МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 15607— 2015

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение D-биотина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 15607:2009, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» на основе собственного перевода на русский язык европейского стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 29 мая 2015 г. № 77)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 21 июля 2015 г. № 949-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 15607—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 15607:2009 «Продукты пищевые. Определение D-биотина высокоэффективной жидкостной хроматографией» («Foodstuffs — Determination of D-biotin by HPLC», IDT)

Европейский региональный стандарт разработан Техническим комитетом CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы», секретариатом которого является DIN (Германия).

Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

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

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

© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019

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

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Сущность метода . . . 1
4 Реактивы . . . 1
5 Аппаратура . . . 4
6 Проведение испытаний . . . 4
7 Обработка результатов . . . 5
8 Прецизионность . . . 5
9 Протокол испытаний . . . 6
Приложение А (справочное) Примеры хроматограмм . . . 7
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности . . . 9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам . . . 10
Библиография . . . 11

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

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение D-биотина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs. Determination of D-biotin by high performance liquid chromatography

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания D-биотина в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод прошел валидацию при межлабораторных сравнительных испытаниях с использованием как обогащенных проб, так и проб с естественным содержанием D-биотина, а именно концентратов типа сухого завтрака — мюсли, сухого молока для грудных детей, лиофилизированных зеленых овощей с ветчиной, лиофилизированного куриного бульона и обогащенного апельсинового сока в диапазоне значений содержания D-биотина от 16 до 200 мкг/100 г (см. приложение В).

Примечания

1 Настоящим методом может также определяться D-биоцитин, хотя ни в одной из проб, использовавшихся при межлабораторных сравнительных испытаниях, D-биоцитин не содержался. Тем не менее открываемость как D-биотина, так и D-биоцитина превышает 90 % (см. [2] и [3]).

2 При анализе проб, содержащих куриные яйца, метод приводит к заниженным значениям содержания D-биотина.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий стандарт. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения).

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

3 Сущность метода

Метод основан на выделении D-биотина из проб пищевых продуктов обработкой ферментами и количественном определении методом ВЭЖХ с послеколоночной дериватизацией ([2], [3]).

Комплексообразование D-биотина с белком авидином является весьма специфическим. Поэтому авидин, ковалентно связанный с флуоресцентной меткой — флуоресцеин-5-изотиоцианитом, используется в качестве реагента для послеколоночной дериватизации D-биотина ([4], [5]).

4 Реактивы

4.1 Общие положения

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

Издание официальное

4.2 Требования к химическим реактивам и приготовление растворов

4.2.1 Метанол для ВЭЖХ, массовая доля основного вещества $w(CH_3OH)$ не менее 99,8 %.

4.2.2 Раствор серной кислоты молярной концентрации $c(H_2SO_4)$ = 1 моль/дм^3.

4.2.3 Раствор серной кислоты молярной концентрации $c(H_2SO_4)$ = 1,5 моль/дм^3.

4.2.4 Лимонная кислота моногидрат, массовая доля основного вещества $w(C_6H_8O_7 \cdot H_2O)$ не менее 99,7 %

4.2.5 Гидрофосфат натрия 2-водный, массовая доля основного вещества $w(Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O)$ не менее 99,8 %.

4.2.6 Глутатион, массовая доля основного вещества $w(C_{10}H_{17}N_3O_6S)$ не менее 98 %.

4.2.7 Этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) 2-водный, массовая доля основного вещества $w(C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O)$ не менее 99 %.

4.2.8 Гидрофосфат калия, массовая доля основного вещества $w(K_2HPO_4)$ не менее 96 %.

4.2.9 Дигидрофосфат калия, массовая доля основного вещества $w(KH_2PO_4)$ не менее 99,5 %.

4.2.10 Приготовление цитратного буферного раствора

0,462 г моногидрата лимонной кислоты (4.2.4) и 1,05 г гидрофосфата натрия 2-водного (4.2.5) растворяют в 450 см^3 дистиллированной воды. Устанавливают значение pH раствора, равное 5,7, при помощи раствора серной кислоты (4.2.3) и затем разбавляют раствор до объема 500 см^3.

Срок хранения раствора — 1 день.

4.2.11 Приготовление раствора глутатиона массовой концентрации $\rho(C_{10}H_{17}N_3O_6S)$ = 10 г/дм^3

30 мг глутатиона (4.2.6) растворяют в 3 см^3 дистиллированной воды.

Срок хранения раствора — 1 день.

4.2.12 Приготовление раствора ЭДТА массовой концентрации $\rho(C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O)$ = 10 г/дм^3

0,1 г ЭДТА (4.2.7) растворяют в 10 см^3 дистиллированной воды.

Срок хранения раствора — 1 день.

4.2.13 Приготовление раствора гидрофосфата калия молярной концентрации $c(K_2HPO_4)$ = = 0,1 моль/дм^3

17,4 г гидрофосфата калия (4.2.8) растворяют в 1000 см^3 воды.

Срок хранения раствора — 2 дня.

4.2.14 Приготовление раствор дигидрофосфата калия молярной концентрации $c(KH_2PO_4)$ = = 0,1 моль/дм^3

13,6 г дигидрофосфата калия (4.2.9) растворяют в 1000 см^3 воды.

Срок хранения раствора — 2 дня.

4.2.15 Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 6,0

Растворы гидрофосфата калия (4.2.13) и дигидрофосфата калия (4.2.14) смешивают в такой пропорции, чтобы значение pH приготовленного раствора составляло 6,0 (например, 30 объемных частей раствора по 4.2.13 и 70 объемных частей раствора по 4.2.14).

Срок хранения раствора — 7 дней при комнатной температуре.

4.2.16 Приготовление фосфатного буферного раствор с pH 7,0

Растворы гидрофосфата калия (4.2.13) и дигидрофосфата калия (4.2.14) смешивают в такой пропорции, чтобы значение pH приготовленного раствора составляло 7,0 (например, 40 объемных частей раствора по 4.2.13 и 60 объемных частей раствора по 4.2.14).

Срок хранения раствора — 7 дней при комнатной температуре.

4.2.17 Папаин порошкообразный (CAS 9001-73-4) с удельной каталитической активностью 15 нкат/мг[1)] по отношению к этиловому эфиру N-бензоил-L-аргинина (BAEE) при pH 6,2 и 25 °C. Удельная каталитическая активность 15 нкат/мг соответствует 1 МЕ/мг (МЕ — международная единица каталитической активности).

4.2.18 Раствор папаина массовой концентрации 20 г/дм^3

4.2.18.1 Приготовление раствора

1 г порошкообразного папаина (4.2.17) растворяют в 50 см^3 цитратного буферного раствора (4.2.10). Срок хранения раствора — 5 дней при 4 °C.

4.2.18.2 Проверка активности папаина

Активность папаина может быть проверена путем приготовления второго экстракта (6.2) с удвоенным количеством фермента. Найденное содержание биотина должно соответствовать расчетному значению и ни в коем случае не превышать его.

[1)] Катал (кат) является производной единицей системы СИ для каталитической активности. 1 катал — это такая каталитическая активность, при которой скорость реакции при заданных условиях увеличивается на 1 моль/с.

Примечание — При межлабораторных сравнительных испытаниях был использован порошкообразный папаин, поставщиком которого была компания VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt, Ref.-Nr 26.146.180t[1)].

4.2.19 Конъюгат Авидин — флуоресцеинизотиоцианат (Avidin-FITC), содержащий 80 % протеина (от 2 до 4 моль флуоресцеинизотиоцианата на каждый моль авидина).

4.2.20 Исходный раствор для послеколоночной дериватизации массовой концентрации ρ(Avidin-FITC) = 50 мг/см^3

2,5 мг конъюгата авидин — флуоресцеинизотиоцианат (4.2.19) растворяют в 50 см^3 фосфатного буферного раствора с pH 7,0 (4.2.16). Срок хранения раствора — 14 дней при 4 °С.

4.2.21 Рабочий раствор для послеколоночной дериватизации массовой концентрации ρ(Avidin-FITC) = 2 мг/см^3

25 см^3 исходного раствора для послеколоночной дериватизации (4.2.20) смешивают с 600 см^3 фосфатного буферного раствора с pH 7,0 (4.2.16). Полученный раствор фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.5). Раствор устойчив при хранении в темноте в течение 8 ч.

4.2.22 Подвижная фаза для ВЭЖХ

80 объемных частей фосфатного буферного раствора с pH 6,0 (4.2.15) смешивают с 20 объемными частями метанола (4.2.1) и фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.5).

4.2.23 Така-диастаза, выделенная из *Aspergillus Oryzae*, удельная каталитическая активность 1500 нкат/мг (соответствует 100 МЕ/мг), для проб с высоким содержанием крахмала.

4.3 Образцы сравнения

4.3.1 Общие положения

D-биотин и D-биоцитин могут быть приобретены у разных поставщиков. Необходимо убедиться в том, что пики D-биотина и D-биоцитина разделяются до базовой линии на хроматограмме раствора их смеси. Массовая доля основного вещества в образце сравнения биотина может быть установлена в соответствии с методом Европейской фармакопеи [6].

4.3.2 D-Биотин, массовая доля основного вещества w($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) не менее 99 %

4.3.3 D-Биоцитин, массовая доля основного вещества w($C_{16}H_{28}N_4O_4S$) не менее 98 %

4.4 Исходные растворы

4.4.1 Приготовление исходного раствора D-биотина массовой концентрации ρ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) = = 100 мкг/см^3

Приблизительно 10 мг образца сравнения D-биотина (4.3.2), взвешенного с погрешностью ± 0,1 мг, растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Растворение может продолжаться от 4 до 5 ч. Срок хранения раствора — 2 мес при минус 18 °С.

4.4.2 Приготовление исходного раствора D-биоцитина массовой концентрации ρ($C_{16}H_{28}N_4O_4S$) = = 100 мкг/см^3

Приблизительно 10 мг образца сравнения D-биоцитина (4.3.3), взвешенного с погрешностью ± 0,1 мг, растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Срок хранения раствора — 2 мес при минус 18 °С.

4.5 Стандартные растворы

4.5.1 Стандартные растворы D-биотина массовой концентрации ρ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) от 0,05 до 0,30 мкг/см^3

Приготавливают промежуточный раствор D-биотина путем разбавления 1 см^3 исходного раствора (4.4.1) до 10 см^3 дистиллированной водой. Затем готовят шесть градуировочных растворов, разбавляя 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3,0 см^3 промежуточного раствора до 100 см^3 дистиллированной водой. Срок хранения растворов — 1 день.

4.5.2 Стандартный раствор D-биоцитина массовой концентрации ρ($C_{16}H_{28}N_4O_4S$) = 0,30 мкг/см^3

Приготавливают промежуточный раствор путем разбавления 1 см^3 исходного раствора (4.4.2) до 10 см^3 дистиллированной водой. Затем 3,0 см^3 промежуточного раствора разбавляют до 100 см^3 дистиллированной водой. Срок хранения раствора — 1 день.

[1)] Эта информация приведена исключительно для удобства пользователя настоящего стандарта и не является поддержкой указанного поставщика. Могут быть использованы аналогичные продукты, если доказано, что их применение приводит к идентичным результатам.

5 Аппаратура

5.1 Общие положения

При проведении испытания используют обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

5.2 Термостат, поддерживающий температуру на уровне (37 ± 2) °С.

5.3 Система для ВЭЖХ, состоящая из насоса, устройства для ввода проб, флуориметрического детектора, позволяющего проводить измерения при длине волны возбуждения 490 нм и длине волны регистрации 520 нм, и системы для сбора и обработки данных, например интегратора.

5.4 Обращенно-фазовые аналитические колонки, например LiChrosper® 100 RP-18 endcapped[1)]

Приведенные ниже характеристики аналитической колонки обеспечивают разделение пиков аналитов до базовой линии:

a) длина колонки 250 мм;

b) внутренний диаметр 4,0 мм;

c) размер частиц 5 мкм.

Допускается использовать колонки иных размеров и с иным размером частиц. При этом параметры разделения на таких колонках должны быть проверены с тем, чтобы гарантировать получение сопоставимых результатов. Критерием эффективности подходящих аналитических колонок является разделение пиков аналитов до базовой линии.

5.5 Устройства для фильтрования

Устройства для фильтрования подвижной фазы большого и малого размера, снабженные, например, фильтрами с размером пор 0,45 мкм.

Примечание — Фильтрование подвижной фазы и растворов проб через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм перед применением или инжектированием продлевает срок жизни колонок.

5.6 Послеколоночный реактор, состоящий из системы для ввода реагента, например Т-образного смесителя со следующим за ним капиллярным реактором длиной 10 м, выполненным из политетрафторэтиленовой трубки внутреннего диаметра 0,5 мм, смотанной по спирали диаметром 14 мм, изготовленной, например, по [7] (модель KOT2). Капиллярные реакторы могут быть приобретены у компаний «Супелко» или MicroSolv Tech[1)].

6 Проведение испытаний

6.1 Подготовка испытуемой пробы

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

6.2 Экстракция

Пробу массой от 0,5 до 10 г (что приблизительно соответствует содержанию D-биотина от 2 до 15 мкг) взвешивают с точностью до 1 мг и помещают в колбу Эрленмейера. К пробе добавляют 300 мм^3 раствора глутатиона (4.2.11), 300 мм^3 раствора ЭДТА (4.2.12), 30 см^3 цитратного буферного раствора (4.2.10) и 3 см^3 раствора папаина (4.2.18). При высоком содержании крахмала добавляют 100 мг така-диатазы (4.2.23). Смесь выдерживают в течение ночи в термостате при 37 °С при постоянном перемешивании. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и разбавляют дистиллированной водой до метки. Раствор перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Перед вводом в хроматограф его фильтруют еще раз через фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.5).

Примечание — Фильтрование как подвижной фазы, так и растворов проб через мембранный фильтр с перед применением или вводом в хроматограф продлевает срок службы колонок.

[1)] Эта информация приведена только для удобства пользователя настоящего стандарта и не означает поддержки этих продуктов. Допускается использование аналогичных продуктов, если доказано, что их использование приводит к аналогичному результату.

6.3 Проведение хроматографического анализа

Дозируют в ВЭЖХ-систему равные объемы градуировочных растворов и растворов проб. D-биотин идентифицируют путем сравнения времен удерживания пика на хроматограмме раствора пробы и градуировочных растворов. Идентификацию пиков можно также осуществить при помощи добавки образца сравнения к раствору пробы.

Из-за ограниченной стабильности раствора для послеколоночной дериватизации (4.2.21) ее регулярно проверяют при проведении серии измерений путем ввода градуировочного раствора. Приведенные ниже условия обеспечивают разделение и количественное определение D-биотина:

- хроматографическая колонка: LiChrospher® 100 RP-18 endcapped, 5 мкм, 250 × 4,0 мм;
- подвижная фаза: 80 объемных частей фосфатного буферного раствора с pH 6 (4.2.15) и 20 объемных частей метанола (4.2.1);
- расход подвижной фазы: 0,4 $см^3$/мин;
- объем инжектирования: 30 $мм^3$;
- флуоресцентное детектирование: длина волны возбуждения 490 нм, длина волны регистрации 520 нм;
- расход реагента для послеколоночной дериватизации: 1 $см^3$/мин.

Примечание — Этот метод может быть также использован для оценки содержания D-биоцитина.

7 Обработка результатов

При использовании метода внешнего стандарта определяют площади или высоты пиков и затем устанавливают градуировочную характеристику, аппроксимируемую уравнением второго порядка.

Содержание D-биотина, w, мкг/100 г пробы, вычисляют по формуле (1)

$$w = \frac{\rho \cdot V_e}{m_s} \cdot 100, \quad (1)$$

где ρ — массовая концентрация D-биотина в растворе пробы (6.2), мкг/$см^3$, вычисленная при помощи градуировочной характеристики;

V_e — объем раствора пробы (6.2), $см^3$;

m_s — масса пробы, г;

100 — множитель для пересчета содержания D-биотина к 100 г пробы.

8 Прецизионность

8.1 Общие положения

Данные по прецизионности хроматографического метода определения D-биотина были получены согласно ИСО 5725-2 [1] в 2000 г. в ходе межлабораторных сравнительных испытаний, организованных Генеральной комиссией по унификации методов анализа, Франция [3]. Все участники межлабораторных испытаний использовали градуировочные характеристики, установленные по трем точкам.

Полученные статистические данные приведены в приложении В.

8.2 Предел повторяемости

Абсолютная разность между двумя единичными результатами испытаний, полученными одним исполнителем на идентичном исследуемом материале на одном и том же оборудовании в течение возможно короткого промежутка времени, может превышать предел повторяемости r не чаще, чем в 5 % случаев. Значения для D-биотина приведены ниже:

Мюсли	x = 197 мкг/100 г	r = 25,1 мкг/100 г
Питание для грудных детей (сухое молоко)	$\bar{x}$ = 16,0 мкг/100 г	r = 5,24 мкг/100 г
Витаминизированный апельсиновый сок	$\bar{x}$ = 40,7 мкг/100 г	r = 2,51 мкг/100 г
Лиофилизированное пюре, зеленые овощи с ветчиной	$\bar{x}$ = 88,9 мкг/100 г	r = 8,99 мкг/100 г
Лиофилизированный куриный бульон	$\bar{x}$ = 168 мкг/100 г	r = 19,4 мкг/100 г

8.3 Предел воспроизводимости

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

Мюсли	$\bar{x}$ = 197 мкг/100 г	R = 96,7 мкг/100 г
Питание для грудных детей (сухое молоко)	$\bar{x}$ = 16,0 мкг/100 г	R = 13,5 мкг/100 г
Витаминизированный апельсиновый сок	$\bar{x}$ = 40,7 мкг/100 г	R = 22,8 мкг/100 г
Лиофилизированное пюре, зеленые овощи с ветчиной	$\bar{x}$ = 88,9 мкг/100 г	R = 44,1 мкг/100 г
Лиофилизированный куриный бульон	$\bar{x}$ = 168 мкг/100 г	R = 69,5 мкг/100 г

9 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать по меньшей мере следующие сведения:

a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;

b) ссылку на настоящий стандарт или используемый метод;

c) результаты испытаний с указанием единиц измерений, в которых результат испытаний выражен;

d) дату и способ отбора проб (если он известен);

e) дату поступления пробы;

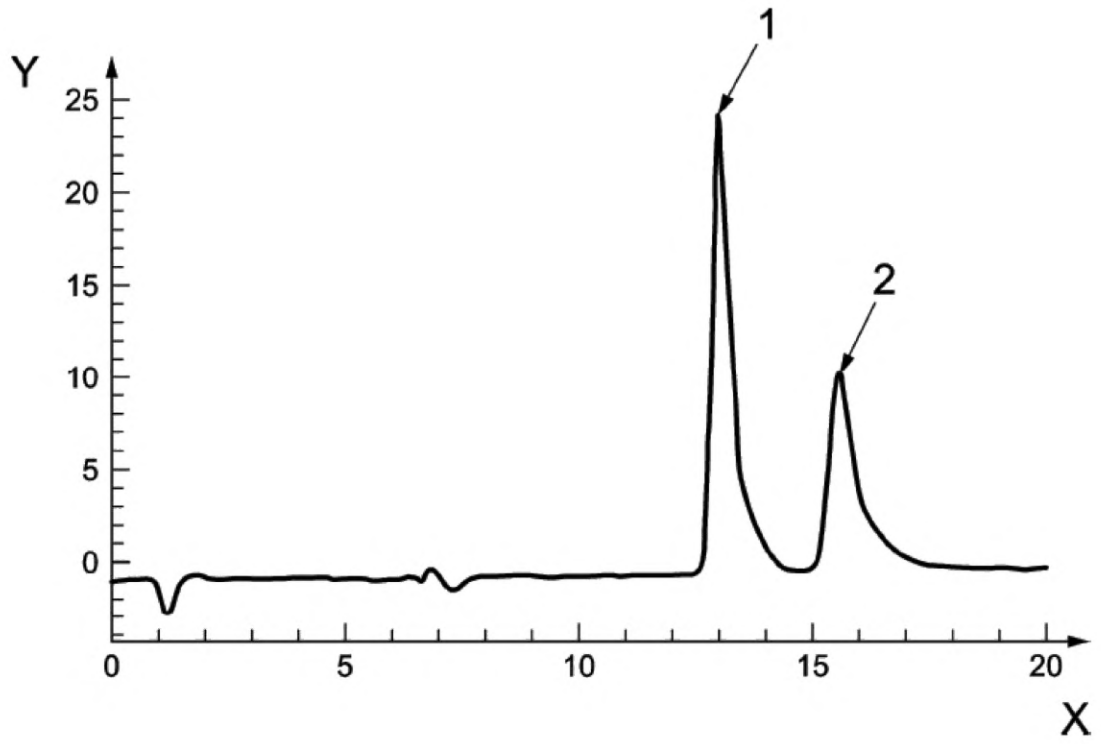
f) дату проведения испытаний;

g) все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытаний;

h) любые применявшиеся операции, не оговоренные в методе или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытаний.

Приложение А
(справочное)

Примеры хроматограмм



X — время, мин; Y — интенсивность флуоресценции; 1 — D-биотин; 2 — D-биоцитин

Рисунок А.1 — Пример хроматографического разделения D-биотина и D-биоцитина в градуировочном растворе

Условия анализа:

Хроматографическая колонка: LiChrospher® 100 RP-18 endcapped, 5 мкм, 250 мм · 4,0 мм;

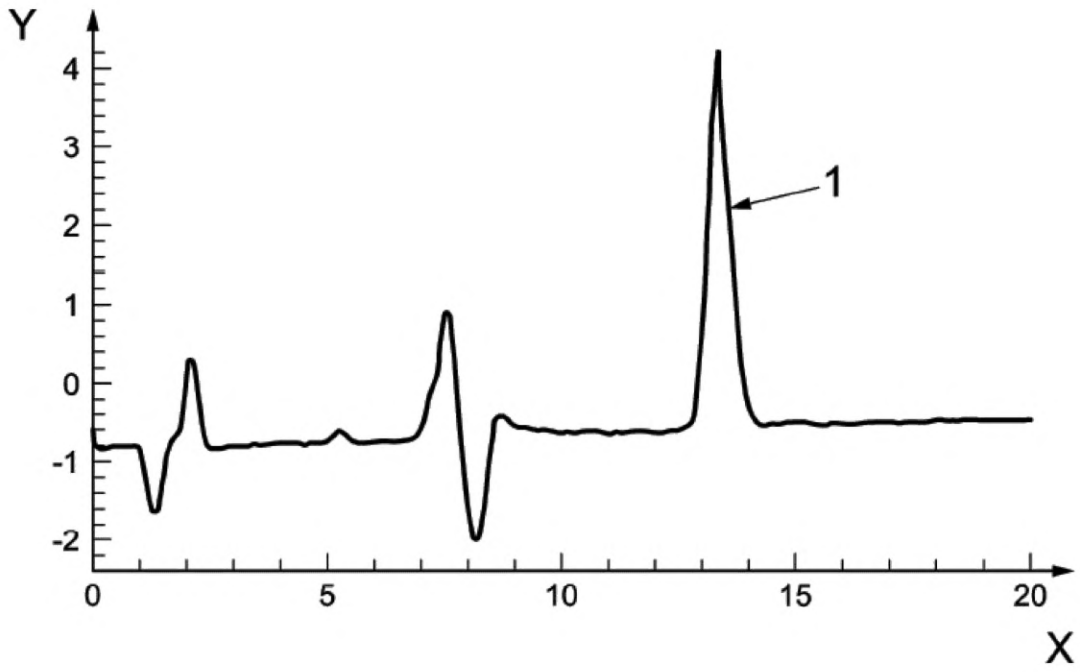
Подвижная фаза: смесь восьми объемных частей фосфатного буферного раствора с pH 6 (4.2.15) и двух объемных частей метанола (4.2.1);

Расход подвижной фазы: 0,4 $см^3$/мин;

Объем инжектирования: 30 $мм^3$;

Флуоресцентное детектирование: возбуждение при 490 нм, регистрация при 520 нм;

Расход реагента для послеколоночной дериватизации: 1,0 $см^3$/мин.



X — время, мин; Y — интенсивность флуоресценции; 1 — D-биотин

Рисунок А.2 — Пример хроматограммы D-биотина в пробе питания для грудных детей (сухое молоко)

Условия анализа:

Хроматографическая колонка: LiChrospher® 100 RP-18 endcapped, 5 мкм, 250 мм · 4,0 мм;

Подвижная фаза: смесь восьми объемных частей фосфатного буферного раствора с pH 6 (4.2.15) и двух объемных частей метанола (4.2.1);

Расход подвижной фазы: 0,4 $см^3$/мин;

Объем инжектирования: 30 $мм^3$;

Флуоресцентное детектирование: возбуждение при 490 нм, регистрация при 520 нм Расход реагента для послеколоночной дериватизации: 1,0 $см^3$/мин.

Приложение В
(справочное)

Данные по прецизионности

Значения, приведенные в таблице В.1, были получены при межлабораторных сравнительных испытаниях, организованных в 2000 г. Генеральной комиссией по унификации методов анализа, Франция [3], [8]. Эти испытания были проведены в соответствии со стандартом ИСО 5725-2 [1]. Все участники межлабораторных испытаний использовали градуировочные характеристики, установленные по трем точкам.

Таблица В.1 — Данные по прецизионности для проб мюсли, питания для грудных детей (сухое молоко), витаминизированного апельсинового сока, лиофилизированного пюре (зеленые овощи с ветчиной) и лиофилизированного куриного бульона

Проба	Мюсли	Питание для грудных детей (сухое молоко)	Витаминизированный апельсиновый сок	Лиофилизированное пюре (зеленые овощи с ветчиной)	Лиофилизированный куриный суп
Год проведения испытаний	2000	2000	2000	2000	2000
Число лабораторий	10	10	10	10	10
Число параллельных проб	2	2	2	2	2
Число лабораторий после исключения выбросов	10	9	10	10	10
Число лабораторий, результаты которых признаны выбросами	0	1	0	0	0
Число принятых результатов	20	18	20	20	20
Общее среднее $\bar{x}$, мкг/100 г	197	16,0	40,7	88,9	168
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/100 г	8,85	1,85	0,89	3,18	6,84
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	4,5	11,6	2,2	3,6	4,1
Предел повторяемости r ($r = 2,8\ s_r$), мкг/100 г	25,1	5,24	2,51	8,99	19,4
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/100 г	34,2	4,76	8,05	15,6	24,6
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	7,4	29,8	19,8	17,5	14,6
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8\ s_R$), мкг/100 г	96,7	13,5	22,8	44,1	69,5
Индекс Горвица [8]	1,2	1,4	1,1	1,1	1,0

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных европейских стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
EN ISO 3696	—	*
* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного европейского регионального стандарта.		

Библиография

[1] ISO 5725-2 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*

[2] Lahely S., Ndaw S., Arella F., Hasselmann C: *Determination of biotin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorimetric detection,* Food chem., 65, 253—258 (1999)

[3] Arella F., Deborde J. L., Bourguignon J. B., Bergaentlze M., Ndaw S., Hasselmann C: *Liquid chromatographic determination of biotin in foods. A collaborative study,* Ann. Fals. Exp. Chim., 93. 951, 193—200 (2000)

[4] Hentz N. G., Bachas L. G.: *Class-selective detection systems for liquid chromatography based on the streptavidin-biotin interaction,* Anal. Chem., 67, 1014—1018 (1995)

[5] Przyjazny A., Hentz N. G,. Bachas L. G.: *Sensitive and selective liquid chromatographic post-column reaction detection system for biotin and biocytin using an homogeneous fluorophore-linked assay,* J. chromatogr., 654, 79—86 (1993)

[6] European Pharmacopoeia 5.0, 01/2005:1073, Seite 110

[7] Selavska C. M., Jino K. S., Krull I. S.: *Construction and comparison of open tubular reactors for post-column reaction detection in liquid chromatography.* Anal. Chem., 59, 2221—2224 (1987)

[8] Horwitz W.: *Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Foods and Drugs,* Anal. Chem. 1982, 54 (1), 67A—76A

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.040

Ключевые слова: продукты пищевые, определение D-биотина, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, флуоресцентное детектирование, послеколоночная дериватизация

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.И. Рычкова*
Компьютерная верстка *Д.В. Кардановской*

Сдано в набор 12.11.2019. Подписано в печать 21.11.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,60.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru