определение, витамин В₂, рибофлавин, высокоэффективная жидкостная хроматография

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 отдела
ведения Национального фонда
технических нормативных
правовых актов

_____ Н.М.Яковлева

Начальник сектора
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции

_____ К.А.Родригес

Ведущий инженер
отдела технического нормирования
и стандартизации пищевой
и сельскохозяйственной продукции

_____ Н.Ю.Павленок

Инженер 1 категории
научно-методического отдела
технического нормирования,
стандартизации, оценки
соответствия и стратегического
развития

_____ М.П.Калилец

Инженер 2 категории
отдела каталогизации
и регистрации технических
условий

_____ И.А.Карпович

ГОСТ EN 14152

(проект, ВУ, первая редакция)

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

Н.Н.Шиманович